

LUCI KIMIE OKINO SILVA

Avaliação da decomposição por fungos *Ganoderma* spp. (Polyporales, Basidiomycota) em sibipirunas (*Poincianella pluviosa* (DC.) L.P. Queiroz) da arborização urbana da cidade de São Paulo

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de DOUTOR em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Avasculares e Fungos em Análises Ambientais.

SÃO PAULO
2017

LUCI KIMIE OKINO SILVA

Avaliação da decomposição por fungos *Ganoderma* spp. (Polyporales, Basidiomycota) em sibipirunas (*Poincianella pluviosa* (DC.) L.P. Queiroz) da arborização urbana da cidade de São Paulo

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de DOUTOR em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Avasculares e Fungos em Análises Ambientais.

ORIENTADORA: DRA. ADRIANA DE MELLO GUGLIOTTA
CO-ORIENTADOR: DR. SÉRGIO BRAZOLIN

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Okino-Silva, Luci Kimie

K41a Avaliação da decomposição por fungos *Ganoderma* spp. (Polyporales, Basidiomycota) em sibipirunas (*Poincianella pluviosa* (DC.) L.P. Queiroz) da arborização urbana da cidade de São Paulo / Luci Kimie Okino Silva, 2017.
88p. il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2017.
Bibliografia.

1. Compartimentalização. 2. Degradação. 3. Enzimas. I. Título.

CDU: 577.15

Dedico à minha querida filha Mariana pela
colaboração e enorme paciência durante a
execução da tese.

Agradecimentos

À Dra. Adriana de Mello Gugliotta por aceitar me orientar nessa jornada novamente após muitos anos, pela paciência, ajuda nas horas difíceis e amizade sempre.

Ao Dr. Sérgio Brazolin do Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT) pela co-orientação, incluindo valiosas informações, discussões e trabalhos realizados.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente pela realização do presente estudo.

À CAPES pela concessão da bolsa PNADB de doutorado.

Ao Ricardo Gomes de Freitas Nuno de B. Pereira do IPT pela enorme colaboração nos trabalhos realizados no IPT.

Ao IPT por permitir o uso dos seus laboratórios para todas as análises referentes às amostras de madeira.

À Dra. Vera Maria Valle Vitali pela imensurável paciência e colaboração durante todo o desenvolvimento do trabalho no Laboratório de Micologia Aplicada.

Aos estagiários do Núcleo de Pesquisa em Micologia, Edgar Pereira, Alex Almeida, Amanda Quintanilha, Ricardo Pires, Nara Ballaminut e Giuliana Moreira e, em especial, à Viviane Motato Vasquez pela especial colaboração nas análises moleculares.

Ao Núcleo de Pesquisa em Ecologia pela disponibilização de equipamentos durante a fase experimental.

Às amigas Cynthia Guimarães Bianchi e Sonia Emi Hanashiro Ortega pelo incentivo inicial.

Ao Dr. Eduardo Luiz Longui que permitiu o acesso à marcenaria do Instituto Florestal e ao Juraci de Andrade Barbosa pela grande ajuda na obtenção da serragem do cerne e alburno. Foram dias longos e com muito pó de serragem da cabeça aos pés!

Aos amigos da prefeitura de São Paulo, em especial os engenheiros agrônomos Tácito Lúcio Toffolo dos Santos, Luiz Carlos Zelezoglo Junior, Rafael Golin Galvão, Ruy Amorim, Fernanda Soliga Voltam e Elis de Moura, ao engenheiro florestal Danilo Mizuta, ao biólogo Marcelo Correia da Silva, e a todos os agrônomos das subprefeituras que colaboraram com as coletas de *Ganoderma* e de amostras dos troncos das árvores.

À minha família, especialmente aos meus pais Kaoro e Kinue, meu marido Joceli e minha filha Mariana pela paciência, apoio e incentivo sempre mesmo nas horas de grande estresse.

A todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a viabilização deste trabalho e que provavelmente eu tenha esquecido de mencionar.

RESUMO

Ganoderma, o maior gênero da família Ganodermataceae, é bem delimitado devido aos basidiósporos bem característicos, apresenta ampla distribuição ocorrendo, sobretudo, em regiões tropicais. Apesar de muito comumente encontrado parasitando árvores urbanas, pouco se sabe sobre a sua identificação até o nível de espécie, seu comportamento fisiológico durante a degradação em árvores nativas vivas e as suas consequências. Neste estudo foi avaliada a presença de *Ganoderma* parasitando sibipiruna (*Poincianella pluviosa* (DC.) L.P. Queiroz), da arborização urbana do Município de São Paulo e sua participação na decomposição do fuste. A identificação das espécies foi baseada em análises morfológicas do basidioma e, quando possível, também molecular. Três árvores adultas com basidiomas de *Ganoderma* que apresentavam risco de queda iminente foram analisadas macro e microscopicamente para mecanismos de biodeterioração e resistência da madeira (compartimentalização). Foram realizados testes físicos e mecânicos (gravidade específica e resistência à flexão). Foram selecionados 33 espécimes arbóreos infectados juntamente com um diagnóstico fitossanitário dos mesmos, antes da coleta dos basidiomas. A partir dos basidiomas coletados foram obtidos catorze linhagens para o estudo. Foi avaliada a degradação de serragem do cerne e do alburno de sibipiruna pelas linhagens e a produção de enzimas hidrolíticas (xilanases, endoglucanases e exoglucanases) e oxidativas (lacases, peroxidases totais, peroxidases dependentes do manganês e lignina-peroxidases) e a capacidade das linhagens em produzir compostos de baixa massa molar. Dentre as linhagens estudadas, a CCIBt 4243 destacou-se entre as melhores em termos de atividade das enzimas peroxidases totais e peroxidases dependentes do manganês, ambas aos sete dias de incubação e de endoglucanases aos vinte e oito dias de incubação, seguida pela CCIBt 4174 e CCIBt 4177 que apresentaram maior atividade para lacases e exoglucanases aos sete dias de incubação, respectivamente. A CCIBt 4180 destacou-se apresentando a maior atividade de xilanases aos 21 dias de incubação. A produção de compostos de baixa massa molar foi detectada na maioria das linhagens avaliadas com destaque para CCIBt 4248 e CCIBt 4180. Mesmo com todo esse aparato enzimático, não ocorreram diferenças estatísticas na degradação de lignina insolúvel entre as amostras e o controle incubados durante 28 dias. Em relação aos processos de biodeterioração do lenho da sibipiruna e dos mecanismos de resistência, verificou-se que o apodrecimento do lenho ocorreu no cerne, sendo mais intenso próximo à medula (lenho juvenil) do que no lenho adulto e em maior extensão no colo da árvore, onde foram coletados os basidiomas, do que nas regiões mais altas do fuste. Nos ensaios físicos e mecânicos o apodrecimento observado causou reduções significativas na densidade aparente, tensão de ruptura à flexão estática e módulo de elasticidade, que justificam a ruptura de uma árvore, se submetida a esforços externos, como ventos fortes, e por consequência, a decisão de remoção da mesma.

Palavras-chave: alburno, cerne, compartimentalização, degradação enzimas, serragem.

ABSTRACT

Ganoderma, the largest genus of the Ganodermataceae family, is well delimited due to well-characterized basidiospores, with a wide distribution occurring mainly in tropical regions. Although very commonly found parasitizing urban trees, little is known about its identification up to the species level, its physiological behavior during degradation in live native trees and its consequences. This study evaluated the presence of *Ganoderma* parasitizing sibipiruna trees (*Poincianella pluviosa* (DC.) L.P. Queiroz), from the urban arborization of the Municipality of São Paulo and its participation in the decomposition of the stem. The identification of the species was based on morphological analyzes of the basidiomata and, when possible, also molecular. Three adult trees with basidiomata of these fungi and at imminent fall risk were macro- and microscopically analyzed for wood biodeterioration and resistance mechanisms (compartmentalization). Physical and mechanical tests (specific gravity and bending strength) were performed. From the basidiomata collected, fourteen strains were obtained for the study. The degradation of heartwood and sapwood sawdust of the sibipiruna tree by the strains and the production of hydrolytic (xylanases, endoglucanases and exoglucanases) and oxidative enzymes (laccases, total peroxidases, manganese-dependent peroxidases and lignin peroxidases) and the ability of the lineages to produce compounds of low molar mass were evaluated. Among the studied strains, CCIBt 4243 presented best activity for total peroxidases and manganese peroxidase in 7 days of incubation for both enzymes and endoglucanases in 28 days of incubation, followed by CCIBt 4174 and CCIBt 4177 that presented highest activities for laccases and exoglucanases, respectively. The CCIBt 4180 had the highest activity for xylanases in 21 days of incubation. The production of low molecular mass compounds was detected in most of the lineages evaluated with emphasis on CCIBt 4248 and CCIBt 4180. Even with this whole enzymatic apparatus, there were no differences in the degradation of insoluble lignin between the samples and the control incubated for 28 days. In relation to the biodeterioration processes of the sibipiruna wood and resistance mechanisms, it was verified that wood decay occurred in the heartwood, being more intense near the medulla (juvenile wood) than in the mature wood and to a greater extent in the basal, where the basidiomata were collected, than in the higher regions of the trunk. In the physical and mechanical tests, white rot caused significant reductions in specific gravity, modulus of rupture and modulus of elasticity, which justify the rupture of trees when subjected to external forces, such as strong winds and consequently, the decision to remove it.

Key words: compartmentalization, degradation enzymes, heartwood, sapwood, sawdust.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Corte transversal de um tronco mostrando os aspectos macroscópicos da madeira.

Figura 2: Esquema de uma célula vegetal.

Figura 3: Fragmento de uma molécula de celulose destacando as ligações β -1,4 e a unidade repetidora, a celobiose.

Figura4: Esquema de um fragmento da molécula de hemicelulose destacando a xilose.

Figura 5: Exemplo de molécula de lignina de *Eucalyptus grandis*.

Figura 6: *Ganoderma* infectando o colo de uma sibipiruna.

Figura 7. Árvore concatenada das sequências de *Ganoderma* estudadas.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies, origens e número de acesso ao Genbank das sequências (ITS e LSU) usadas para análises moleculares.

Tabela 2. Exemplares de basidiomas coletados com seus respectivos números de coleta, local de coleta, número de registro no herbário e na Coleção CCIBt e local de inserção do basidioma na árvore.

Tabela 3. Dados dendrométricos das árvores onde foram coletados os basidiomas de *Ganoderma* spp.

Tabela 4. Valores da média das triplicatas do pH final das linhagens incubadas na serragem do cerne e do alburno.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1. Estrutura da árvore.....	2
1.2. Caracterização da sibipiruna.....	6
1.3. Degradação da madeira	7
1.4. O gênero <i>Ganoderma</i>	8
1.5. Enzimas hidrolíticas e oxidativas que atuam na degradação da parede celular ..	9
1.5.1 Celulases.....	9
1.5.2 Hemicelulases.....	9
1.5.3 Enzimas oxidativas	10
2. OBJETIVOS.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS GERAL	12
3.1. Área de coleta	12
3.2. Seleção dos espécimes de sibipiruna estudados	12
3.3. Diagnóstico para avaliação da árvore	12
3.4. Coleta de <i>Ganoderma</i> spp. nas árvores vivas.....	12
3.5. Isolamento em meio de cultura e manutenção.....	12
3.6. Identificação dos basidiomas.....	12
3.7. Coleta dos discos do lenho de sibipiruna.....	13
3.8. Potencial de degradação e atividade de enzimas hidrolíticas e oxidativas.....	14
3.8.1. Preparo da serragem de cerne.....	14
3.8.2. Preparo da serragem de alburno	14
3.8.3. Preparo do inóculo e inoculação.....	14
3.8.4 Extração enzimática.....	14
3.8.5 Análises enzimáticas.....	14
3.9. Avaliação do pH inicial e final	15
3.10. Análise de lignina insolúvel (lignina Klason)	15
3.11. Análise da presença de compostos de baixa massa molar.....	15
3.12. Análise estatística dos ensaios enzimáticos e da degradação de lignina insolúvel.....	15
3.13. Análise da degradação do lenho sadio e deteriorado.....	15
3.14. Determinação da densidade aparente do lenho.....	16
3.15. Determinação da resistência e rigidez à flexão estática	16
3.16. Análise estatística dos ensaios físicos e mecânicos.....	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO GERAIS	17
4.1. Coleta, isolamento e identificação.....	17
4.2. Diagnóstico das árvores infectadas pelo <i>Ganoderma</i>	24
4.3. Exames macro e microscópico do lenho afetado.....	25
4.4. Análise das lâminas do lenho	25
4.5. Testes de compressão	25
4.6. Ensaios enzimáticos.....	25
4.7. Degradação de lignina Klason (insolúvel).....	25
4.8. Avaliação do pH inicial e final	25
4.9. Artigos	26
Capítulo 1	27

Capítulo 1	27
Capítulo 2	41
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
6. LITERATURA CITADA	61
7. Anexo A. Dados fitossanitários dos espécimes arbóreos removidos.....	67
8. Anexo B. Dados estatísticos da análise de variância.....	76

1. INTRODUÇÃO GERAL

As árvores urbanas promovem vários benefícios para o bem estar da população, como regulação do microclima, sombreamento, barreira contra ventos, redução da poluição sonora, sequestro e armazenamento de carbono, inteceptação da água da chuva, bem estar psicológico criando ambientes mais agradáveis dentre outros (Shigo 1979, Nowak & Crane 2002, SVMA 2015, Pradella et al. 2015) mesmo sob constantes variáveis interferindo diretamente sobre elas tais como estresse hídrico,, falta de área permeável na região do colo e raízes. podas inadequadas, corte de raízes, choques mecânicos, alagamentos em épocas chuvosas, ataque de insetos como cupins e brocas e de fungos degradadores da madeira, dentre outros. Em épocas chuvosas e com temporais e ventos fortes, ocorre o aumento de ocorrências de queda de árvores que frequentemente estão com o tronco apodrecido devido ao ataque de fungos e de outros organismos xilófagos (Brazolin 2009). De acordo com dados do Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas da Universidade de São Paulo, informados em 03/10/2016, as médias de precipitação anual para o município de São Paulo nos anos de 2013 a 2015 variou de 1.216,8 a 1.829,4 e de janeiro a junho deste ano acumulou 516,9 mm (www.iag.usp.br). O município de São Paulo tem um clima subtropical com temperatura média entre 19 a 25°C e umidade relativa entre 70 e 80% (Toledo 2004).

Durante o ano de 2016 até o dia 16 de novembro, caíram 2.907 árvores segundo o Sistema de Gerenciamento de Ocorrências Críticas (SGOC) da Secretaria Municipal de Coordenação de Subprefeituras da Prefeitura de São Paulo (www.capital.sp.gov.br). No intuito de tentar entender melhor a ação dos fungos nas árvores que fazem parte da paisagem da cidade e a sua participação na queda de árvores, escolhemos estudar a infecção do fungo basidiomiceto causador de podridão branca, *Ganoderma* spp., infectando sibipirunas nos logradouros públicos de São Paulo, SP. A sibipiruna (*Poincianella pluviosa* (DC) L.P. Queiroz) é uma espécie arbórea recomendada para arborização urbana pela prefeitura de São Paulo (SVMA 2015). Tem boa copa para sombreamento e corresponde a 11.842% do universo das árvores cadastradas pelo Sistema de Gerenciamento de Árvores Urbanas da prefeitura do município de São Paulo.

A identificação das espécies que parasitam as sibipirunas é apenas o primeiro passo para entender a interação fungo-planta. Apesar dos avanços nas diversas áreas da micologia, ainda hoje o conhecimento a respeito da ocorrência de fungos basidiomicetos em áreas urbanas é incipiente, mesmo quando se trata de *Ganoderma*, que tem sido identificado como um dos principais parasitas de árvores em áreas urbanas, e ainda hoje, espécies novas do gênero têm sido descritas (Kinge & Mih 2011; Crous et al. 2014).

No Brasil, a ocorrência de *Ganoderma* spp. em árvores vivas já foi constatada em alguns poucos municípios, sobretudo em ambientes urbanos (Lima 1993, Brazolin 2009, Russomanno et al. 2012).

Brazolin (2009) afirmou que a biodeterioração do lenho das árvores por fungos apodrecedores e cupins subterrâneos são condições que, dependendo do grau de infestação, podem ser decisivos na decisão da supressão das árvores, embasados nos incisos II e III da Lei Municipal nº 10.365 de 22 de setembro de 1987, do município de São Paulo, que tratam do “estado fitossanitário” e “risco iminente de queda das árvores”.

A importância do diagnóstico e da avaliação correta sobre o manejo em relação a essas árvores são muito grandes tendo em vista o grande adensamento populacional da cidade e, conseqüentemente, a relação muito próxima entre as árvores e as pessoas, o tráfego de veículos nas ruas e avenidas e os bens imóveis que muitas vezes são tombados pelos órgãos competentes e que devem ser preservados.

O presente trabalho pretende contribuir para o conhecimento do ataque de espécies de *Ganoderma* que crescem no lenho de sibipiruna da arborização urbana do município de São Paulo, por meio da identificação morfológica, pela avaliação da capacidade de decomposição das mesmas em serragem do cerne e do alburno de sibipiruna saudável, que contribuirão para aumentar o conhecimento da fisiologia de espécies de *Ganoderma* infectando sibipirunas que vivem sob estresse hídrico e poluição aérea e demais interferências anteriormente citadas.

Pela avaliação do lenho atacado, espera-se também obter resultados que indiquem se a presença de *Ganoderma* spp. nas sibipirunas deve ser fator preponderante para a remoção do espécime arbóreo infectado ou se apenas deve ser feito o seu monitoramento. Esses dados serão importantes para o manejo das árvores do município de São Paulo bem como para os demais municípios que utilizam a sibipiruna na arborização urbana.

1.1. Estrutura da árvore

A árvore, de modo geral, é formada basicamente pelas raízes, tronco, galhos e folhas. Em um corte transversal do tronco, pode-se observar de fora para dentro a casca externa e interna, o câmbio vascular, o alburno, o cerne e a medula (Figura 1).



Figura 1. Corte transversal de um tronco de sibipiruna mostrando a diferença de coloração entre o alburno e o cerne. Fonte: IPT

A casca externa é responsável pela proteção mecânica da casca interna e limita a perda de água pela evaporação. A casca interna é responsável pela condução dos fotossintatos. O câmbio vascular, entre a casca interna e a madeira, é o responsável pela produção de ambos os tecidos. O alburno é a porção ativa da madeira e o cerne é não funcional, geralmente mais escuro pelo acúmulo de extrativos e a medula é remanescente dos primeiros estágios de crescimento antes da madeira ser formada (Desch & Dinwoodie 1996).

Numa angiosperma viva, o alburno tem como funções principais dar suporte mecânico, realizar a condução de água e sais minerais das raízes para as folhas através dos vasos e traqueídeos e armazenar reserva de alimento geralmente na forma de amido no parênquima (Rayner & Boddy 1988). O suporte é devido às fibras que são as mais abundantes, compondo cerca de 95% do volume total da madeira (Bamber 1987). O cerne não tem células vivas nem realiza a condução de água ou materiais de reserva. É responsável pelo estoque de vários extrativos que geralmente resultam na coloração mais escura que a do lenho ativo denominado de alburno (Esau 1976). Esses extrativos podem ser compostos fenólicos ou taninos que conferem diferentes características dependendo da espécie arbórea (Bamber 1987, Desch & Dinwoodie 1996).

A parede celular consiste de três regiões principais: lamela média, parede primária e parede secundária como mostra o esquema na Figura 2. A parede celular apresenta três componentes principais: microfibrilas de celulose, hemicelulose, pectina incrustada na parede primária e lignina na parede secundária (Desch & Dinwoodie 1996).

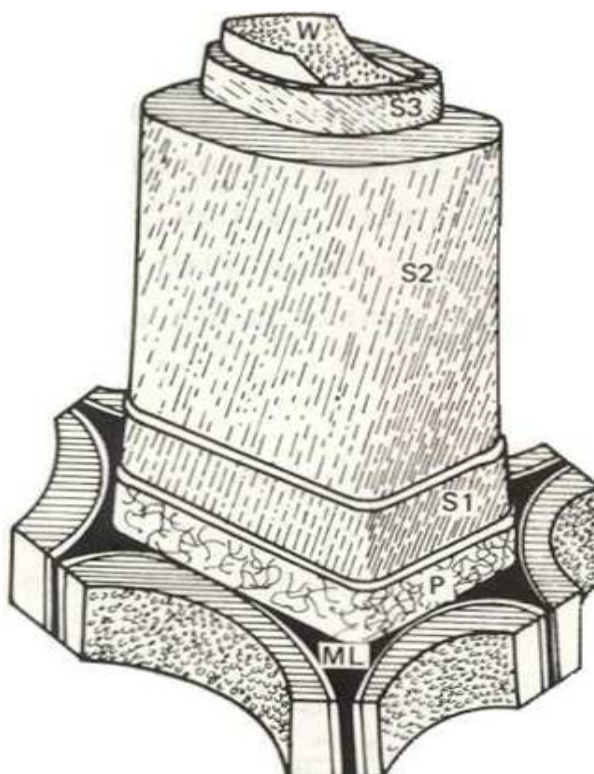


Figura 2. Esquema de uma célula vegetal: lamela média (ML), parede primária (P), parede secundária externa (S1), parede secundária média (S2), parede secundária interna (S3) e lúmen (W). Fonte: Fengel & Wegener (1989).

A parede primária é composta por microfibrilas de celulose, muito fina e geralmente indistinguível da lamela média. A parede secundária é composta de três camadas (S1, S2 e S3) distinguíveis pelos diferentes ângulos das microfibrilas em relação ao eixo da célula. Conforme as paredes celulares são depositadas, o lumen da célula vai progressivamente se estreitando. A primeira camada a ser depositada é a S1, adjacente à parede primária, a segunda camada depositada é a S2, a mais espessa e apresentando baixa porcentagem de lignina e interna à camada S2, está a S3, mais fina e apresenta a menor quantidade de deposição de lignina em relação às demais camadas da parede secundária (Desch & Dinwoodie 1996).

A lamela média é a camada lignificada entre as paredes celulares de duas ou mais células (Desch & Dinwoodie 1996) e essa lignina depositada confere grande resistência à degradação (Obst et al. 1994). Nas angiospermas a degradação ocorre mais rapidamente quando comparadas às gimnospermas, podendo ser explicada pelo efeito de diferentes quantidades e tipos de lignina presentes nessas madeiras, ou seja, à maior concentração de lignina bem como o tipo de lignina, composta por unidades guaiacil consideradas como as mais difíceis de degradar e de unidades sirigil (Obst et al. 1994).

A madeira pode ser definida como um conjunto de células com funções específicas composto por uma rede interconectada de celulose, hemicelulose (65-75%) e lignina (18 – 35%) além de extrativos e alguns compostos inorgânicos. A principal composição de carboidratos da madeira é constituída de polímeros de celulose e hemicelulose, além de pequenas quantidades de outros açúcares como amido e pectina (Desch & Dinwoodie 1996).

A celulose é o principal componente da madeira constituindo cerca de 45% do peso seco da madeira. A unidade de repetição da celulose é a celobiose, um dissacarídeo que vai se repetindo e resulta em um polissacarídeo de alto peso molecular, formado por várias moléculas de glicose unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo β -1,4, formando cadeias lineares que interagem umas com as outras através de pontes de hidrogênio (Figura 3). A estrutura resultante é uma fibrila elementar, insolúvel em água e que apresenta alto grau de cristalinidade. Quatro dessas fibrilas são agrupadas por uma camada de hemicelulose e, posteriormente, circundadas por uma matriz de hemicelulose e lignina que vai resultar na microfibrila celulósica (Carvalho et al., 2009). A celulose possui duas regiões distintas, uma cristalina e outra amorfa, esta sendo mais suscetível à degradação enzimática (Desch & Dinwoodie 1996; Pérez et al. 2002). A celulose confere flexibilidade e resistência à tração (Brazolin. com. pes.).

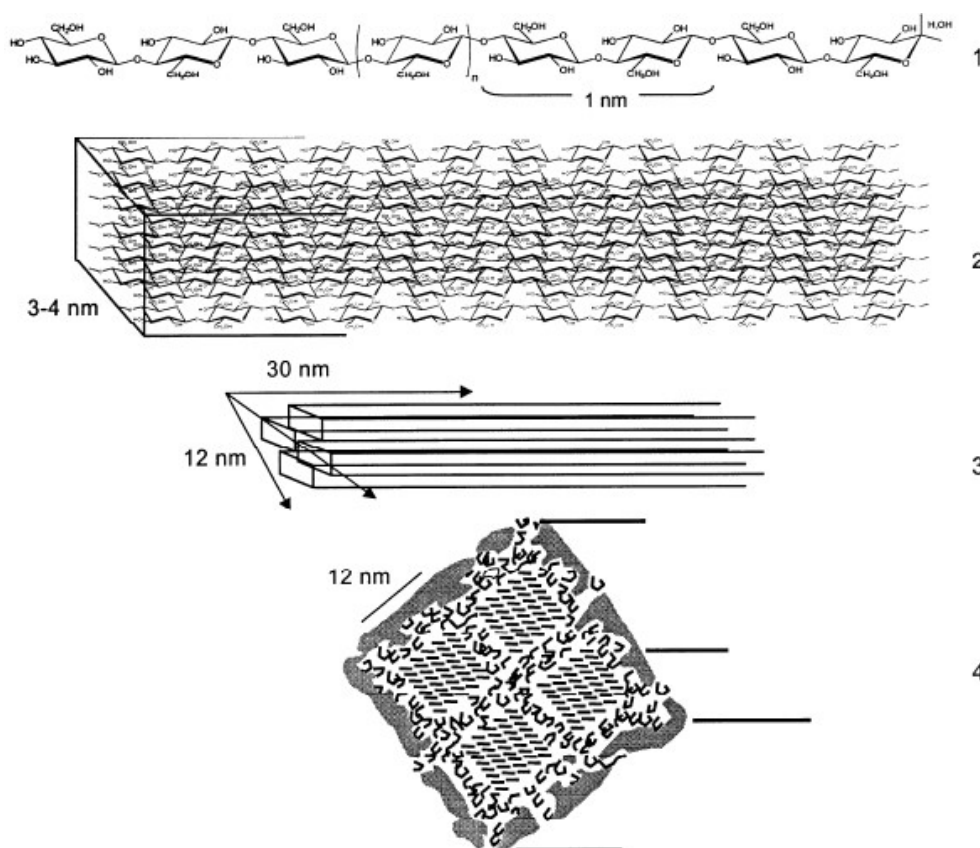


Figura 3. 1. Fragmento de uma molécula de celulose destacando as ligações β -1,4 e a unidade repetidora, a celobiose. 2. Arranjo da cadeia de celulose na fibrila elementar. 3. Celulose cristalina. 4. Corte transversal das microfibrilas de celulose envoltas pela matriz de hemicelulose e lignina. Fonte: Ramos 2003.

As hemiceluloses ou polioses estão intimamente ligadas à celulose e contribuem como componente estrutural da árvore. 25–30% do peso seco da madeira. Sua estrutura é não linear, tendo como açúcares principais pentoses (xilose e arabinose) e/ou hexoses (glicose, galactose e manose), além de outros açúcares (Figura 4). A xilana é o principal constituinte da hemicelulose, sendo constituída por resíduos de xilose unidos por ligações β -1,4 e, ocasionalmente, ligações glicosídicas β -1,3 (Pérez et al. 2002; Polizeli et al. 2005).

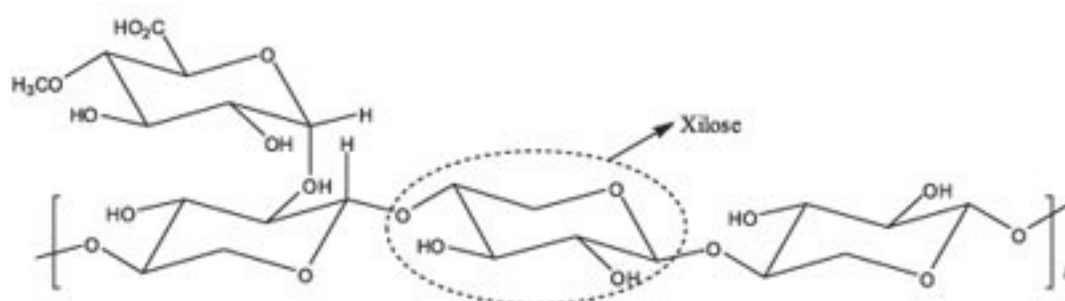


Figura 4. Esquema de um fragmento da molécula de hemicelulose destacando a xilose. Fonte: Santos et al. 2012.

A lignina, juntamente com a celulose, é um dos polímeros mais abundantes na natureza. É um biopolímero amorfo, tridimensional, de alto peso molecular, altamente complexo e insolúvel em água. É composta principalmente pelos monolignóis denominados de álcool coniferílico, sinapílico e cumarílico (Vanholme et al. 2010). Embora seja formada apenas por essas três unidades básicas, a lignina varia muito em diferentes famílias de plantas. Nas angiospermas a lignina é formada por grandes quantidades de unidades siringil enquanto nas gimnospermas predomina o tipo guaiacil (Chen 2014). Devido à sua natureza irregular, não é formada por unidades repetidas como a hemicelulose e celulose (Figura 5). Está presente na parede secundária e em maior concentração na lamela média. Nas angiospermas está presente numa taxa de 18-25%, tendo como funções o aumento da rigidez, conferindo suporte estrutural, diminuição da permeabilidade da parede celular, além de exercer certa proteção contra ataque de microrganismos devido à sua natureza fenólica (Klock & Andrade 2013).

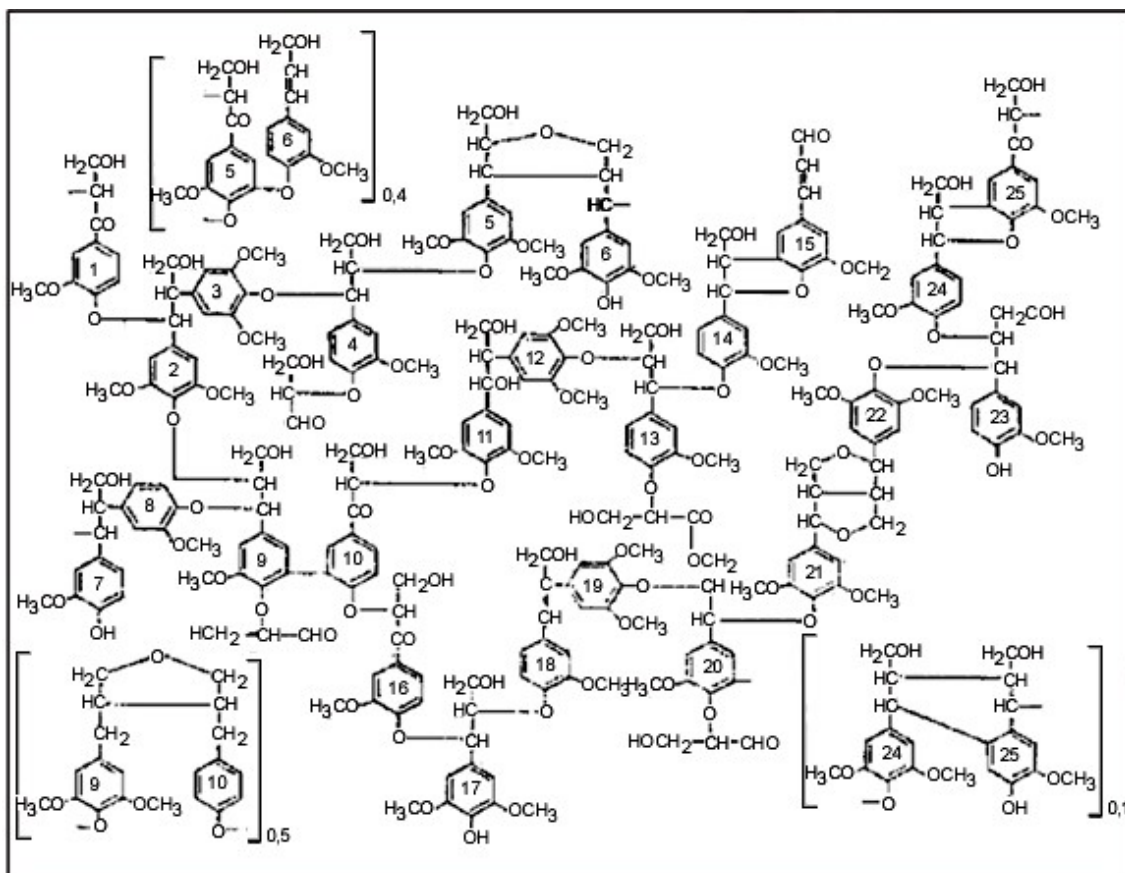


Figura 5. Exemplo de molécula de lignina de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. Fonte: Saliba et al. 2001.

1.2. Caracterização da sibipiruna

Poincianella pluviosa (sibipiruna) pertence às Angiospermas, família Fabaceae, subfamília Caesalpinioideae. Abaixo segue a descrição feita por Tozzi (2016, como *Poincianella pluviosa* (DC.) L.P. Queiroz):

Árvores 5-10m, semicaducifólias, inermes; caule (sub)cilíndrico; ramos tomentosos, tricomas tectores presentes, às vezes também tricomas glandulares, ou glabros. Folhas bipinadas, imparipinadas; pecíolo 1-3,5cm; raque com glândulas estipitadas, avermelhadas, 5-14(-21) cm; pinas (6-)8-11 pares por folha mais uma

terminal, alternas ou opostas, par terminal oposto; foliólulos 19-32 por pina, alternos, sésseis, oblongos a romboidais, ápice obtuso a arredondado, margem plana, ciliada, base obliquamente truncada, coriáceos, faces adaxial e abaxial pubescentes a glabras, 5-11×3-5mm, nervura principal excêntrica. Inflorescência racemo terminal, 30-140 flores por racemo, raramente mais 1-2 racemos secundários basais; pedúnculo e raque da inflorescência 6,5-20cm; brácteas oval-lanceoladas, 2-2,4mm, caducas. Flores 1,5-2cm; pedicelo 8-20mm, articulado a 1,52,5mm abaixo do cálice; cálice campanulado, sépalas oblongo-elípticas a obovais, abaxial cuculada, ápice fimbriado; pétalas amarelo-douradas, pilosas na base, glandulosas, subobovais, obovais a suborbiculares, ápice arredondado, (6-)8-14×(4-)7-12mm, pétala adaxial com manchas ou linhas vermelhas internamente, menor que as demais; estames 10-22mm; ovário pubescente, sésil, levemente curvado, estigma subterminal. Fruto 9-12(16)×2-3,5cm, deiscência elástica, reto, valvas inermes, internamente secas; sementes 4-6, 15-20×12-18mm, ovais a suborbiculares, testa castanho-clara a escura, hilo apical.

Essa mesma autora menciona que a distribuição geográfica ocorre no Brasil (Bahia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, São Paulo), Bolívia, Argentina e Paraguai e que em São Paulo, a espécie está representada apenas por uma das seis variedades descritas por Lewis em 1998.

1.3. Degradação da madeira

Ocorrem três tipos diferentes de podridão da madeira, a marrom ou parda, a mole e a branca (Obst et al. 1994, Schwarze 2007). Na podridão parda a madeira apresenta coloração marrom e um aspecto craquelado cúbico quebrando-se facilmente. Na podridão mole ocorre o amolecimento superficial e escurecimento da madeira, geralmente acompanhada de rachaduras em cruz, formando cavidades em forma de fuso na parede secundária, em cadeias espirais seguindo a orientação das microfibrilas da celulose (Rayner & Boddy 1988, Boddy et al. 2008). Na podridão branca ocorre o branqueamento da madeira, que adquire consistência fibrosa ou esponjosa e pode ser subdividida em dois grupos, no primeiro ocorre a remoção seletiva da lignina, deixando a parede celular relativamente intacta enquanto que no outro grupo ocorre o ataque erosivo com a remoção simultânea da celulose, hemicelulose e lignina da parede celular. O mesmo fungo pode causar os dois tipos de ataque em diferentes regiões da madeira (Arantes 2008, Blanchette 1984).

Neste trabalho será tratada apenas a podridão branca causada pelos fungos de podridão branca *Ganoderma* spp. parasitando sibipirunas (Figura 6).



Figura 6. *Ganoderma* sp. infectando o colo de uma sibipiruna.

Algumas espécies de *Ganoderma* são citadas na literatura como causadores de podridão do cerne do colo da árvore e podem, também, infectar regiões mais elevadas do tronco (Rayner & Boddy 1988, Schwarze & Ferner 2003). A estratégia básica desses fungos é desenvolver-se e causar a degradação do cerne, formado apenas por células mortas e que apresenta uma fase gasosa mais extensiva se comparada ao albúrnio. Esse é o fator determinante para o estabelecimento do fungo. A infecção ocorre pela exposição do cerne por alguma ferida, raiz doente, galho quebrado, injúria mecânica ou causada por algum agente como insetos ou pássaros. A degradação pode ser limitada nas regiões próximas da ferida como resposta do albúrnio à injúria ou à colonização, um processo denominado de compartimentalização que é uma ferramenta de defesa da árvore. A Teoria da Compartimentalização da Degradação nas Árvores (CODIT) criada por Shigo em 1970 explica a limitação da colonização na região da ferida como resposta ativa que os tecidos do albúrnio promovem por meio de barreiras físicas e químicas, com a formação de tilos, gomas ou camadas suberizadas no primeiro caso e alelopatia no segundo caso (Rayner & Boddy, 1988). A interação entre a árvore e o patógeno ocorre geralmente nos tecidos que sofreram injúria e infecção e a árvore forma uma barreira limitando o tecido atacado dos novos tecidos formados pela árvore que crescem ao redor da barreira. Existem casos em que a compartimentalização não tem sucesso, resultando na morte de partes da árvore ou até mesmo de toda a árvore (Shigo 1984).

1.4. O gênero *Ganoderma*

Ganoderma P. Karst. é o maior gênero da família Ganodermataceae Donk (Polyporales, Basidiomycota), sendo cosmopolita e causador de podridão branca na madeira pela decomposição da lignina, celulose e outros polissacarídeos. Cresce em várias espécies de árvores, muitas de importância econômica como palmeiras, seringueiras, pessegueiros entre outras causando grandes danos à produção e, como consequência, grandes prejuízos (Adaskaveg et al. 1993, Ariffin et al. 2000) além de atacar árvores urbanas causando a deterioração das raízes, colo e ou tronco de árvores (Rajchenberg & Robledo 2013, Robles et al. 2011, Terho & Hallaksela 2005, Terho et al. 2007). A forma típica do basidioma e dos basidiosporos coloridos, ovoides, com ápice truncado, parede dupla sendo a interna ornamentada, espessa e geralmente colorida, e a parede externa lisa, fina e hialina (Ryvarden 2004). Existem dois grupos distintos de basidiomas, o do complexo *Ganoderma lucidum*, apresenta superfície abhimenial lacada com coloração variando do amarelado a marrom avermelhado até negra e o outro grupo, do complexo *G. australe-applanatum* com superfície pilear opaca, de coloração marrom a negra. O gênero *Ganoderma* tem 219 espécies descritas sendo que muitas delas são conhecidas somente de uma coleta e uma localidade (Moncalvo, 2000). A grande variabilidade das características macro e microscópicas dos basidiomas tem resultado em grande número de sinônimas e numa taxonomia confusa (Gilbertson & Ryvarden, 1986). Segundo Kirk et al. (2008), o gênero apresenta ampla distribuição, sobretudo em regiões tropicais, abrangendo cerca de 80 espécies, das quais 28 foram mencionadas para o Brasil (Gugliotta et al. 2013).

Descrições baseadas em características que podem variar com as condições ambientais e com o estágio de desenvolvimento quando coletado podem levar a erros na identificação. Por exemplo, quando jovens possuem coloração mais vivas e brilhantes quando comparados a basidiomas mais velhos, expostos a períodos repetidos de sol e chuvas, poeira, ataque de insetos ou com algas crescendo na sua superfície (Moncalvo 2000). Ryvarden (1995) analisou 53 espécimes de *G. lucidum* e chegou à conclusão de que as características macromorfológicas são de pouco valor na identificação de

espécies de *Ganoderma*. Diferentemente, Torres-Torres & Guzmán-Dávalos (2012) consideram que alguns caracteres morfológicos possuem valor taxonômico importante. Alguns estudos envolvendo a análise do genoma e também de isoenzimas de *Ganoderma* foram publicados (Gottlieb et al. 1995, 2000, Gottlieb & Wright 1999, Miller et al. 2000, Pilotti et al. 2000, Smith & Sivasithamparam 2000, Lima Jr. et al. 2014, Zhou et al. 2015, Bolaños 2016). Mesmo com estudos moleculares com genes do DNA ribossômico dos Espaçadores Transcritos Internos (ITS) para determinar regiões apropriadas para discriminar espécies e inferir a segregação taxonômica de *Ganoderma*, o gênero é complexo e composto por várias espécies crípticas, onde as características morfológicas foram insuficientes para separá-las sendo demonstrados oito clados distintos fortemente relacionados com a origem geográfica (Moncalvo et al. 1995, Moncalvo & Buchanan 2008).

Apesar da dificuldade na delimitação de algumas espécies de *Ganoderma*, alguns trabalhos têm contribuído para ampliar o conhecimento da diversidade do gênero no Brasil, sobretudo em áreas de Mata Atlântica e Amazônia (Gomes-Silva et al. 2011, Gugliotta et al. 2011, Torres-Torres et al. 2012), e recentemente, ferramentas moleculares têm subsidiado a identificação de espécies de *Ganoderma* usando principalmente as regiões do ITS, LSU e SSU do DNA extraído de basidiomas ou do micélio na tentativa de elucidar as espécies brasileiras (Lima Jr. et al. 2014).

1.5. Enzimas hidrolíticas e oxidativas que atuam na degradação da parede celular

1.5.1 Celulases

As principais enzimas envolvidas na hidrólise da celulose são as endoglucanases, as exoglucanases e as β -glucosidases (Zhang & Lynd 2004). As endoglucanases iniciam a hidrólise randomicamente das ligações β -1,4-D-glicosídicas no interior da cadeia, principalmente nas regiões amorfas, liberando oligossacarídeos e novas extremidades na cadeia. As exoglucanases são ativas na região amorfa e também na cristalina catalisando a hidrólise de ligações β -1,4-D-glicosídicas na celulose liberando celobiose das extremidades da cadeia clivada. Para a quebra eficiente da glicose, é necessária a ação das β -glucosidases que clivam a celobiose em duas moléculas de glicose (Lynd et al. 2002, Pérez et al. 2002).

Hadda et al. (2015) detectaram a presença de enzimas celulolíticas em culturas de *Ganoderma* spp. por meio de testes qualitativos utilizando como substratos celulose cristalina, papel de filtro e carboximetilcelulose.

1.5.2 Hemicelulases

As xilanas são os principais carboidratos das hemiceluloses ou polioses. As hemiceluloses são degradadas em açúcares monoméricos e ácido acético. As principais enzimas responsáveis pela sua degradação são as endo-1,4- β -xilanase (quebra a xilana em oligossacarídeos) e 1,4- β -xilosidase (age nos oligossacarídeos produzindo xilose). Outras enzimas acessórias são necessárias para a biodegradação da hemicelulose, tais como xilanaesterases, arabinofurosidases e metilglucuronidases que agem sinergisticamente para a hidrólise de xilanas e mananas da madeira (Pérez et al. 2002).

1.5.3 Enzimas oxidativas

As enzimas oxidativas degradam a lignina em monossacarídeos (arabinose, xilose, galactose, frutose e glicose) bem como dissacarídeos de moléculas pequenas que servem como fonte de carbono e energia e incluem lacases, peroxidases dependentes do manganês (MnPs) e lignina-peroxidases (LiPs) (Zhou et al. 2012). É importante ressaltar que nem sempre todas essas enzimas são produzidas ao mesmo tempo. Algumas culturas podem secretar apenas uma ou duas simultaneamente, sendo influenciadas pelo substrato e condições de cultivo (Adaskaveg et al. 1990, D'Souza et al. 1999, Silva et al. 2005).

Songulashvili et al. (2007) avaliaram três culturas de *Ganoderma* dentre outros fungos, crescendo em vários resíduos lignocelulósicos, em cultivo submerso e foi detectada a produção de lacases e MnPs.

Mais recentemente Manavalan et al. (2012) identificaram várias enzimas secretadas por *G. lucidum* cultivado em bagaço de cana, tanto hidrolíticas (exoglucanases, endoglucanases, endo-1,4- β -xilanase) quanto as oxidativas (MnP e lacases).

2. OBJETIVOS

- Identificar as espécies de *Ganoderma* que ocorrem em sibipirunas da arborização urbana do município de São Paulo e seu padrão de decomposição;
- Analisar a degradação de serragem do cerne e do alburno de sibipiruna pelas culturas isoladas dos basidiomas coletados e a atividade de enzimas hidrolíticas e oxidativas;
- Verificar se ocorre compartimentalização no alburno pela presença do *Ganoderma*;
- Avaliar qual a importância da decomposição do fuste e/ou raízes na avaliação do risco potencial da queda dessas sibipirunas.

3. MATERIAL E MÉTODOS GERAL

3.1. Coleta

As coletas de basidiomas de *Ganoderma* spp. foram realizadas em diversas regiões do município de São Paulo que abrangeram várias prefeituras regionais: Butantã, Ipiranga, Jabaquara, Lapa, Moóca, Pinheiros, Vila Mariana e Sé. O período de coleta foi de abril de 2013 a março de 2016.

3.2. Seleção dos espécimes de sibipiruna estudados

A seleção dos espécimes de sibipiruna infectadas por *Ganoderma* spp. foi baseada nas informações repassadas pelos técnicos da prefeitura após vistorias nas árvores dos passeios públicos que apresentavam basidioma desse gênero de fungo, sendo feita a coleta apenas em árvores vivas. Dentre as coletas realizadas, apenas de duas árvores estavam dentro do Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT), na Cidade Universitária da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP e as demais árvores na rua.

3.3. Coleta de *Ganoderma* spp. nas árvores vivas

Após o diagnóstico das árvores, os basidiomas dos fungos foram retirados integralmente das árvores com auxílio de faca, formão e ou martelo quando necessários e acondicionados em sacos de papel devidamente identificados com o local (endereço e número do lote), coletor, data e local de crescimento do *Ganoderma* na árvore. Após as coletas, os fungos foram levados para o Instituto de Botânica de São Paulo, SP, para realizar a descrição macroscópica dos basidiomas (cor, diâmetro, forma, superfície, margem, textura e espessura do píleo, presença/ausência de estipe) levando-se em consideração as recomendações técnicas de Fidalgo & Bononi (1984). Após a coleta, isolamento em meio de cultura Extrato de malte e ágar (MEA) 2% e descrição dos espécimes coletados, os basidiomas foram desidratados em estufa à temperatura de 50°C durante dois dias ou mais, quando necessário, de acordo com o método descrito por Fidalgo & Bononi (1984).

3.4. Isolamento em meio de cultura e manutenção

Logo após as coletas, os fungos foram levados para o Laboratório de Micologia Aplicada do Núcleo de Pesquisa em Micologia do Instituto de Botânica e, na câmara de fluxo laminar, fragmentos de 3-4 mm foram isolados em placas de Petri contendo meio MEA 2% (20,0 g de glicose, 20,0 g de extrato de malte, 1,0 g de peptona e 20,0 g de ágar em 1 litro de água destilada) e mantidos em estufa incubadora a 28°C até a obtenção do crescimento micelial livre de contaminação. Após obtidas as culturas, para cada espécime, foram feitos frascos de penicilina com água destilada estéril (Castellani, 1939) para a manutenção dessas culturas para uso e também para o depósito na Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica (CCIBt).

3.5. Identificação das espécies coletadas

A identificação baseou-se em caracteres macro e micromorfológicos dos basidiomas seguindo as metodologias descritas em Teixeira (1995) e Ryvarden (1991, 2000, 2004). Para a análise das microestruturas, foram feitos cortes à mão livre, com uso de lâmina de metal. Os cortes dos fungos selecionados para análise microscópica

foram colocados em lâminas de vidro, reidratados em uma solução de álcool (70%) e posteriormente acrescentadas uma a duas gotas de solução de hidróxido de potássio (3-5%) para auxiliar a reidratação das microestruturas do fungo e, em seguida, colocada a lamínula sobre os cortes para análises microscópicas. Em casos onde as microestruturas eram muito hialinas, foi utilizada uma solução aquosa de Floxina (1%) para melhor visualização. Para evidenciar a presença de microestruturas amiloides ou dextrinoides, foi utilizado o Reagente de Melzer (Teixeira 1995). A identificação das espécies foi realizada com auxílio da bibliografia pertinente, como os trabalhos de Corner (1983), Gilbertson & Ryvarden (1986), Gottlieb & Wright (1999), Ryvarden (2004), Loguercio-Leite et al. (2005), Gomes-Silva et al. (2011), Gugliotta et al. (2011), Torres-Torres et al. (2012) além de comparações com outros espécimes depositados no Herbário Maria Eneyda P. K. Fidalgo (SP) e os vouchers foram depositados no Herbário SP (Thiers continuously updated).

Para auxiliar na identificação, foi utilizada também a análise molecular na tentativa de chegar ao grupo mais próximo das espécies de *Ganoderma*, visto que o estágio de desenvolvimento de muitos basidiomas coletados não apresentaram as estruturas utilizadas nas chaves de identificação como, por exemplo, ausência de basidiosporos e himênio ainda não formado impossibilitando, desta forma, a identificação da espécie pelos caracteres morfológicos. Para a análise molecular o DNA foi extraído com um tampão de lise misturado com 2% de CTAB, NaCl 1,4 M, Tris-HCl 0,10 M, mercaptoetanol 0,1%, EDTA 20 mM, a 65°C durante pelo menos 2 horas. A amplificação das regiões ITS e LSU foi realizada utilizando a combinação de *primers* ITS1 / ITS4 para ITS e LR0R / LR7 para LSU (White et al. 1990, Hopple & Vilgalys 1999). As reações de PCR para ITS e LSU foram conduzidas em termociclador (C1000 Touch™ Thermal Cycler Bio-Rad). Os produtos da PCR foram visualizados com eletroforese em gel de agarose 1,5%. Os produtos amplificados foram purificados e depois sequenciados nas duas direções (*forward* e *reverse*). Os sequenciamentos foram realizados no Analisador de DNA (Applied Biosystems 3730xl) pela empresa MacroGen Ltd. (Coréia do Sul).

3.6. Coleta dos discos do lenho de sibipiruna

Para a realização da análise do lenho sadio e deteriorado (item 3.13), foram coletados os discos de três árvores selecionadas para remoção, aqui designadas árvores 1, 2 e 3. A árvore 1 encontrava-se localizada dentro do IPT, localizado na Cidade Universitária da Universidade de São Paulo, a árvore 2 foi removida da Rua Ocarina, 52 e a árvore 3 da Rua Cel. José Pires de Andrade, 4178. Os dados fitossanitários destas árvores encontram-se no Anexo A.

3.7. Potencial de degradação de lignina insolúvel e atividade de enzimas hidrolíticas e oxidativas

3.7.1. Preparo do substrato com serragem de cerne

Em frascos Erlenmeyers de 250 ml de capacidade, de boca larga, foram colocados 10,0 g de serragem de cerne (partícula menor que 1,0 mm) seca ao ar e acrescentados 10,0 ml de água destilada e autoclavados a 121°C/1hora. A quantidade de água foi baseada em estudos preliminares. Foi utilizada parte do tronco de uma sibipiruna saudável (sem infecção por fungos, brocas ou cupins) para a obtenção das serragens

para a condução dos experimentos. A remoção dessa árvore saudável fez parte da demanda de trabalho da prefeitura de São Paulo, devidamente justificada e autorizada.

3.7.2. Preparo do substrato com a serragem de alburno

O preparo foi executado conforme item 3.8.1., substituindo a serragem de cerne por serragem de alburno.

3.7.3. Preparo do inóculo e inoculação

As culturas de *Ganoderma* spp. foram crescidas em placas de Petri contendo MEA 2% a 28°C em estufa incubadora para BOD (Solab SL 200/364). Após sete dias de incubação, o micélio colonizou todo o meio de cultura da placa de Petri. Foram retirados 20 discos de 5.0 mm de diâmetro da região mais ativa do micélio e transferidos para frascos Erlenmeyers de 250 ml de capacidade contendo 100 ml de ME 2% (com a mesma formulação MEA, exceto o ágar). Todos os meios de culturas foram esterilizados em autoclave a 121°C/30 minutos. Após 14 dias de incubação a 28°C, o conteúdo dos frascos foi triturado em um liquidificador de laboratório (Waring 38 BL37) por 45 segundos, divididos em 3 ciclos de 15 segundos.

Para cada frasco Erlenmeyer contendo 10,0 g de serragem de cerne ou de alburno, foram colocados 20,0 ml de inóculo líquido e levados para incubadora para BOD a 28°C por 7, 14, 21 e 28 dias, em triplicatas para cada tratamento. O controle do tratamento foi feito com três frascos contendo apenas a serragem de cerne ou de alburno com água destilada, sem adição do inóculo.

3.7.4. Extração enzimática

Após o período de incubação de cada tratamento foram adicionados, em cada frasco Erlenmeyer, 70,0 ml do tampão de extração Acetato de sódio 50 mM, pH 4,8 e agitados manualmente com um bastão de vidro durante 5 minutos. Em seguida, os frascos foram colocados em agitação a 120 rpm durante 1 hora na mesa agitadora Tecnal (TE-140) e filtrados no funil de Büchner (com papel de filtro qualitativo) acoplado ao kitassato, com auxílio de uma bomba de vácuo Quimis (Q 355B) usando papel de filtro qualitativo para separar a serragem do extrato enzimático bruto.

O papel de filtro contendo a serragem foi levado à estufa de secagem a 105° C para realizar a análise de lignina insolúvel (item 3.10).

Uma alíquota de 10,0 ml do extrato enzimático foi tratada com carvão ativado 2% em mesa agitadora por 30 minutos a 121 rpm (Carvalho et al. 2008) e filtrada em membrana (HAGG04700) Millipore para remoção dos compostos aromáticos do extrato, diminuindo a intensidade da sua coloração, possibilitando as análises das enzimas hidrolíticas e oxidativas.

3.7.5. Análises enzimáticas

A metodologia utilizada nas análises enzimáticas está descrita no capítulo 2. Foi avaliada a atividade de enzimas hidrolíticas (xilanases, endoglucanases e exoglucanases) e oxidativas (lacases, peroxidases, peroxidases dependentes do manganês e lignina-peroxidases).

Nos ensaios enzimáticos de xilanases (β ,D-xilanase) (Bailey et al. 1992), endoglucanases (endo-1,4- β -glucanase) e exoglucanases (exo-1,4- β -glucanase) (Arantes, 2008) foram utilizados como substrato xilana de faia (1% p/v), carboximetilcelulose – CMC (0,44% p/v) e celulose microcristalina 1% p/v), respectivamente. Curvas padrões de xilose (Sigma-Aldrich) e glicose (Sigma-Aldrich) foram usadas para calcular a atividade de xilanases, endo e xoglucanases.

A oxidação total do ABTS [ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazol-6-sulfônico)] e as atividades de lacases foram determinadas conforme Machado & Matheus (2006) e a de peroxidases totais conforme Eggert et al. (1996). A atividade de peroxidases dependentes do manganês (MnP) foi avaliada seguindo Kuwahara et al. (1984). A avaliação da atividade de lignina-peroxidases (LiP) foi feita utilizando o Azure B e o álcool veratrílico como substrato, seguindo Arantes (2008) e Tien & Kirk (1984), respectivamente.

3.8. Avaliação do pH inicial e final

O pH inicial e final da serragem foi medido no primeiro e no 28º dia de incubação das amostras, respectivamente.

Para a determinação do pH foram acrescentados 90,0 ml de água destilada em cada frasco Erlenmeyer e submetidos à agitação a 120 rpm durante 30 minutos, deixadas em repouso por 1 hora sendo, em seguida, realizadas as leituras em pHmetro potenciométrico (Matheus et al. 2003).

3.9. Análise de lignina Klason (insolúvel)

Para a análise da lignina insolúvel, foi utilizada a metodologia de Gouveia et al. (2009) conforme descrita no capítulo 2.

3.10. Análise da presença de compostos de baixa massa molar (CBMM)

A análise foi realizada de acordo com Schwyn & Neilands (1987), utilizando o corante Cromo Azurol S (CAS) capaz de complexar-se ao Fe^{3+} . Os detalhes estão descritos no capítulo 2.

3.11. Análise estatística dos ensaios enzimáticos e da degradação de lignina insolúvel

Para análise estatística dos dados de atividade enzimática foram usados os parâmetro de fungo, substrato (serragem de cerne ou de alburno) e tempo de incubação. Os resultados das atividades enzimáticas e da porcentagem de degradação de lignina insolúvel da serragem do cerne e do alburno foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e após verificada a significância estatística ($p < 0,05$), foi usado o Teste de Tukey para a comparação das médias dos tratamentos através do Minitab 17 (vide capítulo 2).

3.12. Análise da degradação do lenho sadio e deteriorado

As amostras da coleta do item 3.7 foram encaminhadas ao IPT, onde foram realizados os exames macro e microscópico dos discos coletados. O seccionamento, a

montagem das lâminas histológicas e a caracterização das propriedades físicas e mecânicas do lenho sadio e deteriorado estão descritas no Capítulo 1.

3.13. Determinação da densidade aparente do lenho

A metodologia para a determinação da densidade aparente e da umidade dos corpos de prova estão descritas no Capítulo 1.

3.14. Determinação da resistência (tensão de ruptura) e rigidez (módulo de elasticidade) à flexão estática

A descrição desses ensaios nos corpos de prova estão no Capítulo 1.

3.15. Análise estatística dos ensaios físicos e mecânicos

A análise de variância de *Kruskall-Wallis* foi utilizada para analisar as propriedades físicas e mecânicas do lenho de sibipiruna sadio e afetado pelo fungo apodrecedor e o teste de *Mann-Whitney* para a comparação das médias dos tratamentos, sendo adotado o nível de significância de 5 %.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO GERAIS

4.1. Coleta, isolamento e identificação

Foram coletados e isolados em MEA (2%) 39 basidiomas de *Ganoderma* em sibipirunas vivas. Algumas culturas contaminaram e não foi possível a sua purificação e outras pararam de crescer ao longo do desenvolvimento do trabalho e, portanto, o prazo da coleta de basidiomas teve que ser ampliado. Foram incluídos no Herbário SP todos os espécimes que deram origem às culturas estudadas e depositadas na Coleção CCIBt e outros espécimes em boas condições de preservação e estudos posteriores (Tabela 1).

Do total de basidiomas coletados, 26 foram na região do colo, 10 no tronco e 3 na raiz. Todos os basidiomas estavam associados a alguma ferida, injúria ou fenda na árvore hospedeira. Desta forma, observa-se que a região de maior injúria é a que fica próxima à área de pisoteio ou de canteiros que muitas vezes estrangulam o colo e as raízes das árvores ou locais onde ocorre a quebra da casca em decorrência de limpeza das calçadas e poda de grama ou de plantas invasoras ao redor da árvore, acarretando em injúrias na casca da árvore expondo, assim, o tecido vivo da árvore que é facilmente uma abertura para infecção de diversos fungos e microrganismos (Shigo 1979). Os basidiomas coletados no tronco estavam associados a feridas provavelmente causadas por podas ou quebras de galhos e também em fenda causada por alguma injúria mecânica.

Das culturas isoladas, onze pararam de crescer em MEA 2% e também em BDA. Cinco culturas contaminaram e mesmo após várias tentativas de purificação, não foi obtido sucesso e foram descartadas. A cultura CCIBt 4171 não foi avaliada porque apresentou crescimento em placa com MEA 2% muito lento em relação às demais.

Não foi possível identificar alguns basidiomas coletados devido à ausência de basidiosporos ou, em alguns casos, ao não desenvolvimento do himênio e, devido à dificuldade de identificar as espécies de *Ganoderma* por meio das características morfológicas do basidioma, o que exigiu a realização de análises moleculares para subsidiar a identificação. Mesmo com essas análises, não foi possível confirmar a identificação de algumas culturas, principalmente pela carência de sequências de espécimes brasileiros devidamente identificadas no GenBank. As culturas CCIBt 4165, CCIBt 4176 e CCIBt 4243 agruparam no Clado E como *G. perzonatum* juntamente com outras culturas brasileiras (Figura 7). As demais culturas estudadas agruparam no Clado A, sendo que as culturas CCIBt 4172, CCIBt 4173, CCIBt 4175, CCIBt 4179, CCIBt 4180, CCIBt 4240 agruparam com *G. tornatum* e *G. australe* que, de acordo com o Mycobank, *G. tornatum* é sinônimo de *G. australe* e, desta forma, foi adotado neste trabalho a identificação dessas culturas como *G. australe*. Além disso, os resultados sugerem que alguns espécimes (CCIBt 4162, CCIBt 4177 e CCIBt 4242) apesar de agrupados no Clado A, e pertencentes ao complexo *Ganoderma australe-applanatum*, estão bem distantes e provavelmente devem ser espécies novas para ciência, sendo necessárias novas coletas para confirmar se representam novas espécies e confirmar sua identidade.

Tabela 1. Exemplos de basidiomas coletados com seus respectivos número de coleta, local de coleta, número de registro no Herbário SP e na Coleção CCIBt quando ocorreu o estabelecimento da linhagem, e local de inserção do basidioma na árvore.

Nº de coleta	Identificação	Local da coleta	Nº SP	Nº CCIBt	Local de infecção do basidioma
04/13	<i>Ganoderma australe</i> (Fr.) Pat.	R. Desembargador Joaquim Celidônio, 50	466478	4160*	No colo
05/13	<i>Ganoderma australe</i>	R. Domingos Leme, 301	466479	-	A 2,20 m de altura
06/13	<i>Ganoderma australe</i>	R. Maria Carolina, 124	466480	4164*	
07/13	<i>Ganoderma australe</i>	R. Mariana Correia, 311	466481	4161*	No colo
09/13	<i>Ganoderma</i> sp.	R. França, 355	466482	-	No colo
10/13	<i>Ganoderma</i> sp.	R. Luxemburgo, 61	466476	4241	No colo e na raiz
14/13	<i>Ganoderma</i> sp.	R. Alemanha, 537	466483	4168*	No tronco (fenda)
19/13	<i>Ganoderma orbiformum</i> (Fr.) Ryvarden	R. Coelho de Carvalho, 500	466484	4169*	No colo
20/13	<i>Ganoderma</i> sp.	R Domingos Fernandes, 154	466485	-	A 1,0 m de altura
21/13	<i>Ganoderma australe</i>	Av. Prof. Alcebiades Delamare, 100	466473	4240	A 0,80 m de altura
22/13	<i>Ganoderma perzonatum</i> Murrill	R. Brás Cardoso, 93	466486	4165	No colo

Tabela 1. Continuação.

24/13	<i>Ganoderma perzonatum</i>	Av. Prof. Alcebiádes Delamare, 100	-	No colo	
27/13	<i>Ganoderma stiptatum</i> (Murrill) Murrill	R. Cel. Alfredo Cabral, 167	-	No colo e a 1,70 m de altura	
28/13	<i>Ganoderma australe</i>	IPT	466477	4166	No colo e no tronco na altura do DAP
32/13	<i>Ganoderma australe</i>	R. Venceslau Flexa, 130	466475	4170	No colo
33/13	<i>Ganoderma</i> sp.	Pç. Antonio Duarte do Amaral, 15	466474	4162	No colo
34/13	<i>Ganoderma australe</i>	R. Grécia, 161	466487	-	No colo
42/13	<i>Ganoderma australe</i>	R. Porto Rico, 81	466488	4171	No colo
46/13	<i>Ganoderma</i> sp.	R. Atlântica, 659	466489	-	No colo
48/13	<i>Ganoderma australe</i>	R. Crasso, 339	466490	4172	No colo
51/13	<i>Ganoderma</i> sp.	IPT	-	No colo	
55/13	<i>Ganoderma australe</i>	Av. Joaquim Eugênio de Lima, 133	466491	4173	Na raiz
56/13	<i>Ganoderma</i> sp.	R. Br. do Amazonas, 500	466492	-	Acima do colo
58/13	<i>Ganoderma</i> sp.	R. Caripurá, 418	-	No colo	
01/14	<i>Ganoderma</i> sp.	R. Tibério, 332	-	No colo e tronco	
04/14	<i>Ganoderma australe</i>	Lgo. do Arouche, 360	466494	4174	No colo

Tabela 1. Continuação.

01/15	<i>Ganoderma australe</i>	R. Ocarina, 52	466495	4175	No colo
02/15	<i>Ganoderma</i> sp.	R. Abagiba, 1101		4242	No colo
03/15	<i>Ganoderma perzonatum</i>	R. Vitor Costa, 183	466496	4176	No colo
04/15	<i>Ganoderma</i> sp.	Av. Cel. José Pires de Andrade, 309	466502	4177	Na raiz
05/15	<i>Ganoderma australe</i>	Av. Cel. José Pires de Andrade, 309	466501	4178	Na região do colo sobre outro <i>Ganoderma</i> podre
06/15	<i>Ganoderma australe</i>	R. Gil Fernandes, 425	466497	4179	A 0,30 m acima do colo
08/15	<i>Ganoderma australe</i>	Av. Dante Pazzanese, 120	466498	4180	No colo
01/16	<i>Ganoderma perzonatum</i>	R. Emílio Mallet, 95	466503	4243	No colo
03/16	<i>Ganoderma australe</i>	R. Tomé de Souza, 329	466499	4174	A 3,00 m de altura no tronco

Obs,: * culturas que contaminaram e não foi possível purificar

- culturas que pararam de crescer *in vitro*

O conjunto de dados concatenados compreendeu 84 terminais representando as principais espécies do *Ganoderma* (Tabela 2). Destes, 13 corresponderam às novas seqüências produzidas neste estudo (Figura 7). Os conjuntos de dados ITS e LSU finais foram posteriormente alinhados utilizando MAFFT v.7 (Katoh & Standley 2013), visualizados e editados em BioEdit (Hall 1999). *Perenniporiella chaqueta* Robledo & Decock foi definida como a raiz da árvore filogenética. A análise filogenética foi realizada no programa MrBayes v.3.2.6 (Ronquist et al. 2012) para inferir árvores filogenéticas de consenso bayesianas. O modelo de substituição de nucleotídeos para ITS e LSU foram TVM + I + G e GTR + I + G, respectivamente. Os modelos foram gerados em jModeltest v.2.1.4 (Darriba et al. 2012).

Tabela 2. Espécies, origens e número de acesso ao GenBank das sequências (ITS e LSU) usadas para análises moleculares.

Espécies	Voucher	Origem	ITS	LSU
<i>Perenniporiella chaqueta</i>	MUCL49759	Argentina	FJ411085	FJ393857
<i>Amauroderma rugosum</i>	THP30		HM480835	AB368061
<i>Amauroderma calcitum</i>	FLOR50931	Brasil	KR816528	KU315207
<i>Amauroderma aurantiacum</i>	FLOR52205	Brasil	KR816510	KU315205
<i>Amauroderma schomburgkii</i>	FLOR39388	Brasil	KR816513	KU315212
<i>Ganoderma australe</i>	FLOR52289	Brasil	KU315203	KU315217
<i>Ganoderma australe</i>	BAFC671		AF255184	
<i>Ganoderma australe</i>	BAFC1544		AF255185	
<i>Ganoderma applanatum</i>	CBS17530	Inglaterra	AF255101	
<i>Ganoderma applanatum</i>	ATCC44053		JQ520161	AY515339
<i>Ganoderma applanatum</i>	Dai8924	China	KU219987	KU220014
<i>Ganoderma applanatum</i>	KUC20121123	Coréia do Sul	KJ668542	KJ668395
<i>Ganoderma applanatum</i>	Cui9511		JN048773	JN048792
<i>Ganoderma chaliceum</i>	URM80547	Brasil	JX310812	JX310826
<i>Ganoderma coffeatum</i>	FLOR50933		KU315204	
<i>Ganoderma cupreum</i>	HMAS130804	China	JX840345	
<i>Ganoderma cupreum</i>	HMAS99399	China	JX840346	
<i>Ganoderma gibbosum</i>	XSD-63		EU326219	
<i>Ganoderma gibbosum</i>	KUT 0805	Japão	AB733121	AB733303
<i>Ganoderma gibbosum</i>	Dai12483		KF494999	KF495009
<i>Ganoderma lucidum</i>	BCRC37043	Taiwan	EU021460	AB368068
<i>Ganoderma lucidum</i>	BCRC36123	Índia	EU021459	
<i>Ganoderma lucidum</i>	Dai9447	China	KJ143914	
<i>Ganoderma lucidum</i>	ATCC46755		JQ520185	
<i>Ganoderma lucidum</i>	BR 4195		KJ143909	
<i>Ganoderma lucidum</i>	Dai11593	Finlândia	JQ781852	
<i>Ganoderma lucidum</i>	HMAS86597	Reino Unido	AY884176	
<i>Ganoderma ligzhi</i>	WD-565		EU021455	
<i>Ganoderma ligzhi</i>	Dai 15799	China	KU219991	KU220019
<i>Ganoderma ligzhi</i>	Dai 15798	China	KU219990	KU220018

Tabela 2. Continuação.

Espécies	Voucher	Origem	ITS	LSU
<i>Ganoderma ligzhi</i>	Cui 9166		KJ143907	
<i>Ganoderma ligzhi</i>	Wu100638	China	JQ781858	
<i>Ganoderma lobatum</i>	BAFC2411	Argentina	AH008103	
<i>Ganoderma lobatum</i>	BAFC2391	Argentina	AF169991	
<i>Ganoderma lobatum</i>	BAFC2454	Argentina	AH008102	
<i>Ganoderma lobatum</i>	BAFC651	Argentina	AH008100	
<i>Ganoderma lobatum</i>	E3795	Tasmânia	AJ608709	
<i>Ganoderma multiplicatum</i>	Dai 12320	China	KU572490	
<i>Ganoderma orbiforme</i>	URM83332	Brasil	JX310813	JX310827
<i>Ganoderma orbiforme</i>	URM83334	Brasil	JX310814	JX310828
<i>Ganoderma orbiforme</i>	URM83335	Brasil	JX310815	JX310829
<i>Ganoderma orbiforme</i>	URM83336	Brasil	JX310816	JX310830
<i>Ganoderma parvulum</i>	URM83339	Brasil	JX310817	JX310831
<i>Ganoderma parvulum</i>	URM83340	Brasil	JX310818	JX310832
<i>Ganoderma parvulum</i>	URM83343	Brasil	JQ618246	JX310810
<i>Ganoderma parvulum</i>	URM83344	Brasil	JX310819	JX310833
<i>Ganoderma perzonatum</i>	SP445992	Brasil	KJ792752	
<i>Ganoderma perzonatum</i>	SP445984	Brasil	KJ792744	
<i>Ganoderma perzonatum</i>	SP445991	Brasil	KJ792751	
<i>Ganoderma perzonatum</i>	SP445990	Brasil	KJ792750	
<i>Ganoderma perzonatum</i>	URM83346	Brasil	JX310823	JX310837
<i>Ganoderma resinaceum</i>	IMSNU32119	USA	JQ520201	
<i>Ganoderma resinaceum</i>	ATCC52416	Argentina	AF094509	
<i>Ganoderma resinaceum</i>	GRT096	Itália	AM906065	
<i>Ganoderma resinaceum</i>	URM83400	Brasil	JX310824	JX310838
<i>Ganoderma sessile</i>	BAFC2373	Argentina	AH008111	
<i>Ganoderma sessile</i>	CBS22036		JQ520201	
<i>Ganoderma sessile</i>	NY 00985711		KJ143918	
<i>Ganoderma sessile</i>	JV 0109/D4J		KF605640	
<i>Ganoderma sinense</i>	Wei5327		KF494998	KF495008
<i>Ganoderma sinense</i>	JFL14081236		KT318604	
<i>Ganoderma stipitatum</i>			KC884264	
<i>Ganoderma subamboinens</i>	ATCC 52420		JQ520205	
<i>Ganoderma subamboinens</i>	GSUB136		DQ425005	
<i>Ganoderma tornatum</i>	BAFC2764	Argentina	AH008105	
<i>Ganoderma tornatum</i>	URM82776	Brasil	JQ514110	JX310800
<i>Ganoderma tornatum</i>	TBG01AM2009	Brasil	JQ514108	JX310808
<i>Ganoderma tornatum</i>	URM83329	Brasil	JQ514100	JX310805
<i>Ganoderma tsugae</i>			DQ206985	AY684163
<i>Ganoderma weberianum</i>	CBS21936	Filipinas	JQ520219	X78783
<i>Ganoderma weberianum</i>	HMAS97365	China	JF915411	

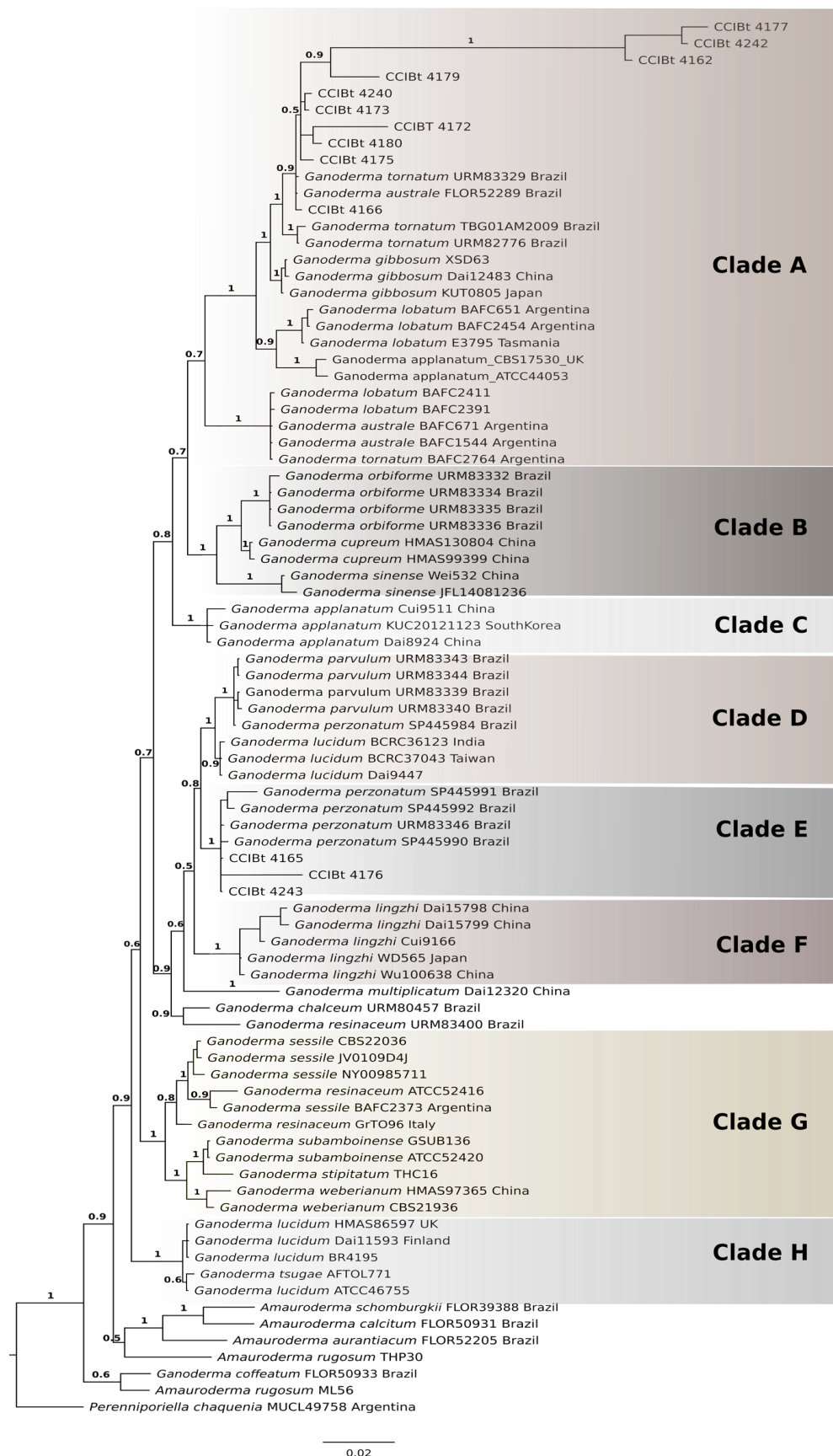


Figura 7. Árvore concatenada das sequências de *Ganoderma* estudadas ou Árvore filogenética das regiões ITS- LSU gerada por análise Bayesiana. Códigos das sequências do Genbank e obtidas neste estudo. As barras indicam número de substituições esperadas por posição.

4.2. Diagnóstico das árvores infectadas pelo *Ganoderma*

Os dados de diâmetro à altura do peito (DAP), altura da árvore e diâmetro da copa dos exemplares arbóreos infectados por *Ganoderma* constam na Tabela 3.

Tabela 3. Dados dendrométricos das árvores onde foram coletados os basidiomas de *Ganoderma* spp.

CCIBt ou N° de coleta	DAP (m)	Altura da árvore (m)	Diâmetro da copa (m)
CCIBt 4162	0,544	18,0	13,0
CCIBt 4166	0,750	13,0	15,0
CCIBt 4170	0,518	11,0	12,0
CCIBt 4172	0,636	13,0	7,0
CCIBt 4174	0,668	12,0	10,0
CCIBt 4175	0,490	9,0	9,8
CCIBt 4177	0,455	8,0	8,0
CCIBt 4178	0,484	8,0	8,0
CCIBt 4179	0,255	12,0	8,0
CCIBt 4180	0,541	13,0	10,0
CCIBt 4240	0,604	13,0	12,5
CCIBt 4241	0,875	13,0	15,0
CCIBt 4242	0,510	12,0	10,0
CCIBt 4243	0,541	11,0	10,0
N° coleta 04.13	0,671	15,0	18,0
N° coleta 05.13	0,397	16,0	12,8
N° coleta 07.13	0,410	12,0	14,0
N° coleta 09.13	0,413	13,0	3,0
N° coleta 34.13	0,572	12,0	14,0
N° coleta 20.13	0,471	8,0	9,0
N° coleta 04.14	0,451	10,0	9,5
N° coleta 06.13	0,550	12,5	10,0
N° coleta 14.13	0,741	14,0	12,0
N° coleta 19.13	0,541	12,0	6,0
N° coleta 24.13	0,604	13,0	12,5
N° coleta 27.13	0,512	12,0	9,0
N° coleta 46.13	0,366	10,0	10,0
N° coleta 56.13	0,413	18,0	12,0
N° coleta 58.13	0,500	10,0	8,0
N° coleta 01.14	0,579	12,0	14,0
N° coleta 07.15	0,223	12,0	8,5

O DAP das sibipirunas nas quais foram coletados os basidiomas variaram de 0,223 a 0,875 m, a altura dos exemplares variou entre 8,0 a 20,0 m e o diâmetro da copa entre 3,0 a 15,0 m. O DAP das árvores que tiveram recomendação de remoção pelos técnicos da prefeitura do município de São Paulo variou de 0,484 a 0,75 m, não sendo possível afirmar que nas árvores de maior DAP a ocorrência de falha mecânica é maior.

No Anexo A estão os laudos fitossanitários dos exemplares arbóreos removidos que foram analisados quanto à degradação do lenho.

4.3. Análise da degradação do lenho sadio e deteriorado

Os resultados das análises das lâminas histológicas e a caracterização das propriedades físicas e mecânicas do lenho sadio e deteriorado estão demonstrados no capítulo 1.

4.4. Determinação da densidade aparente do lenho

Os resultados da determinação da densidade aparente e da umidade dos corpos de prova estão descritos no Capítulo 1.

4.5. Determinação da resistência (tensão de ruptura) e rigidez (módulo de elasticidade) à flexão estática

Os resultados desses ensaios nos corpos de prova estão descritos no Capítulo 1.

4.6. Ensaios enzimáticos

Os resultados dos ensaios enzimáticos estão demonstrados no capítulo 2.

4.7. Degradação de lignina Klason (insolúvel)

Os resultados da degradação da serragem do cerne e do alburno estão demonstrados no capítulo 2.

4.8. Avaliação do pH inicial e final

As médias das triplicatas do pH final, após 28 dias de incubação, das culturas incubadas na serragem de cerne e alburno encontram-se na Tabela 4. A média da triplicata do pH inicial do cerne foi de 4,29 e o do alburno 4,01, valores que se encontram dentro da faixa de pH citada para Leguminosae (entre 3,65 – 6,1%) por Rayner & Boddy (1988). Conforme dados da Tabela 4, todos os valores de pH final diminuíram em relação ao pH inicial do cerne e do alburno. A maior diminuição do pH ocorreu na linhagem CCIBt 4240 na serragem do cerne e da CCIBt 4180 na serragem do alburno.

Tabela 4. Valores da média das triplicatas do pH final das culturas incubadas na serragem do cerne e do alburno.

CCIBt	pH final cerne	pH final alburno
4162	4,03	3,96
4166	3,98	3,83
4170	4,08	3,86
4172	4,18	3,73
4174	4,16	3,66
4175	3,85	3,66
4177	3,94	3,79
4178	3,92	3,69
4179	4,08	3,93
4180	4,10	3,97
4240	4,24	3,74
4241	3,98	3,88
4242	4,15	3,79
4243	3,66	3,43

Essa diminuição pode ser explicada devido à liberação de ácidos orgânicos no substrato em decorrência do metabolismo do fungo (Makela et al. 2002, Milagres et al. 2002).

4.9. Artigos

A seguir são apresentados dois capítulos referentes aos artigos publicados ou a serem publicados. Os artigos apresentados são:

Capítulo 1. *Poincianella pluviosa* (DC) L.P. Queiroz trees deteriorated by *Ganoderma australe* (submetido para a International Biodeterioration & Biodegradation em 18/01/2017).

Capítulo 2. Hydrolytic and oxidative enzymes production and insoluble lignin degradation by parasitic *Ganoderma* spp. in urban trees. (artigo formatado de acordo com o Periódico *Fungal Biology*, para o qual será submetido posteriormente).

Capítulo 1. *Poincianella pluviosa* (DC) L.P. Queiroz trees deteriorated by *Ganoderma australe*

Luci Kimie Okino^{1*}, Ricardo Gomes de Freitas Nuno de B, Pereira², Sérgio Brazolin², Takashi Yojo², Cassiano Oliveira de Souza², Adriana de Mello Gugliotta¹

¹Instituto de Botânica, Av. Miguel Stéfano, 3687, 04301-012, São Paulo, SP, Brazil.

²Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo, Av. Prof. Almeida Prado 532, Cidade Universitária, 05508-901, São Paulo, SP, Brazil.

*Corresponding author: lucikimieokino@gmail.com

ABSTRACT

Sibipiruna (*Poincianella pluviosa* (DC) L.P. Queiroz) trees are common in the São Paulo city urban forest, but may cause accidents when deteriorated by wood-decaying fungi, due to wood rupture and tree fall. Therefore, we aimed to evaluate anatomical, physical, and mechanical changes in sibipiruna wood attacked by *Ganoderma australe*. Three adult trees with basidiomata of these fungi and at imminent fall risk were macro and microscopically analyzed for wood biodeterioration and resistance mechanisms (compartmentalization). Physical and mechanical tests (specific gravity and bending strength) were performed. Decay occurred in the heartwood, being more intense near the pith than in adult wood; and more extensive at the stem base, from where basidiomata were collected. Fungi were classified as white pocket rot and simultaneous rot, i.e. non-selective to cell wall components, causing erosion of the S₂ layer from the cell lumen. Decaying wood was also attacked by xylophagous insects, like the subterranean termite *Coptotermes gestroi*, and wood-boring beetles. Wood compartmentalization was characterized by accumulation of extractives. White rot caused significant reductions in specific gravity, modulus of rupture and modulus of elasticity, which justify the rupture of trees when subjected to external forces, such as strong winds.

Keywords: wood decay; simultaneous rot; white rot; xylophagous; mechanical properties; destructive behavior.

1. Introduction

The role of decay fungi in nature is to transform large amounts of wood, frequently with interaction with other microorganisms. However, the attack of urban trees by fungi is a problem related to the safety of city inhabitants, as the deterioration of wood, branches or roots may result in mechanical failures on the plant body (Schwarze 2007). One of the items evaluated during tree inspection (or Visual Tree Analysis) is the presence of decaying fungi on the roots or stem. These fungi degrade wood cells and may cause three types of decay: white rot, brown rot, and soft rot. White rot is caused by basidiomycetes that degrade cellulose, hemicellulose and lignin; it can be erosive, when fungi degrade all those three components, or non-erosive, when fungi degrade only hemicellulose and lignin, thus preserving cellulose, in which case the wood exhibits a whitish aspect due to the absence of lignin. Brown rot is caused by basidiomycetes or ascomycetes that degrade wood carbohydrates (cellulose and hemicellulose). Soft rot is caused by mitosporic fungi that can slowly degrade not only those carbohydrates but also lignin, yet usually causing no extensive damage to the

wood of living tress (Obst et al. 1994, Schwarze 2007, Brazolin 2009, Pest Notes 2011). Species of *Ganoderma* P. Karst. (Polyporales, Basidiomycota) cause white rot (Brazolin 2009, Terho 2009) and as they infect urban trees they promote root and stem deterioration.

On the other hand, upon an attack, trees initiate a compartmentalization process to defend themselves from pathogen spread (Rayner and Boddy 1988). This active process begins with the formation of a chemical reaction zone, through the production of toxic substances by sapwood parenchymatous cells and of a physical barrier (growth layer) by the cambium, which isolates the injured tissues (Shigo 1984, Seitz 1996, Shortle and Dudzik 2012). One technique to assess wood decay is strength and modulus of elasticity loss (Yu et al., 2011).

Biodeterioration processes inflicted by *Ganoderma* spp. to the wood of sibipiruna species remain unknown. Thus, evaluating the behavior of these fungi may aid in understanding the damage and the consequent risk of wood rupture they cause, mainly to urban trees. In that sense, we aimed to: a) evaluate the macro and microscopic patterns of deterioration by fungi *Ganoderma australe* (Fr.) Pat. b) verify the mechanism of resistance of the sibipiruna tree to the biodeterioration process; and c) characterize the physical and mechanical properties of healthy and fungi-deteriorated woods.

2. Material and methods

2.1. Tree samples

Three adults specimens of *Poincianella pluviosa* (DC) L.P. Queiroz. commonly known as sibipiruna, were evaluated. The trees contained basidiomata of *G. australe* and were at fall risk, with possible stem rupture. During tree removal, serial disks were obtained from the tree base to BHD (Breast Height Diameter) for the analysis of macro and microscopic characteristics of sound and deteriorated woods as well as their physical and mechanical properties. The trees were situated on São Paulo city, Brazil. Tree 1 was located on the inner area of the São Paulo State Institute for Technological Research, under park conditions; while trees 2 and 3 were on public sidewalks of the city.

2.2. Analysis of sound and deteriorated woods

The anatomical structure of sound and deteriorated woods of sibipiruna trees infected by *G. australe* and its mechanism of resistance against these xylophagous organisms were characterized through macro and microscopic examination.

For macroscopic analysis, the transverse surfaces of wood samples were polished in a sanding machine for better visualization of the heartwood and sapwood regions, the site and extension of fungal attack, the presence of termites and wood-boring insects, the type of deterioration and the occurrence of resistance mechanisms. These analysis were conducted using a 10 x magnifying glass and a stereoscopic microscope.

Microscopic analysis was performed using wood histological sections, under light microscopy (DM4000B, Leica). To process the wood of sibipiruna trees infected by *Ganoderma australe*, it was used the method developed by Barbosa et al. (2010), as described below:

Sectioning: wood samples were affixed to a sliding microtome (Reichert) and histological sections (23 µm thick) were obtained with a type-C steel knife on all three plans (transverse, longitudinal-radial, and longitudinal-tangential). To maintain integrity

of sections from intensely decayed wood samples, it was applied a thin layer of polyvinyl chloride (PVC) resin diluted in butyl acetate (1:1, V/V) on the sample surface and the wood samples were then sectioned after solvent evaporation. Prior to sectioning, an adhesive tape was applied to the surface of samples to maintain the integrity of their structure and facilitate their handling.

Histological glass slide mounting: sections were: a) stained with 1% aqueous picro-aniline (picric acid:methyl blue, 4:1, V/V) and briefly heated without boiling; b) washed in distilled water for removal of excess stain; c) stained with 1% aqueous safranin (1–2 min); d) washed in distilled water; e) dehydrated in an ethyl series (30, 50, 70, and 100%); f) placed on histological glass slides with a thin layer of Canada balsam and dripped with butyl acetate for coverslip mounting; and g) dried for seven days, with the aid of metal weights placed atop coverslips. Safranin and picro-aniline were used to stain, respectively: wood anatomical structures; and the presence of fungal hyphae and spores.

2.3. Characterization of the physical and mechanical properties of sound and deteriorated woods

Sound and deteriorated wood patterns of the sibipiruna trees were defined based on macro and microscopic analysis of the wood and some physical properties. These patterns were characterized for their specific gravity and bending strength using specimens (4 mm x 4 mm x 75 mm) acclimatized under controlled temperature and humidity ($20 \pm 3^\circ\text{C}$ and $65 \pm 5\%$, respectively), until 12% of moisture content.

The specimens specific gravity (kg m^{-3}) determination was based on the ASTM D2395 standard (ASTM 2014). Their volume were obtained by directly measuring of their dimensions (length, width, and height) with a caliper (0.01 mm precision).

Each specimens were evaluated for their resistance (modulus of rupture) and rigidity (modulus of elasticity) in static bending parallel to fibers, with a radially applied force, following the NBR 7190 standard (ABNT 1997). In the static scheme, the specimens were supported on a free vain (70 mm) in a universal machine (model K500SMP, Kratos). A force was applied to their center (Figure 1) and the deflection and force were simultaneously recorded for determination of the maximum value of modulus of rupture (MPa) and the modulus of elasticity (MPa). The failure model (fracture) of deteriorated samples was evaluated following Bodig and Jayne (1992), as illustrated in Figure 2.

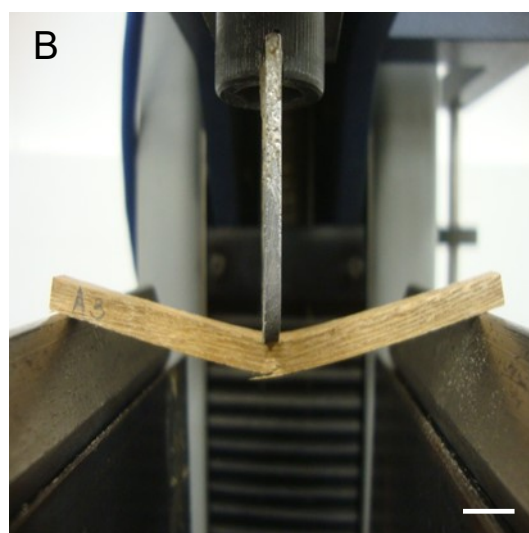
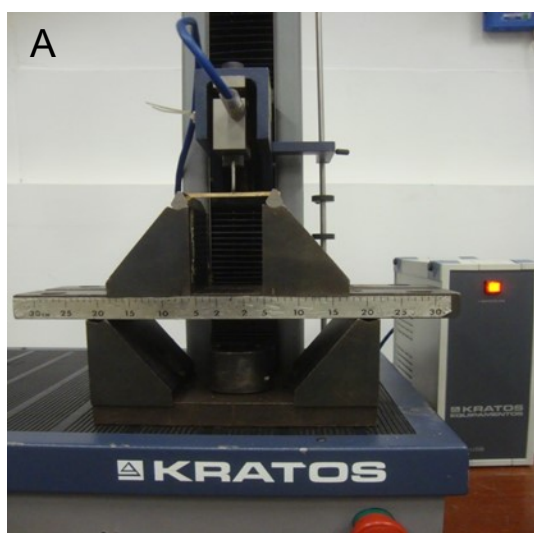


Figure 1. Static bending assay on the sibipiruna wood in a universal machine (A); and the specimens ruptured during the assay (B) (scale = 1 cm).

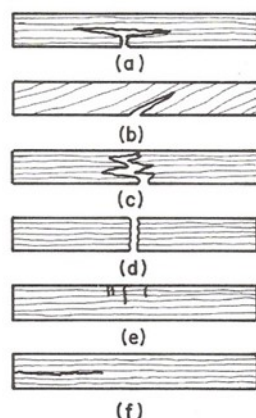


Figure 2. Failure model in static bending: (a) simple tension, (b) cross-grain tension, (c) splitting tension, (d) brash tension, (e) compression, (f) horizontal shear. Source: Bodig and Jayne (1992, p. 305).

Statistical analysis: Kruskal-Wallis' analysis of variance was used in the analyses of physical and mechanical properties of sound and deteriorated sibipiruna woods and Mann-Whitney's test to compare treatment means at the 5% significance level.

3. Results and discussion

Ganoderma australe fungus caused white rot in the sibipiruna wood. *Ganoderma* species are known for such type of wood decay, as they possess an enzymatic system capable of degrading plant cell wall constituents, being cellulose, hemicellulose and lignin (Rayner and Boddy 1988, Eaton and Hale 1993, Tomazello-Filho et al. 2008, Brazolin 2009).

3.1. Macro- and microscopic analysis of sound and deteriorated woods

Macroscopic analysis of sound sibipiruna wood showed that the heartwood is distinct from its sapwood by its color, the first being dark due to the deposition of extractives and the latter light-cream-colored (Figure 3A).

The analysis of tree disks showed that fungal attack was more intense at the stem base, where basidioma are usually formed and decreased with increasing stem height (Figures 3B and C). On tree 2, the deterioration extended to the root system, further compromising the structural stability of the tree (Figure 3D).

White-rotten-wood was clearer and softer than healthy one. Degradation by white rot fungi was observed in the heartwood, more intensely on the region near the pith or juvenile wood, progressing toward mature wood (Figure 3E-F). In the less-affected heartwood region (mature wood), the pockets white rot was observed, i.e., in small decayed areas interspersed with sound tissue (Figure 3G). Such fungal colonization strategy has been denominated by Rayner and Boddy (1988) as "heartwood rot". According to Farmer (1967 apud Oliveira et al. 1986), the difference in the natural durability of tree wood in the radial direction can be explained. among other factors, by the gradual conversion of extractives into less toxic compounds as the tree gets older. A mycelial mass was observed in the pith region (Figure 3H) and in inner cracks of the

wood, evidencing intense fungal growth. These fungi do not affect tree vigor, as they develop on physiologically inactive wood (heartwood).

Colonization by white rot fungi in the sibipiruna wood occurred predominantly through vessels and cells of the radial and axial parenchyma (Figure 4A-B). The same was observed by Bari et al. (2015c) in *Fagus orientalis* wood, the accumulation of white-rot fungi hyphae in vessels and penetrating the neighbouring fibers to degrade them completely.

The wood decay observed in sibipiruna trees was characterized as simultaneous white rot (Figure 4C-D), i.e., non-selective to cell wall components (lignin, cellulose, and hemicellulose). Degradation of such components occurred in the proximities of the hyphae located in the cell lumen, from the S₃ layer of the cell wall, resulting in erosion of the S₂ layer of fibers, as also observed by Anagnost (1998), Schwarze (2007), Brazolin (2009), Bari et al. (2015a,b,c,d) and Karim et al. (2016).

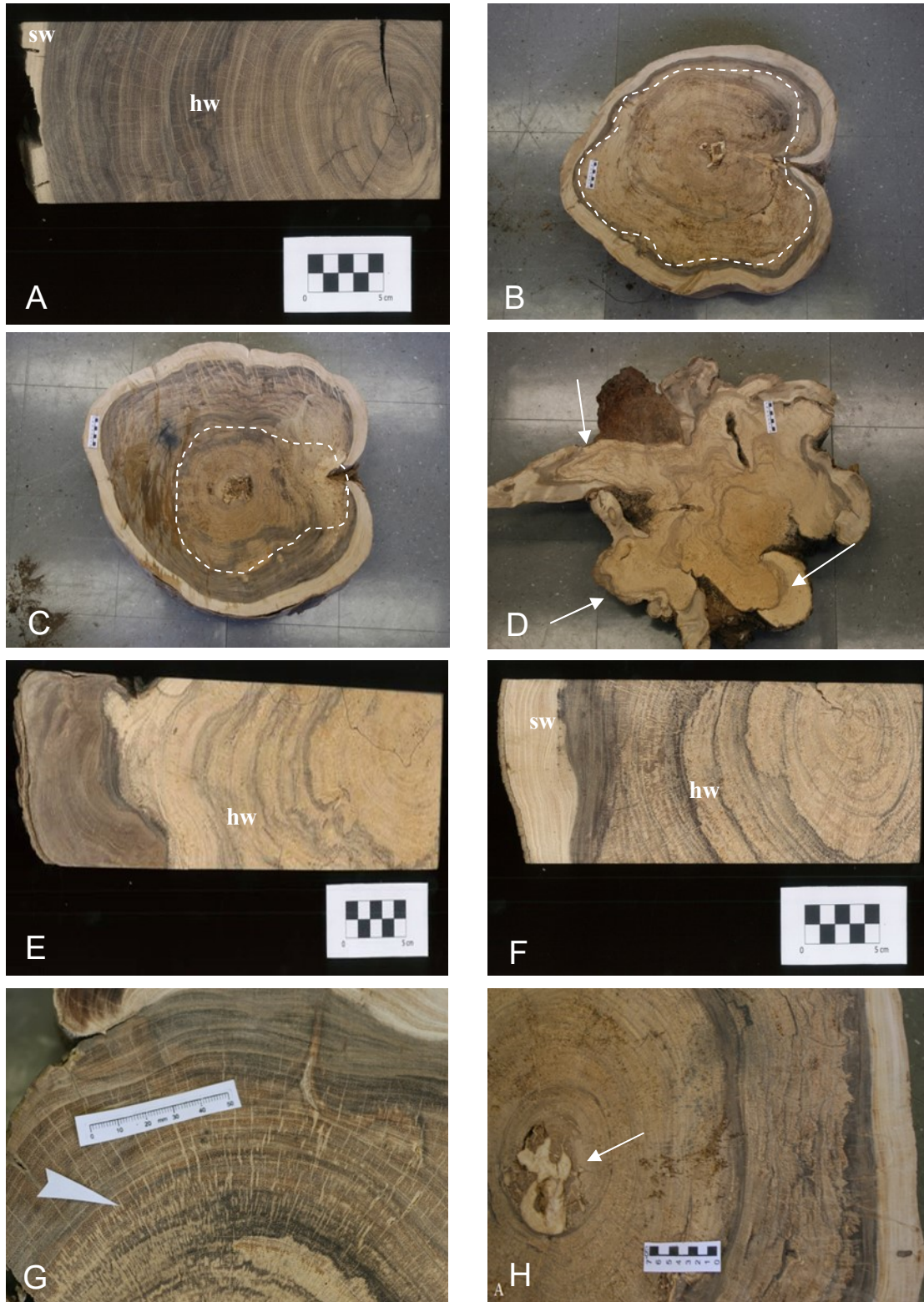


Figure 3. Macroscopic characterization of the sibipiruna wood deteriorated by *G. australe*. Heartwood (hw) and sapwood (sw) of the sound wood on tree 1 (A). Larger extension of the white rot (dashed line) at the stem base (B) and lower extension at BHD (C) on tree 1. Intense decay (D) of roots (arrows), as seen on the lower surface of a disk from tree 2. White rot in the heartwood of trees 2 (E) and 3 (F), with a higher intensity on the region near the pith (juvenile wood). White rot (G) in pockets (arrow) on the mature wood of tree 2. Mycelial mass (H) on the pith region (arrow) of tree 2.

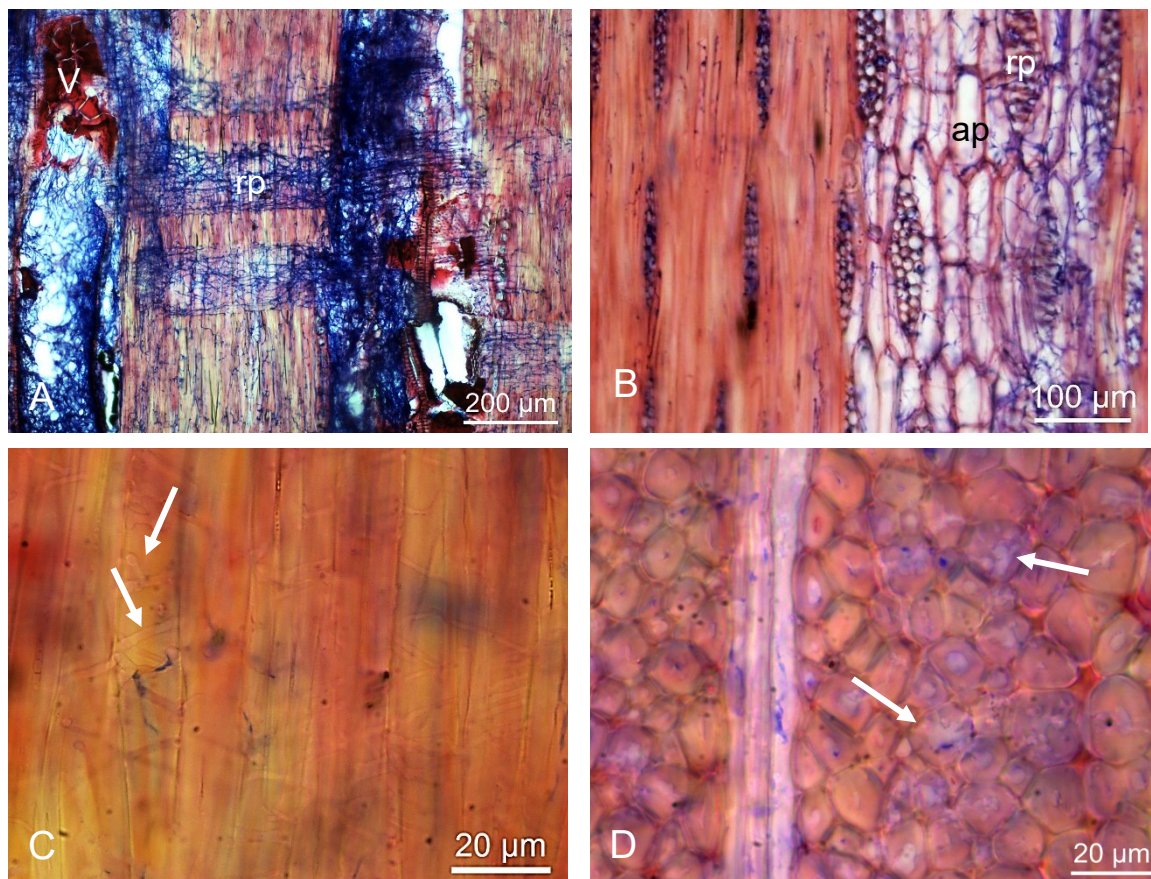


Figure 4. Microscopic characterization of the sibiruna wood deteriorated by *G. australe*. Radial (A) and tangential (B) longitudinal sections with hyphae (in blue) intensely colonizing vessels (V) and cells of the radial (rp) and axial (ap) parenchyma. Tangential longitudinal section (C) and transverse section (D) showing erosion (arrows) of the cell wall of fibers, which is characteristic of the simultaneous white rot.

Deterioration of the sibiruna wood occurred markedly on fibers (Figure 5A-B) and ultimately led to xylem rupture. At advanced stages (Figure 5C-D), complete degradation of fiber cell wall was observed, leaving only the middle lamella undamaged; yet the walls of parenchyma and vessel elements also remained intact. Selective attack of anatomical elements by white-rot fungi was also observed by Anagnost (1998), Tomazello-Filho et al. (2008) and Brazolin (2009) in other plant species and can be explained by lignin composition variation among different cell types. For instance, the walls of vessel elements are formed by guaiacyl-type lignin, while the walls of fibers are formed by the syringyl-type lignin; the walls of radial and axial parenchyma cells, on the other hand, are formed by a combination of guaiacyl and syringyl-type lignin (Schwarze 2007). Therefore, the higher resistance of walls of vessels elements and parenchyma cells is associated with a higher amount of guaiacyl-type lignin (Schwarze 2007).

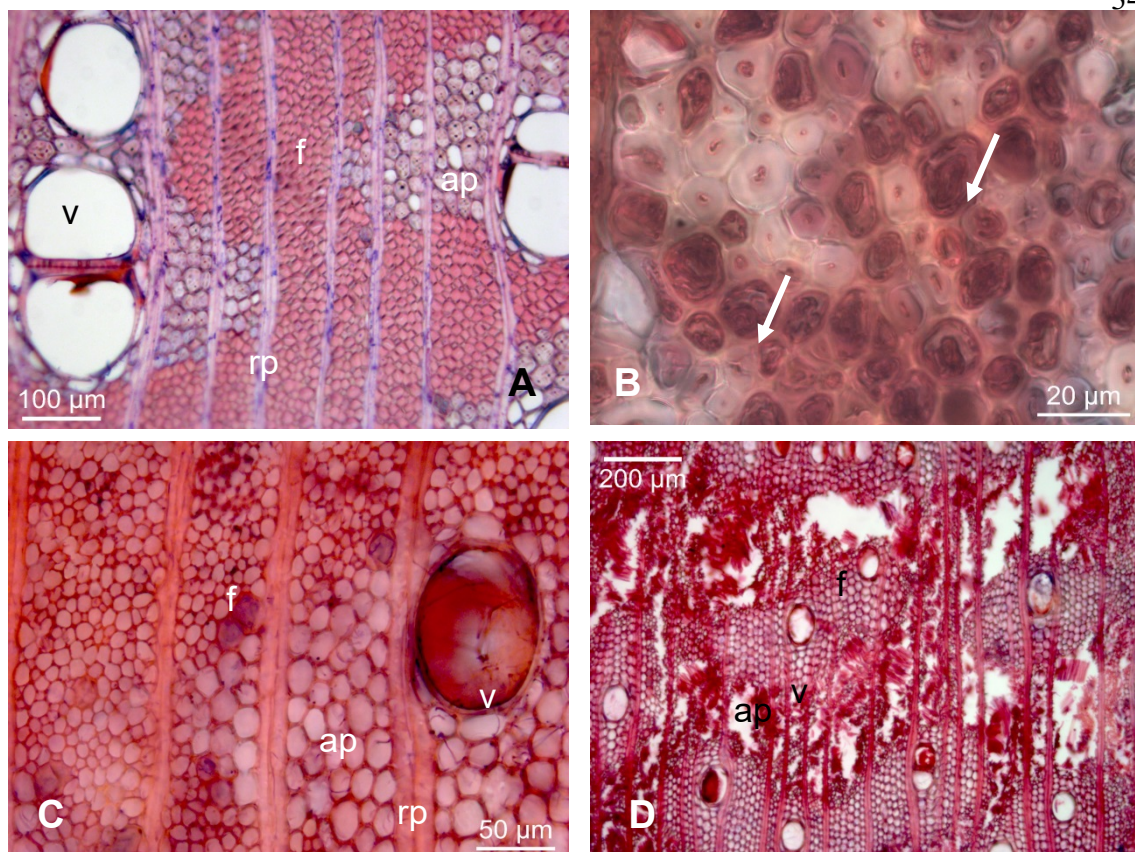


Figure 5. Microscopic characterization of the sibipiruna wood deteriorated by *G. australe*. Transverse section of sound wood (A). Transverse section of wood at advanced deterioration stage (B, C, and D), with degradation of S₂ layers of fiber (f) cell walls, yet with intact middle lamellae and preserved cells on the radial (rp) and axial (ap) parenchyma.

Consolidation and compartmentalization of fungal attack in the sibipiruna wood was evidenced by thin, dark, irregular lines resulting from the formation of a pseudosclerotial structure, with branched, melanized, thick-walled hyphae in the lumen of fibers, vessels, and cells of the axial and radial parenchyma (Figure 6A-B). Such lines are characteristic of white rot fungi (Rayner and Boddy 1988, Brazolin 2009).

The occurrence of the subterranean termite *Coptotermes gestroi* (Wasmann) and of wood-boring beetles (Order Coleoptera) was observed in the decayed wood of trees 3 and 1 (Figure 6C-D), respectively. According to Brazolin (2011), there is an association between xylophagous insects and decayed wood infected by *Ganoderma* spp. The partial digestion of wood by fungi promotes the interaction with mentioned insects, due to the difficult digestion of cellulose and lignin by termites and to the capacity of fungi to detoxify repellent or toxic substances in the wood (Sands 1969, Grassé 1982).

In decayed wood colonized by *G. australe*, lines or reaction zones (Figure 6E-F) were observed as a mechanism of resistance by the tree in response to the biodeterioration process promoted by the fungi, termites and wood-boring insects. The microscopic analysis revealed an accumulation of extractives in the lumen of anatomical elements of the sibipiruna wood, such as vessels, fibers, and cells of the radial and axial parenchyma (Figure 6G-H). This mechanism is known as compartmentalization and is characterized by the accumulation of extractives that are usually not produced by the tree in a sound heartwood (Hillis 1962, Manion and Zabel 1979, Shigo 1979, 1984, Brazolin 2009).

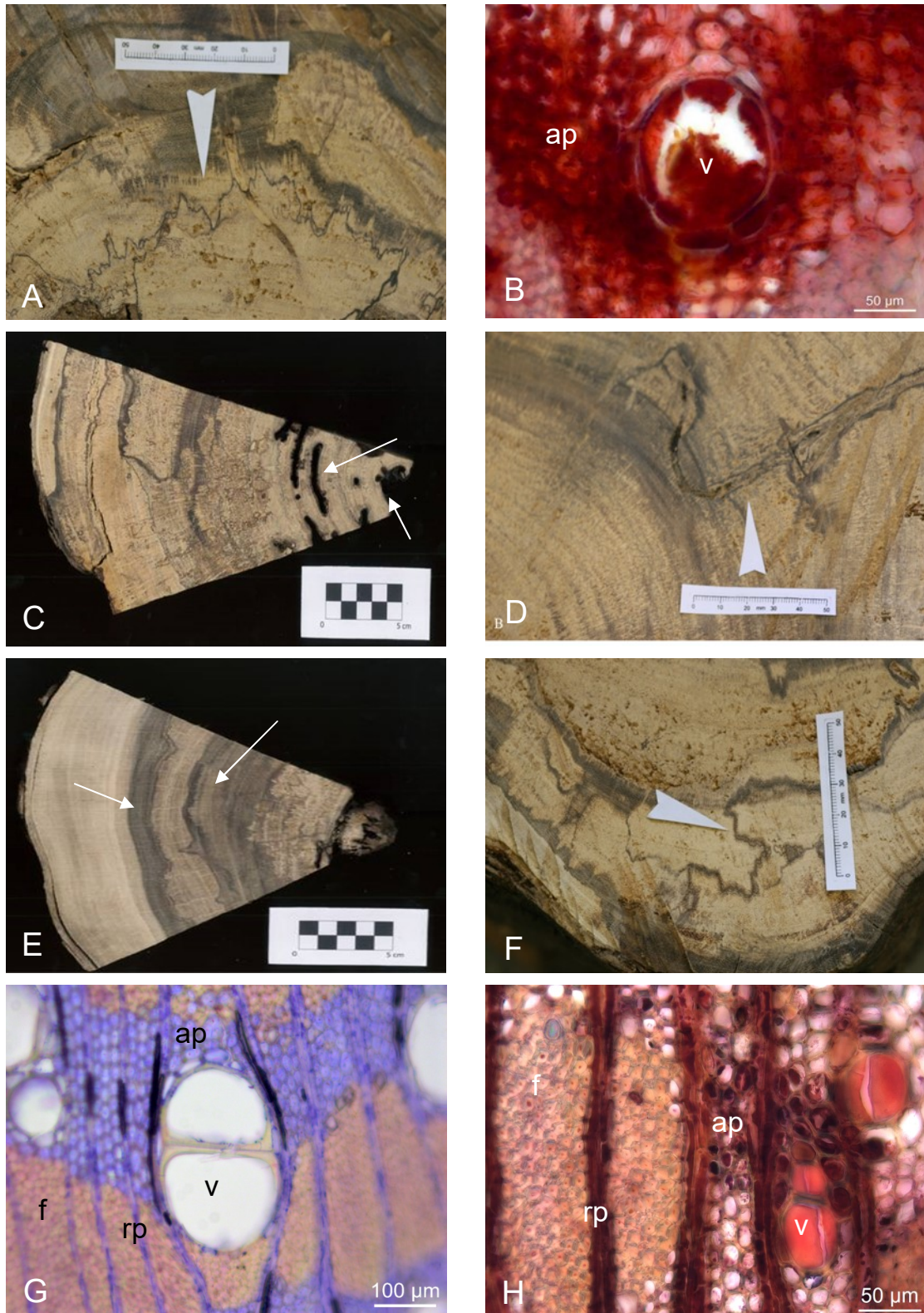


Figure 6. Macro and microscopic characterization of the sibipiruna wood deteriorated by *G. australe*. Fungal compartmentalization line (A) on tree 3 and histological transverse section of the pseudosclerotial plate (B) in the lumen of axial parenchyma (ap) and vessel elements (v), Galleries (arrows) of *Coptotermes gestroi* in the intensely decayed heartwood (C) of tree 3. Gallery (arrow) of a wood-boring beetle (D) in the decayed heartwood of tree 1. Wood compartmentalization (arrows), with formation of zones (E) or lines (F) of reaction due to accumulation of extractives. Transverse section

of a wood without (G) and with accumulation of extractives (H) in the lumen of vessel elements (v), fibers (f), and cells of the radial (rp) and axial (ap) parenchyma.

3.2. Characterization of the physical and mechanical properties of sound and deteriorated wood by *G. australe*

Based on macro and microscopic analyses, four patterns of sound and deteriorated wood by *G. australe* were defined: sound sapwood (**SS**) – light-cream-colored wood with no sign of fungal attack (Figure 3A); heartwood with accumulation of extractives (**EX**) – dark-brown- or black-colored healthy heartwood of irregular shape and size, delimitating sound wood from decayed one (Figure 6E); heartwood with white pocket rot (**WPR**) – small decayed regions interspersed with sound areas (Figure 3G); and heartwood with intense white rot (**IWR**) – whitish wood showing a spongy aspect and perceptible by touch loss of mechanical resistance (Figure 3E).

The wood patterns showed significant differences in their specific gravity (Table 1). It was observed the highest mean values in the heartwood with accumulation of extractives (EX) and decreasing values in wood regions with white rot (WPR and IWR).

Table 1. Physico-mechanical properties of sibipiruna wood patterns: sound and deteriorated wood by *G. australe*.

Wood pattern	Specimens number	Specific gravity (kg m ⁻³) (C.V.)	Modulus of rupture (MPa) (C.V.)	Modulus of elasticity (MPa) (C.V.)
SS	50	867 ± 61 (7)	118 ± 26 ^a (22)	9780 ± 1874 ^a (19)
EX	29	920 ± 61 (6)	131 ± 27 ^a (21)	11750 ± 2235 (19)
WPR	32	712 ± 99 (8)	78 ± 38 (48)	8582 ± 3239 ^a (38)
IWR	43	595 ± 93 (15)	33 ± 16 (48)	5536 ± 2492 (45)

Legend: SS – sound sapwood; EX – heartwood with accumulation of extractives; WPR – heartwood with white pocket rot; IWR – heartwood with intense white rot. (C.V.) – coefficient of variation.

Note: Mann-Whitney's test – means followed by the same letter do not differ statistically ($p < 0.05$).

The results of mechanical assays revealed high variability (coefficient of variation – C.V.) in the modulus of rupture and modulus of elasticity of decayed heartwood (WPR and IWR), which can be explained by the difficulty to obtain homogenous wood samples, as the decayed regions were irregular with size variation along the stem. Still, in relation to sound sapwood (SS), modulus of rupture (resistance) values decreased significantly with increasing degree of biodeterioration, reaching values of 34% and 72% in regions with the WPR and IWR patterns, respectively.

The modulus of elasticity (rigidity) of the plant tissue did not differ in the WPR pattern from the one in the SS pattern, as such wood property is related to the amount of effective (sound) wood mass, thus representing the average of the evaluated specimens. Although the similarity of these patterns ($p = 0.103$), the decrease in modulus of rupture was significant, as wood rupture depends only on the most fragile point or region of the specimens. While a given tree with such decay pattern may still keep its wood rigidity,

it nonetheless should be considered susceptible to propagation of fractures upon bending by external forces, such as winds. In wood regions with the IWR pattern, a significant reduction of 43% in rigidity was observed in relation to the SS. Decrease in values of specific gravity, modulus of rupture and modulus of elasticity of wood of several tree species infected by xylophagous fungi has also been observed by Bodig and Jayne (1992). Zabel and Morrell (1992), Eaton and Hale (1993), Tomazello-Filho et al. (2008) and Brazolin (2009). None of these authors, however, reports such observation to wood samples affected by white pocket rot.

Accumulation of extractives in the lumen of cells from the EX pattern led to an increase in specific gravity and consequently in the modulus of elasticity, in comparison with the SS. In the case of the modulus of rupture, despite being similar to SS ($p = 0.06638$), it was suggested a tendency for increase in mechanical resistance, as observed by Brazolin (2009) in tipuana trees (*Tipuana tipu*) decayed by *Ganoderma* sp. Thus, we found evidence of an increase in rigidity and mechanical properties after occurrence of the compartmentalization process in the sibipiruna wood.

The analysis of the failure model in the static bending assay showed that samples were ruptured by simple tension (Figure 7). Microscopically, this rupture can be explained by the formation of fiber erosion channels and by complete cell wall depletion at advance stages, after which only the middle lamella remains among fibers, vases, and cells of the axial and radial parenchyma, which provides higher susceptibility to rupture. Thus, a tree whose stem is inclined or subjected to strong winds and has basidioma of *G. australe* on its tensioned side (and consequently presents simultaneous white rot in the wood interior) can be considered on alert due to imminent fall risk.



Figure 7. Failure model in the static bending assay: samples from the sibipiruna wood decayed by *G. australe*, ruptured by simple tension (scale = 1 cm).

4. Conclusion

In sibipiruna (*Poincianella pluviosa*) trees, the fungus *Ganoderma australe* developed in juvenile and mature heartwoods, causing the white pocket rot and affecting the entire tissue, leading to advanced stages of deterioration. Degradation of cell wall components of fibers (cellulose, hemicellulose, and lignin) occurred non-selectively, being characterized as simultaneous white rot. Such decay significantly affected the wood specific gravity and consequently its mechanical resistance and rigidity, thus becoming the tree susceptible to rupture and fall. An association between decayed wood and xylophagous insects, such as the subterranean termite *Coptotermes gestroi* and wood-boring beetles (order Coleoptera), was also observed.

Acknowledgements

The authors thank the employees of the São Paulo City Hall for the assistance provided during collections, and CAPES and FAPESP for financial and scientific support.

References

- Anagnost, S.E. 1998. Light microscopic diagnosis of wood decay. *IAWA Journal* 19 (2): 141-167.
- America Society of Testing Materials. 2014. ASTM D 2395 – Standard test methods for specific gravity of wood and wood-based materials. West Conshohocken, 9 p.
- Associação Brasileira de Normas Técnicas. 1997. NBR 7190 – Estruturas de madeira, São Paulo. 107 p.
- Barbosa, AC.F., Pace, M.R., Witovisk, L., Angyalossy, V. 2010. A new method to obtain good anatomical slides of heterogeneous plant parts. *IAWA Journal* 31:373–383.
- Bari, E., Taghiyari, H.R., Naji, H.R., Schmidt, O., Ohno, K.M., Clausen, C.A., Bakar, E.S. 2016. Assessing the destructive behaviors of two white-rot fungi on beech wood. *International Biodeterioration & Biodegradation* 114: 129-140.
- Bari, E., Nazarnezhad, N., Kazemi, S.M., Tajick Ghanbary, M.A., Mohebbi, B., Schmidt, O., Clausen, C.A. 2015a. Comparison of degradation capabilities of the white rot fungi *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 104: 231-237.
- Bari, E., Oladi, R., Schmidt, O., Clausen, C.A., Ohno, K., Nicholas, D.D., Ghodskhah Daryaei, M., Karim, M. 2015b. Influence of xylem ray integrity and degree of polymerization on bending strength of beech wood decayed by *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor*. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 104: 299-306.
- Bari, E., Schmidt, O., Oladi, R. 2015c. A histological investigation of oriental beech wood decayed by *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor*. *Forest Pathology Journal* 45: 349-357.
- Bari, E., Taghiyari, H.R., Mohebbi, B., Clausen, C.A., Schmidt, O., Vaseghi, M.J. 2015d. Mechanical properties and chemical composition of beech wood exposed for 30 and 120 days to white-rot fungi. *Holzforschung* 69: 587-593.
- Bodig, J., Jayne, B.A. 1992 *Mechanics of wood and wood composites*. 2nd ed. New York: Van Nostrand Reinhold. 721 p.
- Biodeterioração, anatomia do lenho e análise de risco de queda de árvores de tipuana, *Tipuana tipu* (Benth.) O. Kuntze, nos passeios públicos da cidade de São Paulo, SP, 265 p. Tese (doutorado) – Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiróz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo.
- Brazolin, S. 2011. Avaliação do lenho biodeteriorado de árvores de tipuana (*Tipuana tipu*) em área urbana: análise macroscópica e massa específica aparente. *Scientia Forestalis* 39(91): 291-299.
- Eaton, R.A., Hale, M.D.C. 1993. *Wood: decay, pests and protection*. London: Chapman & Hall. 546 p.

- Grassé, P.P. 1982. Termitologia. Paris: Masson. t. 1: Anatomie, physiologie, reproduction. 676 p.
- Hillis, W.E. 1962. The distribution and formation of polyphenols within the tree. In: _____. (Ed.). Wood extractives. London: Academic Press. 1962. chap. 2, p. 60-123.
- Karim, M. Daryaei, M.G., Torkaman, J., Oladi, R., Ghanbary, M.A.T., Bari, E. *In vivo* investigation of chemical alteration in oak wood decayed by *Pleurotus ostreatus*. International Biodeterioration & Biodegradation 108. 127-132.
- Manion, P.D., Zabel, R.A. 1979. Stem decay perspectives - an introduction in the mechanisms of tree defense and decay patterns. Phytopathology, St. Paul, 69(10): 1135-1138.
- Obst, J.R., Highley, T.L., Miller, R.B. 1994. Influence of lignin type on the decay of woody angiosperms by *Trametes versicolor*. In: Llewellyn, GC, Dashek, WV, O'Rear, CE eds. Biodeterioration Research 4: Mycotoxins, wood decay, plant stress, biocorrosion, and general biodeterioration: Proceedings of 4th Meeting of the Pan American Biodeterioration Society; 1991 August 20–25; as an electronic symposium. New York: Plenum Press: 357-374, 1994.
- Oliveira, A.M.F., Lelis, A.T. de, Lepage, E.S., Lopez, G.A.C., Oliveira, L.C.S. de, Cañedo, M.D., Milano, S. 1986. Agentes destruidores da madeira. In: Lepage. E.S. (Coord.). Manual de preservação de madeiras. São Paulo: IPT; SICCT. v. 1. cap. 5. p. 99-278 (Publicação IPT.1637).
- Pest Notes, 2011. Wood Decay Fungi in Landscape Trees. Publication 74109. University of California, Statewide Integrated Pest Management Program, Agriculture and Natural Resources. 4p.
- Rayner, A.D.M., Boddy, L. (Ed.). 1988. Fungal decomposition of wood: its biology and ecology. Chichester: John Wiley. 587 p.
- Sands, A.W. 1969. The association of termites and fungi. In: Krishna. K; Wessner. F.M. Biology of termites. New York: Academic Press 2:495-524.
- Schwarze, F.M.W.R. 2007. Wood decay under the microscope. Fungal Biology Reviews. 21:133-170.
- Seitz, R.A. 1996. A poda de árvores urbanas. 1º Curso em treinamento sobre poda em espécies arbóreas florestais e de arborização urbana. IPEF-USP. Acessado pela www.ipef.br/publicacoes/curso_arborizacao_urbana/cap07.pdf in 28/11/2016.
- Shigo, A.L. 1979. Tree decay: an expanded concept. Washington: USDA. Agriculture Forest Service, 72p (Information Bulletin. 419).
- Shigo, A. 1984. Compartmentalization: a conceptual framework for understanding how trees grow and defend themselves! Annual Review of Phytopathology 22:189-214.
- Shortle, W.C., Dudzik, KR. 2012. Wood decay in living and dead trees: a pictorial overview. S. FOREST SERVICE U.S. Forest Service 11 Campus Blvd Suite 200 Publications Distribution. Newtown Square PA 19073 359 Main Road.
- Terho, M. 2009. What was behind the bark? – An assessment of decay among urban *Tilia*, *Betula* and *Acer* trees felled as hazardous in the Helsinki City area. Dissertationes Forestales 81. 36 p. Available at <http://www.metla.fi/dissertationes/df81.htm>

- Tomazello-Filho, M., Brazolin, S., Chagas, M.P. 2008. Application of x-ray technique in nondestructive evaluation of eucalypt wood. *Maderas, Ciencia y Tecnologia. Concepción* 10(2): 139-149.
- Yang, Z., Jiang, Z., Hse, C.Y., Liu, R. 2017. Assessing the impact of wood decay fungi on the modulus of elasticity of slash pine (*Pinus elliottii*) by stress wave non-destructive testing. *International Biodeterioration & Biodegradation* 117: 123-127.
- Zabel, R.A. & Morrell, J.J. 1992. *Wood microbiology: decay and its prevention*. London: Academic Press. 476 p.

Capítulo 2. Hydrolytic and oxidative enzymes activity and insoluble lignin degradation by parasitic *Ganoderma* spp. in urban trees.

Okino, L.K.^{1,2,3}, Vitali, V.M.V.¹, Gugliotta, A.M.¹, Machado Junior, E.L.¹

1. Instituto de Botânica, Núcleo de Pesquisa em Micologia, Av. Miguel Stéfano, 3687, 04301-012, São Paulo, Brazil.
2. Corresponding Author: Phone. + 55 11 50676067
3. email: lucikimieokino@gmail.com

Abstract

Among the main pathogenic fungi of trees in urban areas, the genus *Ganoderma* includes species that cause white rot of the wood, responsible for the degradation of the main structural components of the cells, such as cellulose, hemicellulose and lignin. The enzymatic production, low molecular mass agents (iron chelating compounds or siderophores) and insoluble lignin degradation by *Ganoderma* spp. isolated from urban trees were evaluated. Fourteen strains of *Ganoderma* were evaluated for the production of hydrolytic enzymes (xylanases, endoglucanases and exoglucanases) and oxidatives (peroxidases, laccases, MnP and LiP) during solid state fermentation of heartwood and sapwood sawdust in different incubation periods. All the strains evaluated in this study produced some type of enzyme, both hydrolytic and oxidative, in some incubation period, even in low activity. The production of low molecular mass agents (iron chelating compounds) was detected in all the evaluated strains. Even with this whole enzymatic apparatus, there were no differences in the degradation of insoluble lignin between the samples incubated for 28 days and the control.

Key-words: Wood biodegradation, white rot, siderophores, solid state fermentation, heartwood, sapwood.

1. Introduction

In general, wood-degrading fungi attack the heartwood of the living tree, composed by nonfunctional cells, but in some cases they also attack the sapwood or the active region of the tree. In the living tree, the heartwood is enveloped by the sapwood which is generally not susceptible to rot due to the high moisture content and its physiological properties that inhibit the development of the mycelium. In addition, there is also the bark which is an effective barrier to fungal infection. But in some cases, the attack of the sapwood by fungus causing the canker can occur and, thus, the sapwood and heartwood degradation occurs in addition to the presence of the canker (Vasaitis 2013).

The sapwood is the living region of the trunk where occurs the conduction of water and solutes. In addition, the sapwood has the function of supporting the tree as well as storage. In angiosperms, the support is provided by the libriform and tracheid fibers and, within these are conduction vessels with open ends or with perforated plates. The conduction of water and minerals from roots to leaves occurs by tracheal elements and photosynthates of the leaves to the other portions of the tree by the sieved elements and storage of energy reserves is usually stored as starch in the cells of the parenchyma (Klock et al. 2005). In relation to the heartwood, the sapwood is richer in nutrients such as sugars, amino acids, organic acids, proteins and minerals since it carries the xylem and phloem conductive tissues (Bamber

1987) and poorer in extractives, which occur only accompanying microbial colonization or in some injured region. Such extractives may be present as gums, oil or resins. In the limits between functional sapwood and the region that has suffered some damage or degradation, discolored zones or also called reaction zones, in which accumulate extractives for defense against invasion in the sapwood (Rayner and Boddy 1988).

Ganoderma species are known as parasitic fungus that causes degradation of the basal region and roots of urban trees in the northern hemisphere (Terho et al. 2007, 2009; Vasaitis 2013) and a few studies in Brazil report the occurrence of *Ganoderma* spp. in urban arborization (Lima 1993; Brazolin 2009; Russomanno et al. 2012) but no published work with sibipiruna trees (*Poincianella pluviosa* (DC) L.P. Queiroz). The sibipiruna tree was chosen because it represents one of the main native trees of Brazil used in the urban arborization of São Paulo city, São Paulo, Brazil.

Species of this fungus that causes white rot of wood also attack plants of economic interest such as palm trees, rubber trees, acacias, etc. (Flood et al. 2000).

Few reports involving hydrolytic and or oxidative enzymes of *Ganoderma* species have been published, such as Elisashvili et al. (2009) that evaluated the activity of carboxymethylcelluloses and xylanases besides laccases and MnPs of *Ganoderma applanatum*, Jo et al. (2011) that observed through qualitative tests the activity of xylanase and avicellase and Salmon et al. (2014) who also used a qualitative test with several inducers for hydrolytic enzymes of *G. applanatum*.

Elissetche et al. (2007) reported the simultaneous production of laccases and xylanases produced by *G. applanatum* inoculated in wood. In an extensive review, Zhou et al. (2012) discussed the *Ganoderma* enzyme system and its potential application and have reported that they are able to secrete the LiP, MnP and laccase enzymes that hydrolyse lignin into monosaccharides such as arabinose, xylose, galactose, fructose and glucose as well as disaccharides of these small molecules that will serve as an energy source.

In 1957 Pirone had already reported the presence of *Ganoderma* species parasitizing urban trees in New Jersey, USA. Several other studies involving fungi, including *Ganoderma* spp., parasites on trees have been performed (Adaskaveg et al. 1993; Agosin et al. 1990; Blanchette 1984a,b; Coetzee et al. 2015; Flood et al. 2000; Schwarze et al. 2000, Schwarze and Ferner 2003; Schwarze 2008). The genus *Ganoderma* causes white rot in wood and can destroy the internal support of the trees, or the structural components of cells, cellulose, hemicellulose and lignin. These fungi have an enzymatic system involving hydrolytic and oxidative enzymes that cause the degradation of these components (Pest Notes 2011; Baldrian and Gabriel 2003). The rot is usually not visible externally, only when there is a hollow or the presence of the basidioma, indicating that the tree may present a risk of falling, especially when there are strong winds and or rains (Pest Notes 2011).

It is known that urban trees are subject to many anthropogenic actions such as root pruning for paving roads and streets, pruning of branches near the electric grid, compacted soil, pollution and water stress, contributing to the tree being more susceptible to attack of pathogens. The evaluation of the damage caused by fungus action in the stability of the tree against fall is very difficult and depends on many factors such as host and fungus species, host vigor and local conditions (Roloff 2016). Gonthier and Nicolotti (2009) developed an identification key for use in field work of fungi commonly found in Europe parasitizing urban trees, which includes some species of *Ganoderma*. Terho (2009) observed that in urban trees in the city of Helsinki, Finland, *Ganoderma* infection usually occurs by roots up to 7.5 cm in diameter, but there is also a strong interaction between *G. lipsiense* infection and wounds in the stem of *Tilia* sp. causing the internal rotting of these trees.

In relation to the hydrolytic and oxidative enzymes of *Ganoderma* spp. parasites and their role in root or tree root degradation, there are few published reports, such as Elisashvili et al.

(2009) that evaluated the activity of carboxymethylcelluloses and xylanases besides laccases and MnPs of *Ganoderma applanatum* and Salmon et al. (2014) who performed a qualitative test using various substrates inducing hydrolytic enzymes also in *G. applanatum*. Zhou et al. (2012) reviewed the enzymatic system of the genus and its potential application was presented, in which they report that *Ganoderma* spp. are capable of secreting the LiP, MnP and laccase enzymes that hydrolyse lignin into monosaccharides such as arabinose, xylose, galactose, fructose and glucose as well as disaccharides of these small molecules that will serve as energy source. These same authors point out, however, that not all strains can produce these enzymes at the same time and that some strains can secrete only one or two of them. That is, the strains, composition of the culture medium and culture conditions influence the enzymatic activity.

In addition to these lignin-modifying enzymes, the participation of low molecular mass compounds (LMMC), such as siderophore and oxalates produced by some white and brown rot fungi, has also been studied. These chelating compounds act in the first stages of the degradation in the formation of hydroxyl radicals from the non-enzymatic reactions explained by the generation of Fe^{2+} from the Fe^{3+} present in the wood in the form of insoluble hydroxides and in the production of hydrogen peroxide forming the Fenton reagents (Fe^{2+} and H_2O_2) *in vivo*, initiating depolymerization of cellulose and hemicellulose in wood (Goodell et al. 1997).

More recent studies with different white rot fungi indicate an intense synergistic action between LMMC with Fe^{3+} reducing activity and the ligninolytic enzymes, laccases and manganese peroxidase, with significant participation in the biodegradation of polysaccharides and lignin (Arantes and Milagres 2009, Arantes et al. 2011).

For the establishment of the fungus in a living tree the performance of the lignocellulolytic metabolism is fundamental to break the cell wall and allow colonization of the substrate. In this way, the enzymatic activity and the iron chelator production of the *Ganoderma* isolates growing on sibipirunas trees were evaluated to observe the degradation of these strains.

The purpose of this work was evaluate the enzymatic activities of hydrolytic (xylanases, endoglucanases, exoglucanases) and oxidative (peroxidases, laccases, manganese-peroxidases – MnPs and lignin-peroxidases -LiPs) of *Ganoderma* spp. strains incubated in healthy heartwood and sapwood sawdust, free of any infestation by fungi, termites or drills, in four periods of incubation.

2. Materials and Methods

2.1. Fungal strains and inoculation

Fourteen strains isolated from *Ganoderma* basidiomes parasitizing urban tree (*Poincianella pluviosa* (DC) L.P. Queiroz) in the streets in the city of São Paulo, Brazil, were analyzed (Table 1). The strains (stock cultures) were kept in flasks with distilled water at room temperature in the Collection of Algae, Cyanobacteria and Fungi Cultures of the Instituto de Botânica (CCIBt), and the vouchers deposited in Herbarium SP (Thiers continuously updated).

The stock strains were inoculated into Petri dishes containing malt extract agar (MEA) 2% and incubated at 28 °C for 7 days. 20 mycelial discs (5mm diameter) were removed from the most active mycelial growth, and used as inoculum in each Erlenmeyer flask containing 100 mL malt extract broth (MEB) 2%. After incubation for 14 days, the content of flasks were homogenized with a waring blender (in 3 cycles of 15 seconds or more if necessary). Twenty mL of this homogenate was used as inoculum for each flask containing the substrate.

Table 1. Fungi collected in sibipirunas trees in the city of São Paulo, SP, Brazil, and strains deposited in the Collection of Cultures CCIBt.

Specimens	CCIBt
<i>Ganoderma australe</i> (Fr.) Pat.	4166
<i>Ganoderma australe</i>	4170
<i>Ganoderma australe</i>	4172
<i>Ganoderma australe</i>	4174
<i>Ganoderma australe</i>	4175
<i>Ganoderma australe</i>	4178
<i>Ganoderma australe</i>	4179
<i>Ganoderma australe</i>	4240
<i>Ganoderma australe</i> .	4180
<i>Ganoderma perzonatum</i> Murrill	4243
<i>Ganoderma</i> sp.	4241
<i>Ganoderma</i> sp.	4242
<i>Ganoderma</i> sp.	4162
<i>Ganoderma</i> sp.	4177

2.2. Substrate preparation and incubation

250 mL Erlenmeyer flasks with 10.0 g of air dried sibipiruna tree sawdust (particles smaller than 1.0 mm) of heartwood and sapwood separately moistened with 10.0 mL of distilled water were autoclaved (121°C for 60 min). After cooling, the flasks were inoculated and incubated at 28°C for 28 days. At intervals of 7 days, flasks were withdrawn in triplicates from each culture for extraction and enzymatic analysis. The choice for the solid state fermentation of the sawdust was made because it represents the substrate similar to the natural occurrence in the tree, without adding nutrients such as sugars and minerals generally used in submerged cultures.

2.3. Enzyme extraction from the cultured sawdust

Extracellular enzymes were extracted with 70 mL of 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.8) in the Erlenmeyer flasks containing sawdust, 5' manual shaking and then orbital shaking (120 rpm / 1 h) followed by filtration on qualitative filter paper. The sawdust retained in the filter was taken to the drying oven at 56 °C for analysis of insoluble lignin thereafter. The crude enzyme extract was treated with activated charcoal (2%) in the orbital shaker (120 rpm / 30') and filtered in cellulose membrane (Millipore 0.45µ) to remove phenolic compounds (Carvalho et al. 2008). Then, the enzymatic assays were performed.

2.4. Enzymatic assays

2.4.1. Oxidative enzymes

2.4.1.1. Total oxidation of ABTS

It was determined using ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazol-6-sulfonic acid)) as a substrate, measured by oxidation through the absorbance variation at 420 nm ($\epsilon = 36000 \text{ M}^{-1}$

cm⁻¹) for 10 min in a spectrophotometer (HITACHI / U - 2001), according to Machado and Matheus (2006). The reaction mixture was composed of 600 µL of the enzyme extract in the appropriate dilution, 250 µL 50 mM citrate-phosphate buffer pH 4.0, 100 µL 5 mM ABTS and 50 µL 2 mM H₂O₂ in a 1.0 ml cuvette. One unit of enzyme activity corresponded to the amount of enzyme capable of oxidizing 1 µMol of ABTS per minute.

2.4.1.2. Laccases.

Laccases activities (EC 1.10.3.2) were measured with the addition of 50 µL of catalase in 600 µL of enzyme extract at the appropriate dilution and, after 10 minutes, 250 µL of 50 mM citrate phosphate buffer pH 4.0 and 100 µL 5 mM ABTS were added. The absorbance reading was performed at 420 nm on the spectrophotometer Hitachi U2000 (Machado and Matheus, 2006).

2.4.1.3. Peroxidases. The total peroxidases were determined by the difference between total oxidation of ABTS and laccases activity (Eggert et al. 1996).

2.4.1.4. Manganese-dependent Peroxidases (MnPs). The activity of MnPs (EC 1.11.1.13) were measured using phenol red as substrate. The reaction mixture contained 3.5 mL of the enzyme extract in the appropriate dilution, 2.1 mL of solution A (0.2 M sodium succinate buffer pH 4.5, 0.1 M sodium lactate and 0.5% bovine albumin), 350 µL of 2 mM MnSO₄, 350 µL of 2 mM H₂O₂, and 700 µL of 1% phenol red. The reaction occurred during 10 minutes, and every 2 minutes, 1 mL of the reaction mixture was withdrawn and transferred to the 1.0 mL cuvette and the reaction was stopped with the addition of 50 µL of 3N NaOH. The absorbance was monitored at 610 nm in the spectrophotometer Hitachi U2000 (Kuwahara et al. 1984).

2.4.1.5. Lignin-peroxidases (LiP). Measures for LiP using Azure B and the veratryl alcohol as substrate were made following Arantes (2008) and Tien and Kirk (1984), respectively.

2.4.2. Hydrolytic enzymes

In the enzymatic assays of xylanases (β, D-xylanase) (EC 3.2.1.8) (Bailey et al. 1992), endoglucanases (endo-1,4-β-glucanase) (EC 3.2.1.4) and exoglucanases were used beechwood xylan (1% w/v), carboxymethylcellulose-CMC (0.44% w/v) and microcrystalline cellulose (1% w/v), respectively. All substrates were obtained from Sigma-Aldrich.

Reducing sugars were performed according to Miller (1959) dinitrosalicylic acid (DNS) method modified. The reactive mixture for xylanases followed Arantes (2008), with 0.9 mL of the beech xylan solution and 0.1 mL of the enzymatic extract in the appropriate dilution in test tubes and incubated at 50°C for 5, 15 and 30 minutes. After each incubation period, 1.5 mL of DNS solution was added to each tube and boiled for 5 minutes to allow the reaction of the reducing sugars with the DNS. The tubes were then placed in an ice bath to stop the reaction. For each sample a control was done in the same way, except that the addition of the enzymatic extract in the tube was made only after the incubation period, after pipetting the DNS. In this way it is possible to calculate the reducing compounds that each sample produces in the tube. Absorbance was measured at 640 nm in a Hitachi U2000 spectrophotometer. The same procedure was done for CMC and cellulose, modifying the incubation time at 50°C, during 30, 60 and 90 minutes and 60, 90 and 120 minutes, respectively. To calibrate the spectrophotometer a blank (or control) consisted of 0.9 mL of the substrate and 0.1 mL of sodium acetate buffer solution (50 mM), pH 5.0 was used.

Standard curve of xylose (Sigma-Aldrich) were used to calculate xylanases and glucose (Sigma-Aldrich) for endoglucanases and exoglucanases activities. One enzyme activity unit was defined as the amount of enzyme required to oxidize 1 μmol of substrate.

2.5. Low Molecular Mass Agents (LMMA)

The analysis was performed according to Schwyn and Neilands (1987), using chrome azurol S (CAS) capable of complexing with Fe^{3+} . With the action of the iron chelating on the blue dye, the color change occurred for pink or orange and the results were expressed as a percentage of iron chelating. To obtain the crude extracts, 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of malt extract broth 2% were inoculated with each of the 14 strains and incubated for 14 days at 28°C, in triplicates.

After incubation, the contents of the flasks were filtered on qualitative filter paper and 1.0 mL of the extracts were mixed with 1.0 mL of the CAS solution, allowed to stand for one hour and then the absorbance were measured on the Hitachi spectrophotometer (U2000) at 630 nm (Milagres et al. 2002) The percentages of iron chelating were calculated by the difference between the reference and the absorbances. The reference consisted of culture broth with CAS solution and without the presence of the fungus.

2.6. Lignin assay

To evaluate the insoluble lignin after 28 days of incubation, 2.0 g of the heartwood or sapwood sawdust samples were weighed to a constant mass, with an accuracy of 0.1 mg, referred to as dry sample mass - M_A . Then, the acid hydrolysis was carried on with sulfuric acid (72% v/v) according to Gouveia et al. (2009). The M_A of each sample was placed in 500 mL Erlenmeyer flasks in a water bath at approximately 45°C and 10.0 mL of H_2SO_4 (72%) was added under vigorous stirring for 7 minutes to the first hydrolysis. After, the flasks were capped with aluminum foil and autoclaved for 30 minutes at 121°C for the second hydrolysis to occur. After cooling, the flasks contents were filtered on qualitative filter paper with the aid of a vacuum pump. The filtrate was separated and frozen for further analysis of soluble lignin. The sawdust retained on the filter paper was washed with 2.5 L of distilled water in the Buchner funnel and then transferred to a pre-weighed crucible for drying at 100°C until a constant mass (M_K) was obtained. After obtaining the dry weight, the sample was calcined in the muffle at 600°C for 2 h. After cooling the crucibles were weighed and kept in an oven at 100°C until obtaining the constant mass of ash (M_C). The same procedure was done with the control (uninoculated).

The calculation of insoluble lignin was done according to Gouveia et al. (2009):

$$L_{Ki} = M_K - M_C / M_A * 100$$

As: L_{Ki} : insoluble Lignina Klason

M_K : insoluble dry lignin mass

M_C : ash mass

M_A : dry sample mass

2.7. Statistical analysis

For statistical analysis of the enzymatic data the parameters fungus, substrate and incubation time were used. The results of the enzymatic measurements, siderophores and insoluble lignin were submitted to analysis of variance (ANOVA) and, after observing a significant effect of 95% or better, the means were compared by the Tukey test using Minitab 17.

3. Results and discussion

All strains evaluated in this study produced some type of enzyme, both hydrolytic and oxidative (except LiP activity that was not detected in any culture), in some incubation period, even at low activity (Table 2). However, the strains presented different behaviors.

A significant difference was observed between the strains ($p = 0.005$) in the enzymatic activity of all the enzymes.

For all the oxidative enzymes the best substrate was sapwood sawdust, differently from hydrolytic enzymes, with the heartwood sawdust being the best.

In the statistical analysis of the enzymes activities with Substrate*Fungus, there was a predominance of CCIBt 4243 that stood out from the other strains, and for all the oxidatives presented greater activity in the sapwood sawdust and for the hydrolytic ones the greater activity was in the heartwood sawdust, being that for the endoglucanases the CCIBt 4172 also stood out in the heartwood sawdust. For exoglucanases, the CCIBt 4177 stood out from the rest.

In the comparison between enzymes and Fungi * Time, the strains that stood out were:

Laccases: CCIBt 4174 in 7 days (930.6 U.L⁻¹)

Total Peroxidases: CCIBt 4243 in 7 days (1911.4 U.L⁻¹)

MnP: CCIBt 4243 in 7 days (265.0 U.L⁻¹)

Xylanases: CCIBt 4180 in 21 days (3890.0 U.L⁻¹)

Endoglucanases: CCIBt 4243 in 28 days (1220.5 U.L⁻¹)

Exoglucanases: CCIBt 4177 in 7 days (1159.8 U.L⁻¹)

Bolaños (2016) mentions that two parasitic strains of *G. applanatum-australe* complex varied their laccases activities from 52 to 285 and from 184-500 U.L⁻¹ when cultivated in sibiruna tree sawdust for seven days.

The data obtained in this study suggest that the production of enzymes can be species-dependent and strain-dependent, and are according to Zhou et al. (2012) who observed that not all *Ganoderma* strains can produce laccases, MnPs and LiPs at the same time. D'Souza et al. (1999) observed that for *Ganoderma lucidum*, the substrate can determine which enzyme and the amount to be produced, which may have also occurred with the strains studied here.

By the results obtained, the CCIBt 4243 (*G. perzonatum*) was the best strain in relation to the diversity and production of enzymes. Campbell (1932) observed that some fungi causing white rot, including *Ganoderma applanatum*, in the early stages of *Fagus* wood degradation, attacked lignin and cellulose in various proportions, suggesting that in these fungi causing white rot, decomposition occurs by the combined action of oxidative and hydrolytic enzymes. The same results were reported by Adaskaveg et al. (1990) with different species of *Ganoderma* decaying both white fir and oak wood. Elissetche et al. (2007) detected in wood blocks incubated with *G. australe* the simultaneous production of laccases (100U.kg⁻¹ wood) and the xylanases (800-1000 IU.kg⁻¹) but LiP and MnP were not detected.

Several studies show that the production of ligninolytic enzymes varies depending on the carbon and nitrogen concentrations of the substrate, Songulashvili et al. (2007) observed that depending on the combination of agricultural residues used, different laccase and MnP activities were obtained. De Souza et al. (1999) observed that for *G. lucidum*, the substrate can determine the enzyme and their activity.

In wood degradation studies, Arantes and Milagres (2009) reinforce the hypothesis that the degradation of the wood lignocellulolytic matrix is a result of the non-enzymatic agents of LMMA in the initial stage. Fungi causing white and brown decomposition should produce compounds with relatively LMMA, which diffuses through the cell wall and degrades the

components therein. Thus, the cell wall would be unstructured to allow the subsequent penetration of the lignocellulolytic enzymes, which would occur in the more advanced stages of degradation.

Table 2. Strains incubated in heartwood and sapwood sawdust at different incubation periods and produced enzymes (U.L⁻¹).

CCIBt	Identification	Sawdust	Time	Laccases	Total Peroxidases	MnP	Xylanases	Endoglucanases	Exoglucanases
4162	<i>Ganoderma australe</i>	Heartwood	7	0	0	0	0	0	0
			14	0	0	0	53.4	16.6	34.5
			21	24.7	27.9	0	77.8	94.2	115.9
			28	198.8	30.1	0	32.8	86.9	41.4
		Sapwood	7	208.8	18.5	0	68.1	2.3	11.4
			14	160.7	4.6	0	57.5	3.3	6.5
			21	24.7	0	2.9	57.0	188.4	54.5
			28	46.3	10.2	4.9	174.7	151.2	54.8
4166	<i>Ganoderma australe</i>	Heartwood	7	297.6	0.3	0	0	261.9	434.3
			14	63.9	18.5	1.0	64.8	12.9	253.4
			21	0.1	275.6	8.8	45.3	2.0	250.1
			28	0.1	30.7	0	87.5	0	0
		Sapwood	7	980	617.3	0.4	68.6	7.8	7.0
			14	125	11.1	38.7	171.3	124.3	7.3
			21	31.8	9.7	65.9	26.6	113.2	6.1
			28	14.6	28.7	64.7	332.2	211.8	20.3

Table 2. Cont.

CCIBt	Identification	Sawdust	Time	Laccases	Total Peroxidases	MnP	Xylanases	Endoglucanases	Exoglucanases
4170	<i>Ganoderma australe</i>	Heartwood	7	0	0	0	0	0	0
			14	0	0	0	53.4	16.6	34.5
			21	24.7	27.9	0	77.8	94.2	115.9
			28	198.8	30.1	0	32.8	86.9	41.4
		Sapwood	7	208.8	18.5	0	68.1	2.3	11.4
			14	160.7	4.6	0	57.5	3.3	6.5
			21	24.7	0	2.9	57.0	188.4	54.5
			28	46.3	10.2	4.9	174.7	151.2	54.8
4172	<i>Ganoderma australe</i>	Heartwood	7	297.6	0.3	0	0	261.9	434.3
			14	63.9	18.5	1.0	64.8	12.9	253.4
			21	0.1	275.6	8.8	45.3	2.0	250.1
			28	0.1	30.7	0	87.5	0	0
		Sapwood	7	980	617.3	0.4	68.6	7.8	7.0
			14	125	11.1	38.7	171.3	124.3	7.3
			21	31.8	9.7	65.9	26.6	113.2	6.1
			28	14.6	28.7	64.7	332.2	211.8	20.3
4174	<i>Ganoderma australe</i>	Heartwood	7	840.3	331	0	73.4	489.8	6.3
			14	159.7	60.3	1.0	100.0	39.0	30.8
			21	82.1	32.3	1.3	295.5	96.1	6.9
			28	8.5	15.4	0	72.5	137.1	54.4

Table 2.

CCIBt	Identification	Sawdust	Time	Laccases	Total Peroxidases	MnP	Xylanases	Endoglucanases	Exoglucanases
4174	<i>Ganoderma australe</i>	Sapwood	7	930.6	368.1	0	287.9	113.6	153.9
			14	184.3	29.3	1.4	186.8	152.0	0
			21	44.6	47.1	1.0	515.0	183.4	7.5
			28	30.1	8.2	30.3	83.0	184.0	195.8
4175	<i>Ganoderma australe</i>	Heartwood	7	0	0	0	0	0	0
			14	0	0	0	4.4	0	0
			21	169.7	107.7	0.4	36.6	615.0	112.6
			28	9.5	0	0.9	335.3	688.9	119.2
		Sapwood	7	734.2	105.2	0.2	6.3	18.1	11.0
			14	117.3	16.7	11.6	60.6	29.2	3.3
			21	61.1	3.9	19.4	75.6	140.5	3.5
			28	48.7	12.6	31.9	82.1	162.8	2.8
4177	<i>Ganoderma</i> sp.	Heartwood	7	121.5	108.1	0	429.3	167.7	1159.8
			14	131.5	3.4	0	203.9	125.5	108.4
			21	70.4	79.6	0	474.2	125.2	545.8
			28	73.4	0	0	844.2	411.8	42.0
		Sapwood	7	248.9	649.4	0	215.4	399.7	13.6
			14	310.8	70.7	10.4	139.9	68.7	6.4
			21	70.1	11.1	49.1	507.6	224.3	35.8
			28	17.6	27.9	23.5	731.3	228.3	28.6

Table 2.

CCIBt	Identification	Sawdust	Time	Laccases	Total Peroxidases	MnP	Xylanases	Endoglucanases	Exoglucanases
4178	<i>Ganoderma australe</i>	Heartwood	7	66.0	144.7	0	217.2	22.4	109.2
			14	417.3	175.8	1.5	137.9	118.9	30.5
			21	79.9	0	0	607.8	75.7	218.7
			28	116.6	4.4	0	307.2	93.8	98.8
		Sapwood	7	829.5	256.2	0.2	102.4	10.4	14.2
			14	257.4	75.3	0	279.2	71.8	8.9
			21	34.6	24.5	31.2	22.8	95	1.4
			28	17.8	9.9	7	135.5	81.5	5.4
4179	<i>Ganoderma australe</i>	Heartwood	7	20.0	93	0	161.9	37.8	322.6
			14	97.8	192.9	0	124.0	165.5	10.9
			21	11.4	26.5	12.1	373.4	219.3	106.7
			28	58.3	0	1.0	960.2	223.8	82.6
		Sapwood	7	0	0	0	0	0	0
			14	243.7	457.3	11.1	66.2	65.9	132.8
			21	150.9	3.1	0.2	1034.6	304.2	388.0
			28	19.8	25.5	0	127.1	548.7	53.2
4180	<i>Ganoderma australe</i>	heartwood	7	222.6	0	0	1094.3	16.9	0
			14	9.7	0	0	258	25.6	22.5
			21	146.3	0	0	3863.3	403.3	471.0
			28	27.8	2.4	2.4	229.1	211.9	75.0

Table 2.

CCIBt	Identification	Sawdust	Time	Laccases	Total Peroxidases	MnP	Xylanases	Endoglucanases	Exoglucanases
4180	<i>Ganoderma australe</i>	Sapwood	7	707.5	195.4	0	8.9	4.6	25.6
			14	118.4	3.9	0	585.0	0	35.6
			21	112.4	38.0	3.0	3890.0	32.2	326.3
			28	48.5	0	5.4	109.0	222.4	103.0
4240	<i>Ganoderma australe</i>	heartwood	7	0	0	0	355.2	572.6	27.9
			14	138.5	12.8	0	134.1	453.4	11.7
			21	15.6	22.7	1.0	64.4	423.7	95.8
			28	14.7	4.3	0	257.7	865.5	204.3
		sapwood	7	434.9	12.8	0	35.1	20.8	0.6
			14	126.1	34.1	4.1	20.0	14.8	7.4
			21	79.4	11.0	4.9	22.3	47.7	5.6
			28	33.2	13.0	4.8	75.9	76.7	13.4
4241	<i>Ganoderma</i> sp.	heartwood	7	504.7	259.3	0	185.7	27.6	571.4
			14	94.0	37.0	6.9	124.5	76.5	1099.3
			21	25.5	93.4	1.3	86.2	136.5	9.1
			28	8.3	50.3	6.4	222.0	184.2	10.8
		sapwood	7	567.2	527.8	0	86.4	17.8	153.9
			14	152.8	64.8	0.6	363.1	48.9	11.8
			21	110.5	12.0	1.0	90.0	100.0	0
			28	10.9	58.3	4.1	179.4	181.1	6.0

Table 2.

CCIBt	Identification	Sawdust	Time	Laccases	Total Peroxidases	MnP	Xylanases	Endoglucanases	Exoglucanases
4242	<i>Ganoderma</i> sp.	heartwood	7	626.9	37.0	0	58.9	19.4	83.9
			14	121.3	10.6	0	140.9	280.1	71.5
			21	169.7	107.7	0	118.1	616.1	363.1
			28	533.5	66.4	7.0	64.0	45.5	291.4
		sapwood	7	974.6	467.6	0	69.7	5.3	72.8
			14	233.8	67.6	0	73.5	8.4	15.0
			21	74.1	25.5	2.1	59.7	10.0	60.9
			28	48.5	2.8	2.2	347.1	85.5	71.6
4243	<i>Ganoderma perzonatum</i>	heartwood	7	659.8	805.6	4.5	989.4	694.9	40.1
			14	599.1	348.3	10.1	2941.7	768.9	13.8
			21	138.3	139.1	7.7	1388.4	821.5	28.8
			28	48.2	87.0	5.0	1270.8	1220.5	162.8
		sapwood	7	937.6	1911.4	265.0	595.2	119.0	41.1
			14	849.6	553.3	14.8	359.8	181.8	18.8
			21	110.5	149.7	9.3	1941.9	332.5	38.2
			28	91.1	178.6	19.1	1086.8	372.9	15.1

The strains were evaluated for the production of compounds of LMMA, iron chelating, capable of releasing in the external environment Fe^{2+} , leading to spontaneous reaction of Fenton, which oxidizes all the organic matter coming into contact, allowing the first stage of colonization of ligninolytic fungi in sound wood. In all crude extracts of the studied strains were detected activity of these siderophores, with emphasis in CCIBt 4243 and CCIBt 4180 (Table 3). However if the crude extracts were submitted to concentration, maybe in all the strains a higher percentage of siderophores would be detected. In this way, the results may be underestimated.

Table 3. Production of LMMA (iron chelating) evaluated by% of CAS

CCIBt	Identification	% CAS
4162	<i>Ganoderma</i> sp.	4.437
4166	<i>Ganoderma australe</i>	10.999
4170	<i>G. australe</i>	17.993
4172	<i>G. australe</i>	22.974
4174	<i>G. australe</i>	27.003
4175	<i>G. australe</i>	0.187
4177	<i>Ganoderma</i> sp.	20.689
4178	<i>G. australe</i>	18.275
4179	<i>G. australe</i>	24.345
4180	<i>G. australe</i>	40.082
4240	<i>G. australe</i>	25.561
4241	<i>Ganoderma</i> sp.	0.125
4242	<i>Ganoderma</i> sp.	7.408
4243	<i>G. perzonatum</i>	40.463

In relation to the degradation of the insoluble lignin, there was no statistical difference between the samples incubated for 28 days and the control, in spite of all this active degradation apparatus. Probably this incubation period was a very short period to quantify the degradation of the insoluble lignin of the sawdust and the sapwood by the methodology used.

Table 4. Insoluble lignin degradation of heartwood and sapwood sawdust.

CCIBt	Identification	% Klason lignin heartwood sawdust	% Klason lignin sapwood sawdust	heartwood sawdust degradation	sapwood sawdust degradation
4162	<i>Ganoderma</i> sp.	37.491	20.346	0.219	0
4166	<i>Ganoderma australe</i>	28.819	24.204	0	0
4170	<i>G. australe</i>	18.203	47.420	0	1.8
4172	<i>G. australe</i>	18.439	21.152	0	1.563
4174	<i>G. australe</i>	21.917	21.806	0	0
4175	<i>G. australe</i>	21.532	21.160	0	0
4177	<i>Ganoderma</i> sp.	21.136	20.535	0.03	0
4178	<i>G. australe</i>	20.541	22.818	0	0
4179	<i>G. australe</i>	20.278	19.396	1.169	0
4180	<i>G. australe</i>	19.470	18.266	2.299	0.533
4240	<i>G. australe</i>	22.726	22.458	0	0
4241	<i>Ganoderma</i> sp.	17.057	28.845	0	2.946
4242	<i>Ganoderma</i> sp.	20.796	27.183	0	0
4243	<i>G. perzonatum</i>	23.599	18.533	0	2.032

Enzymatic studies of *Ganoderma* species are still scarce, and the great majority emphasize the production of enzymes for industrial uses. However, given the importance of these fungi as pathogens of urban trees, the results obtained here contributes to the knowledge about these fungi, strongly suggesting that the action of these hydrolytic and oxidative enzymes can contribute to the mechanical failure of urban trees once the degradation of the components of the heartwood and sapwood cell walls.

Acknowledgements

The authors are grateful to FAPESP (Process 2014 / 020661-1) for the support to the development of the project and to CAPES for grant.

References

- Adaskaveg JE. Gilbertson RL. Blanchette RA. 1990. Comparative studies of delignification caused by *Ganoderma* species. *Applied and Environmental Microbiology* **56(6)**:1932-1943.
- Adaskaveg JE. Miller. R.W.. Gilbertson. R.L. 1993. Wood decay. lignicolous fungi and decline of peach trees in South Carolina. *Plant disease* **77(7)**: 707-711.
- Agosin. E.. Blanchette. R.A.. Silva. H.. Lapierre. C.. Cease. K.R.. Ibach. R.E.. Abad. A.R.. Mugas. P. 1990: Characterization of palo podrido. a natural process of delignification in wood. *Applied and Environmental Microbiology* **56(1)**: 65-74.
- Arantes V. 2008. Caracterização de compostos de baixa massa molar redutores de ferro produzidos por fungos e mediação da reação de Fenton para degradação de polissacarídeos e lignina. Tese de Doutorado. Lorena: Escola de Engenharia de Lorena. Universidade de São Paulo. 165p.
- Arantes V. Milagres A. 2009. Relevância de compostos de baixa massa molar produzidos por fungos e envolvidos na biodegradação da madeira. *Química Nova* **32(6)**: 1586-1595.
- Arantes V. Milagres A. Filley TR. Goodell B. 2011. Lignocellulosic polysaccharides and lignin degradation by wood decay fungi: the relevance of nonenzymatic Fenton-based reactions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **38(4)**:541-55.
- Bailey MJ. Biely P. Poutanen K. 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology* **23**:257-270.
- Bamber RK. 1987. Sapwood and heartwood. Forestry Commission of New South Wales. Technical Publication n. 2. 8p.
- Baldrian P. Gabriel J. 2003. Lignocellulose degradation by *Pleurotus ostreatus* in the presence of cadmium. *FEMS Microbiology Letters* **220**:235-240.
- Blanchette. R.A. 1984a. Screening Wood decayed by white rot fungi for preferential lignin degradation. *Applied and Environmental Microbiology* **48(3)**: 647-653.
- Blanchette. R.A. 1984b. Selective delignification of eastern hemlock by *Ganoderma tsugae*. *Phytopathology* **74**:153-160.
- Bolaños AC. 2016. Diversidade do gênero *Ganoderma* Karst. (Ganodermataceae) e atividade enzimática de espécies que ocorrem em leguminosas. Tese de Doutorado. São Paulo: Instituto de Botânica. Secretaria do Meio Ambiente. 145p.

Brazolin S. 2009. Biodeterioração, anatomia do lenho e análise de risco de queda de árvores de tipuana. *Tipuana tipu* (Benth.) O. Kuntze, nos passeios públicos da cidade de São Paulo. SP. Tese de Doutorado. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo. 265p.

Campbell WG. 1932. The chemistry of white rots of wood. III. The effect on wood substance of *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat., *Fomes fomentarius* (Linn) Fr., *Polyporus adustus* (Willd.) Fr., *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) Fr., *Armillaria mellea* (Bahl) Fr., *Trametes pini* (Brot.) Fr., and *Polystictus abietinus* (Dicks.) Fr. *Biochemische Zeitschrift* **26**:1827-1838.

Carvalho W. Ferraz A. Milagres AMF. 2008. Clean-up and concentration of manganese peroxidases recovered during the biodegradation of *Eucalyptus grandis* by *Ceriporiopsis subvermispora*. *Enzyme and Microbial Technology* **43**:193-198.

Coetzee MPA. Marincowitz S. Muthelo VG. Wingfield MJ. 2015. *Ganoderma* species, including new taxa associated with root rot of the iconic *Jacaranda mimosifolia* in Pretoria, South Africa. *IMA Fungus* **6(1)**: 249–256. Published online 2015 Jun 22. DOI: [10.5598/imafungus.2015.06.01.16](https://doi.org/10.5598/imafungus.2015.06.01.16)

D’Souza TM. Merritt CS. Reddy CA. 1999. Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycetes *Ganoderma lucidum*. *Applied and Environmental Microbiology* **65**:5307–5313.

Eggert C. Temp U. Eriksson KEL. 1996. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Applied and Environmental Microbiology* **62(4)**:1151–1158.

Elisashvili V. Kachlishvili E. 2009. Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot Basidiomycetes. *Journal of Biotechnology* **144**:37–42.

Elissetche JP. Ferraz A. Freer J. Rodríguez J. 2007. Enzymes produced by *Ganoderma australe* growing on wood and in submerged cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **23**: 429-434.

Flood J. Bridge PD. Holderness M. 2000. ***Ganoderma Diseases of Perennial Crops***. CABI Publishing. UK.

Goodell B. Jellison J. Liu J. Daniel G. Paszczynski. A. Fekete F. Krishnamurthy S. Jun L. Xu G. 1997. Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood. *Journal of Biotechnology* **53**:133–162.

Gouveia E. Nascimento ET. Souto-Maior AM. 2009. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. *Química Nova* **32(6)**:1500-1503.

Gonthier P. Nicolotti G. 2007. A field key to identify common wood decay fungal species on standing trees. *Arboriculture & Urban Forestry* **33(6)**:410–420.

Jo W-S. Park H-N. Cho D-H. Yoo Y-B. Park S-C. 2011. Detection of extracellular enzyme activities in *Ganoderma neo-japonicum*. *Mycobiology* **39(2)**: 118–120.

Klock U. Andrade AS. 2013. Química da Madeira. Universidade Federal do Paraná. Departamento de Engenharia e Tecnologia Florestal. 85p.

Kuwahara M. Glen JK. Morgan MA. Gold MH. 1984: Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letter* **169(2)**:247-250.

- Lima AMLP. 1993. Piracicaba/SP: Análise da arborização viária na área central e em seu entorno. Tese de Doutorado. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo. 238 p.
- Machado KMG. Matheus DR. 2006. Biodegradation of Remazol Brilliant Blue R by ligninolytic enzymatic complex produced by *Pleurotus ostreatus*. *Brazilian Journal of Microbiology* **37**: 468-473.
- Milagres AMF. Arantes V. Medeiros CL. Machuca A. 2002. Production of metal chelating compounds by white and brown-rot fungi and their comparative abilities for pulp bleaching. *Enzyme and Microbial Technology* **30**: 562–565.
- Miller RNG. Holderness M. Bridge PD. 2000. Molecular and morphological characterization of *Ganoderma* in oil-palm plantings. In: Flood J. Bridge P. Holderness M (eds). *Ganoderma diseases of perennial crops*. CABI Publishing: Wallingford. UK. pp.159-182.
- Pest Notes. 2011. Wood decay fungi in landscape trees. Publication 74109. University of California. Statewide Integrated Pest Management Program. Agriculture and Natural Resources. 4p.
- Pirone PP. 1957. *Ganoderma lucidum*, a parasitic of shade trees. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **84**(6):424-428. <http://doi.org/10.2307/2482973>
- Rayner ADM. Boddy L. 1998. *Fungal decomposition of wood: its biology and ecology*. Wiley-Interscience Publication.
- Roloff A. ed. 2016. *Urban tree management for the sustainable development of green cities*. John Wiley & Sons.
- Russomanno. O.M.R.. Coutinho. L.N.. Kruppa. P.C. & Porto. B.H.C. 2012. *Ficus elastica*: novo hospedeiro de *Ganoderma applanatum*. *Biológico*. São Paulo **74**(1): 59-62.
- Salmon. D.N.X.. Spier. M.R.. Soccol. C.R.. Vandenberghe. L.S.P. de. Montibeller. V.W.. Bier M.C.J.. Faraco V. 2014. Analysis of inducers of xylanase and cellulase activities production by *Ganoderma applanatum* LPB MR-56. *Fungal Biology* **118**:655-662.
- Schwyn B. Neilands JB. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemical* **160**:47–56.
- Schwarze FWMR. 2008. Diagnosis and prognosis of the development of wood decay in urban trees. ENSPEC Pty Ltd. Rowville. Australia.
- Schwarze FWMR. Ferner D. 2003. *Ganoderma* on trees – differentiation of species and studies of invasiveness. *Arboricultural Journal. The International Journal of Urban Forestry* **27**(1): 59-77.
- Schwarze FWMR. Engels J. Matheck C. 2000. Fungal strategies of wood decay in trees. Springer. Berlin.
- Songulashvili G. Elisashvili V. Wasser SP. Nevo E. Hadar Y. 2007. Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes. *Enzyme Microb. Technol.* **41**: 57–61.
- Terho M. Hantula J. Hallaksela AM. 2007. Occurrence and decay patterns of common wood-decay fungi in hazardous trees felled in the Helsinki City. *Forest Pathology* **37**: 420–432.
- Terho M. 2009. An assessment of decay among urban *Tilia*, *Betula*, and *Acer* trees felled as hazardous. *Urban Forestry & Urban Greening* **8**:77–85.

Thiers B. [continuously updated]. Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff. *New York Botanical Garden's Virtual Herbarium*. <http://sweetgum.nybg.org/science/ih/>.

Tien M. Kirk TK. 1984. Biochemistry Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proceeding of the National Academy of Sciences* **81**:2280-2284.

Vasaitis R. 2013: Heart rots, sap rots and canker rots. In: *Infectious forest diseases*. Gonthier P. Nicolotti G (eds). Wallingford: CAB International. pp. 197-229.

Zhou XW. Cong WR. Su KQ. Zhang YM. 2012. Ligninolytic enzymes from *Ganoderma* spp: Current status and potential applications. *Critical Reviews in Microbiology*. Early Online: 1–11. DOI: 10.3109/1040841X.2012.722606

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo foram avaliadas 14 culturas de *Ganoderma* spp. isoladas de basidiomas de sibipirunas da arborização urbana na tentativa de conhecer a fisiologia desses fungos que parasitam a árvore (Capítulo 2) e também a madeira sadia e degradada por *Ganoderma australe* de três árvores removidas devido ao risco de queda (Capítulo 1).

Apesar dos resultados obtidos para atividade de enzimas hidrolíticas e oxidativas, não ocorreu degradação da serragem do cerne nem do alburno no período de incubação estudado, sendo necessário ampliar o tempo de incubação. Em sibipirunas vivas o *Ganoderma australe* atacou o lenho juvenil e adulto do cerne causando podridão branca em bolsas afetando todo o tecido nos estágios avançados de deterioração. A degradação dos componentes da parede celular das fibras (celulose, hemicelulose e lignina) ocorreu de forma não seletiva sendo, portanto, caracterizada como podridão branca simultânea. Esse apodrecimento afetou de maneira significativa a densidade aparente do lenho e, consequentemente, sua resistência mecânica e rigidez, tornando a árvore sujeita à ruptura e queda principalmente quando houver interferências físicas como ventos e chuvas fortes.

Pelo exposto, não foi possível correlacionar os resultados obtidos *in vitro* com os observados nas árvores removidas e que um período de incubação maior deve ser avaliado para verificar se ocorre degradação da lignina insolúvel.

Os resultados obtidos neste trabalho são pioneiros na cidade de São Paulo e contribuem para a avaliação de risco de queda de árvore, em especial às sibipirunas parasitadas por *Ganoderma*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

- Adaskaveg JE. Gilbertson RL. Blanchette RA. 1990. Comparative studies of delignification caused by *Ganoderma* species. *Applied and Environmental Microbiology* **56(6)**: 1932-1943.
- Adaskaveg JE. Miller RW. Gilbertson RL. 1993. Wood decay. lignicolous fungi and decline of peach trees in South Carolina. *Plant Disease* **77**: 707-711.
- Arantes V. 2008. Caracterização de compostos de baixa massa molar redutores de ferro produzidos por fungos e mediação da reação de Fenton para degradação de polissacarídeos e lignina. Tese de Doutorado. Lorena: Escola de Engenharia de Lorena. Universidade de São Paulo. 163p.
- Arantes V. Milagres AMF. 2009. Relevância de compostos de baixa massa molar produzidos por fungos e envolvidos na biodegradação da madeira. *Química Nova* **2(6)**: 1586-1595.
- Arantes V. Milagres A. Filley TR. Goodell B. 2011. Lignocellulosic polysaccharides and lignin degradation by wood decay fungi: the relevance of nonenzymatic Fenton-based reactions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **38(4)**:541-55.
- Ariffin D. Idris AS. Singh G. 2000. Status of *Ganoderma* in oil palm. In: Flood J. Bridge PD. Holderness M (eds.) *Ganoderma diseases of perennial crops*. CAB International. Wallingford. 49-68.
- Bailey MJ. Biely P. Poutanen K. 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology* **23**:257-270.
- Bamber RK. 1987. Sapwood and heartwood. Forestry Commission of New South Wales. Technical Publication n. 2. 8p.
- Bolaños AC. 2016. Diversidade do gênero *Ganoderma* Karst. (Ganodermataceae) e atividade enzimática de espécies que ocorrem em leguminosas. Tese de Doutorado. São Paulo: Instituto de Botânica. Secretaria do Meio Ambiente. 145p.
- Brazolin. S. 2009. Biodeterioração. anatomia do lenho e análise de risco de queda de árvores de tipuana. *Tipuana tipu* (Benth.) O. Kuntze. nos passeios públicos da cidade de São Paulo. SP. Tese de Doutorado. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo. 265p.
- Carvalho W. Canilha L. Ferraz A. Milagres AMF. 2009. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. *Química Nova* **32(8)** 2191-2195.
- Carvalho. W.. Ferraz. A.. Milagres. A.M.F. 2008. Clean-up and concentration of manganese peroxidases recovered during the biodegradation of *Eucalyptus grandis* by *Ceriporiopsis subvermispota*. *Enzyme and Microbial Technology* **43**:193-198.
- Castellani A. 1939. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*: 42: 225–226.
- Chen. H. 2014. Chemical Composition and Structure of Natural Lignocellulose. In: Chen H (ed). *Biotechnology of Lignocellulose - Theory and Practice*. Springer. pp. 25-71.
- Corner EJH. 1983. Ad Polyporaceas I. *Amauroderma* and *Ganoderma*. *Beiheft Nova Hedwigia* **75**: 1-182.
- Crous MJ et al. 2014. Fungal Planet description sheets. *Persoonia* **33**: 212–289.

- Darriba D. Taboada GL. Doallo R.. Posada D. 2012. jModelTest 2: more models. new heuristic and parallel computing. *Nature Methods* **9**:772.
- Desch HE. Dinwoodie JM. 1996. Timber: Structure. properties. conversion and use. 7th edn. MacMillan Press: London. (acessado na internet em 03/10/2016)
- D'Souza TM. Merritt CS. Reddy CA. 1999. Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Applied and Environmental Microbiology* **65**(12): 5307–5313.
- Eggert C. Temp U. Eriksson KE. 1996. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 1151-1158.
- Esau K. 1976. Anatomia das plantas com sementes. Ed. Edgar Blucher Ltda.
- Fengel. D.; Wegener. G.; *Wood Chemistry. Ultrastructure and Reactions*. 1st ed.. Walter de Gruyter: Berlin. 1989.
- Fidalgo O. Bononi VLR. 1984. Técnicas de coleta. preservação e herborização de material botânico. Instituto de Botânica. São Paulo.
- Gilbertson RL. Ryvarden L. 1986. North American Polypores. Part 1. Fungiflora. Oslo.
- Gomes-Silva AC. Ryvarden L. Gibertoni TB. 2011. New records of Ganodermataceae (Basidiomycota) from Brazil. *Nova Hedwigia* **92**(1-2): 83-94.
- Gottlieb AM. Saidman BO. Wright JE. 1995. Characterization of six isoenzymatic systems in Argentine representatives of two groups of *Ganoderma* In: Buchanan PK. Hseu RS. Moncalvo JM (eds). Proceedings of Contributed Symposium. 59A. B 5th International Mycological Congress. 25 – 29.
- Gottlieb AM. Saidman BO. Wright JE. 1998. Isozymes of *Ganoderma* species from southern South America. *Mycological Research* **102**: 415–426.
- Gottlieb AM. Wright JE. 1999. Taxonomy of *Ganoderma* from southern South America; subgenus *Ganoderma*. *Mycological Research* **103**: 661-673.
- Gottlieb AM. Ferrer E. Wright J. 2000. rDNA analyses as an aid to the taxonomy of species of *Ganoderma*. *Mycological Research* **104**: 1033-1045.
- Gugliotta AM. Poscolere GD. Campacci TVS. 2011. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga. São Paulo. SP. Brasil. Fungos. 10: Ganodermataceae. *Hoehnea* **38**(4): 687-695.
- Gugliotta AM. Abrahão MC. Gibertoni TB. 2013. *Polyporales* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB92411> (acesso em 05/10/2013).
- Hadda M. Djamel C. Akila O. 2015. Screening of extracellular enzyme activities of *Ganoderma* and *Fomes* species collected from North East Algeria. *Research Journal of Pharmaceutical. Biological and Chemical Sciences* **6**(4): 1455-1462.
- Hall T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**: 95-98.
- Hopple J. Vilgalys R. 1999. Phylogenetic relationships in the mushroom genus *Coprinus* and dark-spored allies based on sequence data from the nuclear gene coding

for the Large Ribosomal Subunit RNA: divergent domains, outgroups, and monophyly. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **13(1)**: 1–19.

Katoh K, Standley DM. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology Evolution* **30(4)**: 772–80.

Kinge TR, Mih AM. 2011. *Ganoderma rywardense* sp. nov. associated with basal stem rot (BSR) disease of oil palm in Cameroon. *Mycosphere* **2(2)**: 179–188.

Klock U, Andrade AS. 2013. Química da Madeira. Universidade Federal do Paraná. Departamento de Engenharia e tecnologia Florestal.

Lima AMLP. 1993. Piracicaba/SP: análise da arborização viária na área central e em seu entorno. Tese de Doutorado. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo. 238 p.

Lima Jr NC, Gibertoni TB, Malosso E. 2014. Delimitation of some neotropical laccate *Ganoderma* (Ganodermataceae): molecular phylogeny and morphology. *Revista de Biologia Tropical* **62(3)**: 1197–1208.

Loguercio-Leite C, Groposso C, Halmenschlager MA. 2005. Species of *Ganoderma* Karsten in a subtropical area (Santa Catarina State, Southern Brazil). *Iheringia. Série Botanica*. **60**: 135–139.

Lynd LR, Weimer P J, Zyl WH, Pretorius IS. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*: **66(3)**: 506–577.

Matheus DR, Bononi VLR, Machado KMG, Silva RR, Rodrigues TA. 2003. Growing basidiomycetes in bioreactors to be applied to bioremediation of HCB in soil. In: *Proceedings of the Seventh International In Situ and On Site Bioremediation*. Battele Press, Columbus. p.G-5.

Manavalan T, Manavalan A, Thangavelu KP, Heese K. 2012. Secretome analysis of *Ganoderma lucidum* cultivated in sugarcane bagasse. *Journal of Proteomics* **77**: 298–309.

Miller RNG, Holderness M, Bridge PD. 2000. Molecular and morphological characterization of *Ganoderma* in oil-palm plantings. In: Flood J, Bridge P, Holderness M (eds). *Ganoderma diseases of perennial crops*. CAB International, Wallingford, UK. pp.159–182.

Moncalvo JM. 2000. Systematics of *Ganoderma*. In: Flood, J, Bridge, PD, Holderness, M. (eds.) *Ganoderma diseases of perennial crops*. CAB International, Wallingford, UK. pp. 23–45.

Moncalvo JM, Buchanan PK. 2008. Molecular evidence for long distance dispersal across the Southern Hemisphere in the *Ganoderma applanatum-australe* species complex (Basidiomycota). *Mycological Research* **112**: 425–436.

Moncalvo JM, Wang HF, Hseu RS. 1995. Phylogenetic relationship in *Ganoderma* inferred from the Internal Transcribed Spacers and 25S Ribosomal DNA sequences. *Mycologia* **87**: 223–238.

Nowak DJ, Crane DE. 2002. Carbon storage and sequestration of urban trees in the USA. *Environmental Pollution* **116**: 381–389.

- Obst JR. Highley TL. Miller RB. 1994. Influence of lignin type on the decay of woody angiosperms by *Trametes versicolor*. In: Llewellyn. GC. Dashek. WV. O'Rear. CE (eds). *Biodeterioration Research 4: Mycotoxins. wood decay. plant stress. biocorrosion. and general biodeterioration: Proceedings of 4th Meeting of the Pan American Biodeterioration Society*; 1991 August 20–25; as an electronic symposium. New York: Plenum Press. pp. 357-374.
- Pérez J. Muñoz-Dorado J. Rubia T. Martínez J. 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology* **5**: 53–63.
- Pilotti CA. Sanderson FR. Aitken EAB. Bridge PD. 2000. Genetic variation in *Ganoderma* spp. from Papua Nova Guine as revealed by molecular (PCR methods). In: Flood J. Bridge P. Holderness M (eds) *Ganoderma diseases of perennial crops*. CAB International. Wallingford. UK. pp. 195-204.
- Polizeli MLTM. Rizzatti ACS. Monti R.. Terenzi HF. Jorge JA. Amorim DS. 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **67**: 577–591. DOI 10.1007/s00253-005-1904-7. Mini-review.
- Pradella DZA. Silva JWF. Nisi TCC. 2015. Arborização Urbana. 1ª ed. São Paulo: SMA/CEA.
- Ramos LP. 2003. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Química Nova* **26(6)**:863-871.
- Rayner ADM. Boddy L. 1998. Fungal decomposition of wood: its biology and ecology. Wiley-Interscience Publication.
- Robles CA. Carmarán CC. Lopez SE. 2011. Screening of xylophagous fungi associated with *Platanus acerifolia* in urban landscapes: Biodiversity and potential biodeterioration. *Landscape Urban Planning* **100 (1-2)**: 129-135.
- Ronquist F. Teslenko M. Mark P van der. Ayres DL. Darling A. Höhna S. Larget B. Liu L. Suchard MA. Huelsenbeck JP. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* **61(3)**: 539-542.
- Russomanno OMR. Coutinho LN. Kruppa PC. Porto BHC. 2012. *Ficus elastica*: novo hospedeiro de *Ganoderma applanatum*. *Biológico*. **74(1)**: 59-62.
- Ryvarden L. 1991. Genera of Polypores. Nomenclature and taxonomy. Synopsis fungorum 5. Fungiflora. Oslo. Norway.
- Ryvarden L. 1995. Can we trust morphology in *Ganoderma*? In: *Ganoderma: systematics, phytopathology and pharmacology*. In: Buchanan RK. Hseu RS. Moncalvo JM (eds). *Proceedings of Contributed Symposium 59A. B. 5th International Mycological Congress*. Vancouver. August 14–21. 1994. Taipei: National Taiwan University. pp. 19–24.
- Ryvarden L. 2000. Studies in Neotropical polypores 2: a preliminary key to neitropical species of *Ganoderma* with a laccate pileus. *Mycologia* **92**: 180-191.
- Ryvarden L. 2004. Neotropical Polypores: Part 1. Introduction. Ganodermataceae & Hymenochaetaceae. Synopsis Fungorum 19.
- Saliba EOS. Rodriguez NM. Morais SAL de. Piló-Veloso D. 2001. Ligninas-métodos de obtenção e caracterização química. *Ciência Rural* **31(5)**: 917-928.

Santos FA. Queiróz JH de. Colodette JL. Fernandes SA. Guimarães VM. Rezende ST. 2012. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Química Nova* **35**(5):1004-1010.

Shigo AL. 1979. Tree decay: an expanded concept. Washington: USDA. Agriculture Forest Service. (Information Bulletin 419).

Shigo AL. 1984. Compartmentalization: a conceptual framework for understanding how trees grow and defend themselves! *Annual Review of Phytopathology* **22**:189-214.

Silva CMMS. Melo IS. Oliveira PR. 2005. Ligninolytic enzyme production by *Ganoderma* spp. *Enzyme and Microbial Technology* **37**: 324-329.

Songulashvili G. Elisashvili V. Wasser SP. Nevo E. Hadar Y. 2007. Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes. *Enzyme and Microbial Technology* **41**: 57–61.

Shortle WC. Dudzik KR. 2012. Wood decay in living and dead trees: a pictorial overview. U.S. Forest Service 11 Campus Blvd Suite 200 Publications Distribution. Newtown Square PA 19073 359 Main Road.

Smith BJ. Sivasithamparam K. 2000. Isozymes of *Ganoderma* species from Australia. *Mycological Research* **104**: 952 –961.

SVMA. 2015. Manual Técnico de Arborização Urbana. Prefeitura de São Paulo. 124p.

Teixeira AR. 1995. Método para estudo das hifas do basidiocarpo de fungos poliporáceos. São Paulo. Instituto de Botânica. Manual n° 6.

Terho M. Hallaksela A-M. 2005. Potential hazard characteristics of *Tilia*, *Betula*, and *Acer* trees removed in the Helsinki City Area during 2001–2003. *Urban Forestry & Urban Greening* **3**: 113–120.

Terho M., Hantula J. Hallaksela AM. 2007. Occurrence and decay patterns of common wood-decay fungi in hazardous trees felled in the Helsinki City. *Forest Pathology* **37**: 420–432.

Thiers. B. [continuously updated]. Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. <http://sweetgum.nybg.org/science/ih/>

Tien M. Kirk TK. 1984. Biochemistry Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proceeding of the National Academy of Sciences* **81**: 2280-2284.

Toledo BL de. 2004. São Paulo: três cidades em um século. Ed. Cosac Naify. São Paulo.

Torres-Torres M. Guzmán-Dávalos L. 2012. The morphology of *Ganoderma* species with a laccate surface. *Mycotaxon* **119**: 201-216.

Torres-Torres MG. Guzmán-Dávalos L. Gugliotta AM. 2012. *Ganoderma* in Brazil: known species and new records. *Mycotaxon* **121**: 93–132.

Tozzi AMGA. 2016. Caesalpinioideae In: Tozzi AMGA. Melhem TS. Forero E. Fortuna-Perez AP. Wanderley MGL. Martins SE. Romanini RP. Pirani JR. Fiuza de Melo. MMR. Kirizawa M. Yano O. Cordeiro. I. (eds.) Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. Instituto de Botânica. São Paulo. vol. 8. p. 32.

Vanholme. R., Demedts. B., Morreel. K., Ralph. J., Boerjan. W. 2010. Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiology* 153: 895–90.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds). *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press. New York, pp. 315-322.

Zhang YHP, Lynd LR. 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and Bioengineering* **88(7)**: 797-824.

Zhou LW, Cao Y, Wu SH, Vlasak J, Li DW, Li MJ, Dai YC. 2015. Global diversity of the *Ganoderma lucidum* complex (Ganodermataceae, Polyporales) inferred from morphology and multilocus phylogeny. *Phytochemistry* **114**: 7-15.

Zhou X-W, Cong W-R, Su K-Q, Zhang Y-M. 2012. Ligninolytic enzymes from *Ganoderma* spp.: Current status and potential applications. *Critical Reviews in Microbiology* 1-11.

ANEXO A. Dados fitossanitários das espécies arbóreas de sibipiruna removidas

Árvore 1: removida da área interna do IPT. Cidade Universitária (linhagem CCIBt 4166).

Árvore 2: removida na Rua Ocarina. 52. Jabaquara (CCIBt 4175).

Árvore 3: removida da R. Cel. José Pires de Andrade. 4178. Ipiranga (CCIBt 4178).

São Paulo. XX de julho de 2013.

Ofício Nº xx IPT/2013

**SUBPREFEITURA BUTANTÃ
UNIDADE DE ÁREAS VERDES**

Assunto: Autorização para remoção de árvore
Local: Área interna - IPT

Sr. Coordenador.

Temos na área interna do Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT) uma sibipiruna (Figura 1A) com cerca de 13.0 m de altura, 15.0 m de diâmetro de copa, 0.75m de diâmetro à altura do peito (DAP), leve inclinação do tronco e copa desequilibrada em direção ao leito carroçável (Av. Politécnica), com galhos próximos da rede primária de fiação. Informamos que na análise externa foi constatada a presença de ferida com apodrecimento intenso no colo (figura 1B) e corpo de frutificação no fuste e raiz (Figuras 1C e D) identificado como *Ganoderma* sp., que é um fungo decompositor de madeira. Para verificar o estado fitossanitário do lenho, foram realizadas análises internas no fuste através de prospecção e tomografia. Na análise tomográfica, observamos que o exemplar arbóreo apresenta uma deterioração interna de 84% e 55%, a 0.80m e 1.50m do solo, respectivamente. A prospecção confirma a deterioração indicada pela tomografia. Com os resultados obtidos, constatamos o alto risco de queda do exemplar.

Com o presente, solicitamos **autorização para supressão** do exemplar arbóreo com a brevidade que o caso requer, tendo em vista a sua inclinação para a Av. Politécnica.

Agradecemos antecipadamente.

Atenciosamente.

DR. SÉRGIO BRAZOLIN
IPT

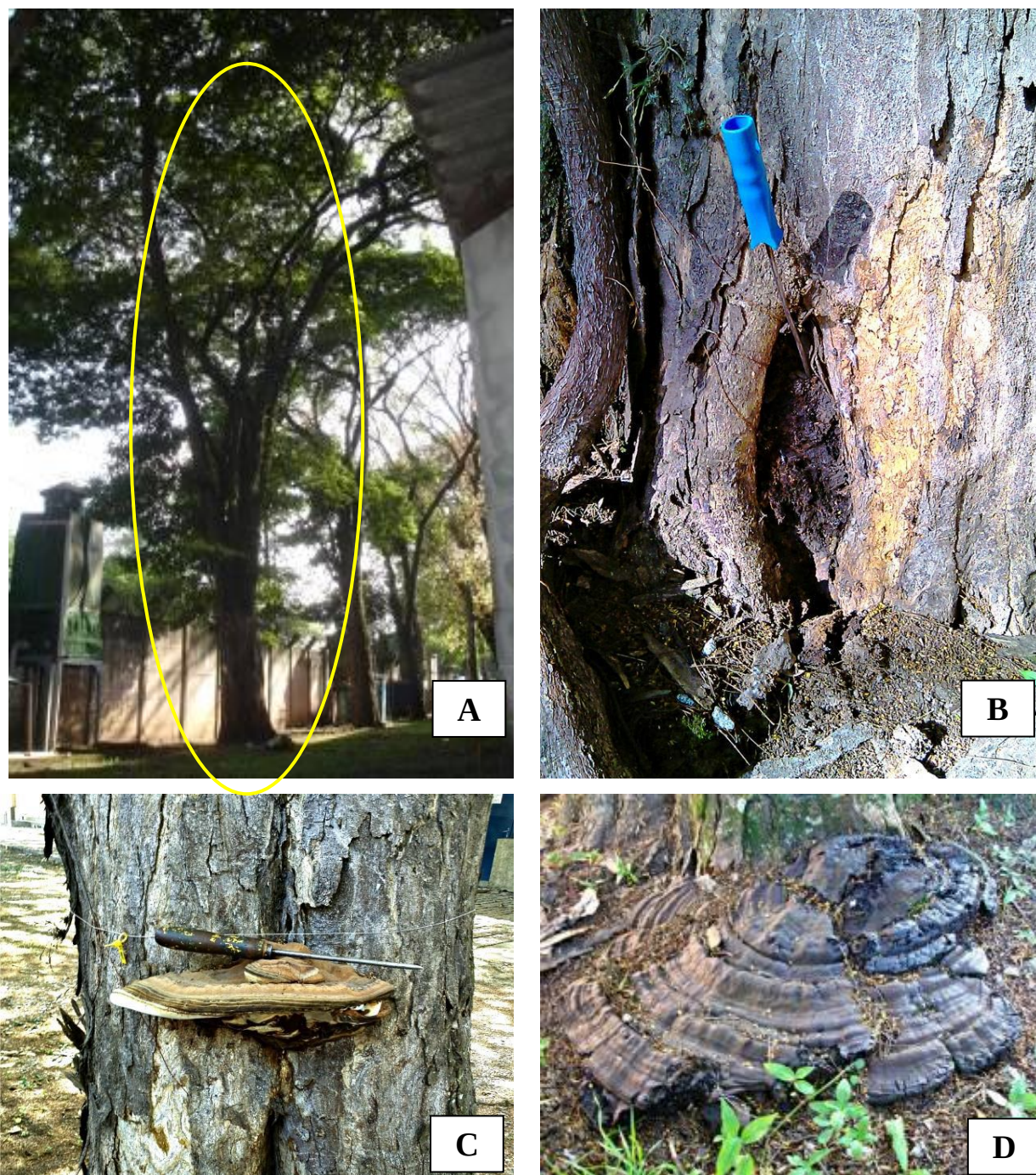


Figura 1 – A): Árvore para supressão; B): ferida com apodrecimento intenso; C): Basidioma de *Ganoderma* sp. no fuste; e D): Basidioma de *Ganoderma* sp. na raiz.



DATA DE EMISSÃO: 15/12/2016

LAUDO TÉCNICO

CÓDIGO DA ÁRVORE: 148440-8

RESPONSÁVEL

DATA: 24/3/2015 00:00:00

RESPONSÁVEL: TÁCITO L. TOFFOLO DOS SANTOS

ENDEREÇO

LOGRADOURO: RUA OCARINA - ALTURA: De 1 a 291 OU de 2 a 290 - SPJA NÚMERO: 52

ESTIMADO: NÃO BAIRRO: VILA GUARANI

DISTRITO: JABAQUARA

SUBPREFEITURA: SUBPREFEITURA DO JABAQUARA

GEOREFERENCIAMENTO

DISTÂNCIA DA ESQUINA: 48,5 M DISTÂNCIA DO ALINHAMENTO DO LOTE: 2,4 M

REFERÊNCIA: RUA OURICANA

CONDIÇÕES DO ENTORNO

TIPO DE VIA: VIA LOCAL

TIPO DE EDIFICAÇÃO: RESIDENCIAL RECUO: SIM

LOCALIZAÇÃO: PASSEIO PÚBLICO

LOCALIZAÇÃO NO PASSEIO PÚBLICO:

JUNTO AO MEIO FIO

SEM ALINHAMENTO E/OU GUIA: NÃO LARGURA DO PASSEIO: 2,4 M TIPO DE PAVIMENTO: CIMENTADO

LEVANTAMENTO DO PAVIMENTO: NÃO

CANTEIRO

TIPO DE CANTEIRO: CANTEIRO EM NÍVEL COM BORDA LARGURA: 1,27 M COMPRIMENTO: 1,56 M

VEGETAÇÃO INTERFERENTE: NÃO PROTETOR/TUTOR: SEM PROTETOR

PERMEABILIDADE

LARGURA: 1,15 M COMPRIMENTO: 1,39 M

ESPECIFICAÇÃO

ÁRVORE MORTA: NÃO GÊNERO: CAESALPINIA

ESPÉCIE: PELTOPHOROIDES

FAMÍLIA: LEGUMINOSAE

CAESALPINIA

NOME CIENTÍFICO: PELTOPHOROIDES

NOME POPULAR: SIBIPIRUNA

PORTE POTENCIAL ESTIMADO: GRANDE

DIÂMETRO A ALTURA DO PEITO (DAP) POTENCIAL ESTIMADO: 1 M

EXSICATA: NÃO ORIGEM: INDETERMINADA

CARACTERÍSTICAS DENDROMÉTRICAS

PERÍMETRO DO COLO (PC): 1,6 M DIÂMETRO DO COLO (DC): 0,509 M PERÍMETRO A ALTURA DO PEITO (PAP): 1,54 M

DIÂMETRO A ALTURA DO PEITO (DAP): 0,49 M ALTURA DA PRIMEIRA RAMIFICAÇÃO (APR): 1,85 M ALTURA DA ÁRVORE: 9 M

DIÂMETRO DA COPA: 9,8 M INCLINAÇÃO: SEM/PEQUENA INCLINAÇÃO

AValiação DO SISTEMA RADICULAR

INTERFERÊNCIAS NO SISTEMA RADICULAR:

BARREIRA FÍSICA DO CANTEIRO

DIAGNÓSTICO DO SISTEMA RADICULAR:

SEM DANO APARENTE: NÃO

INJÚRIA MECÂNICA: SIM

SISTEMA RADICULAR EXPOSTO NÃO CARACTERÍSTICO DA ESPÉCIE X: SIM

BROTO LADRÃO: NÃO

RAÍZ CORTADA: SIM

RAÍZ DOBRADA/ENovelada: SIM

SANIDADE BIOLÓGICA DO SISTEMA RADICULAR: APARENTEMENTE SADIa

PROXIMIDADE AO COLO: NÃO

AValiação DO COLO

DIAGNÓSTICO DO COLO:

SEM DANO APARENTE: NÃO

INJÚRIA MECÂNICA: INJÚRIA MECÂNICA OUTROS

BROTO LADRÃO: NÃO

DENDROCIRURGIA: NÃO

COLO SOTERRADO: NÃO

SANIDADE BIOLÓGICA DO COLO: DETERIORADA

FUNGO:

Desc.Tipo de Fungo	Ataque Tipo	Desc.Fungo	Desc.Espécie	Corpo.Frutificação
PODRIDÃO BRANCA	Intenso	coleta feita por bióloga do IBOT Luci Kimie Okino Silva	Ganoderma sp.	Sim

FORMIGA:

Desc.Espécie	Desc.Formiga

OUTRO ORGANISMO FITOPATOGÊNICO:

Desc.Outro Organismo

AVALIAÇÃO DO TRONCO

DIAGNÓSTICO DO TRONCO:

SEM DANO APARENTE: NÃO

INJÚRIA MECÂNICA: INJÚRIA MECÂNICA OUTROS

BROTO LADRÃO: NÃO

DENDROCIRURGIA: NÃO

SANIDADE BIOLÓGICA DO TRONCO: DETERIORADA

EXSUDAÇÃO DE SEIVA: NÃO

CASCA INCLUSA: NÃO

PROTUBERÂNCIA: NÃO

PORCENTAGEM SECO: 20 %

FUNGO:

Desc.Tipo de Fungo	Ataque Tipo	Desc.Fungo	Desc.Espécie	Corpo Frutificação
PODRIDÃO BRANCA	Intenso			Não

FORMIGA:

Desc.Espécie	Desc.Formiga

AVALIAÇÃO DA COPA

INTERFERÊNCIAS NA COPA:

REDE DE ENERGIA ELÉTRICA (rede secundária)
TELECOMUNICAÇÕES
TV A CABO

DIAGNÓSTICO DA COPA:

INJÚRIA MECÂNICA: SIM

RAMOS CRUZADOS: SIM

RAMOS SECOS/PODRES: NÃO

EPÍFITAS: SIM

MÁ FORMAÇÃO: NÃO

ERVA DE PASSARINHO: NÃO

FIOS DE OVOS: NÃO

FIGUEIRA MATA-PAU:

NÃO

COPA DESEQUILIBRADA: Sim

DIREÇÃO DO DESEQUILÍBRIO: LEITO CARROÇÁVEL

PODA:

DRÁSTICA: NÃO

INADEQUADA LATERAL: SIM

INADEQUADA: SIM

INADEQUADA V: SIM

SANIDADE BIOLÓGICA DA PRIMEIRA BIFURCAÇÃO: APARENTEMENTE SADIO

SANIDADE BIOLÓGICA DA COPA: DETERIORADA

OUTROS MACROORGANISMOS: Sim

AÇÃO FITOPATOGÊNICA: Sim

OBSERVAÇÕES FENOLÓGICAS:

FOLHAS: SIM

FLORES: NÃO

FRUTOS E/OU SEMENTES: SIM

AVALIAÇÃO GERAL

ESTADO GERAL: MAU

RISCO DE QUEDA: GRANDE

RECOMENDAÇÕES:

REMOÇÃO POR SUPRESSÃO
PASSÍVEL DE SUBSTITUIÇÃO
ADEQUAÇÃO DO CANTEIRO
AMPLIAÇÃO DO CANTEIRO

OBSERVAÇÃO: ENQUADRAMENTO LEGAL: LEI MUNICIPAL 10365/87, CAP.II, PARÁGRAFO ÚNICO, ARTIGO 11, INCISO II E III.

RELATÓRIO FOTOGRÁFICO:

Detalhe do canteiro



Vista geral



Vista geral



Detalhe do colo



Detalhe do tronco

TÁCITO L. TOFFOLO DOS SANTOS
RF: 782.568-4

RESPONSÁVEL E ENDEREÇO *NÚMERO DA ÁRVORE (SISGAU) _____ Nº SEQUENCIAL _____
Responsável _____ Data _____
Logradouro AV. CEL. JOSÉ PIRES DE AMARAL Número do lote 309 () estimado
SUBPREFEITURA IPIRANGA

GEORREFERENCIAMENTO
Distância da esquina (m) 10 Distância do alinhamento do lote (m) 2,00
REFERÊNCIA AV. MARTINHO GUEDES

CONDIÇÃO DE ENTORNO
Tipo de edificação (A) cemitério/estacionamento (B) comercial (C) em construção (D) industrial (E) institucional (F) praça/parque/área verde (G) residencial (H) sem construção recuo () sim () não
Localização (A) passeio público (B) outro: _____
Localização no passeio (A) junto ao meio fio (B) outro: _____
Largura do passeio (m) 2,03 Levantamento do pavimento () sim () não
Tipo de calçada verde (A) inexistente (B) outro: _____
Tipo de pavimento (A) sem pavimento (B) bloco autotravante (C) cerâmico (D) cimentado (E) ladrilho hidráulico (F) mosaico português (G) pedra (H) tijolo

CANTEIRO
Tipo de canteiro () em nível sem borda () em nível com borda () elevado altura: _____
Diâmetro (m) _____ Comprimento (m) 1,20 Largura (m) 1,00
Vegetação interferente: () Protetor/Tutor (A) sem protetor (B) outro: _____

PERMEABILIDADE Área permeável () sim () não
Diâmetro (m) _____ Comprimento (m) 1,00 Largura (m) 0,90

ESPECIFICAÇÃO Árvore morta () sim () não
Nome popular SIBIPIRUNA Gênero _____ Espécie _____
Origem (A) indeterminada (B) outro: _____

DISTANCIA DOS ELEMENTOS DE REFERÊNCIA - _____

CARACTERÍSTICAS DENDROMÉTRICAS (medidas em metros)
PAP 1,43 PC 1,52 Alt 1ª bifurcação 3,00 Alt árvore 8 Diâmetro copa 8
Inclinação (A) em direção ao imóvel (B) em direção ao leito carroçável (C) em direção ao passeio público (D) sem/pequena inclinação Ângulo _____

AVALIAÇÃO DO SISTEMA RADICULAR
Interferências (pode haver mais de um lançamento)
(A) sem interferência (B) barreira física do canteiro (C) caixa de inspeção (D) edificações (E) muro (F) poste (G) rede de água (H) rede de água domiciliar (I) rede de energia elétrica domiciliar
(J) rede de energia elétrica primária (K) rede de energia elétrica secundária (L) rede de esgoto (M) rede de esgoto domiciliar (N) rede de gás (O) rede de gás domiciliar (P) telecomunicações (Q) TV a cabo
Diagnóstico (pode haver mais de um lançamento)
(A) sem dano aparente (B) injúria mecânica (C) oco 1- _____ % 2- _____ % (D) broto ladrão (E) sistema radicular exposto não característico da espécie (F) raiz cortada (G) raiz dobrada / enovelada
Sanidade (pode haver mais de um lançamento) () Aparentemente Sadia () Com deterioração () Próxima ao colo
() podridão branca () superficial () ataque () moderado () corpo de frutificação () sim () não
() podridão parda () intenso () coleta () sim () não
() indeterminada () subterrâneo () resíduo () vestígio do túnel () ataque () leve () coleta () sim () não
() madeira seca () dispersão no solo () estrutura do ninho () leve () atividade () moderada () sim () não
() de solo () túnel () intenso () intensa () não
Broca () Formiga () Outros macroorganismos () Outros organismos fitopatogênicos ()

AVALIAÇÃO DO COLO () Prospeção SETOR: _____ h1(m): _____ l(m): _____ p(m): _____
Diagnóstico (pode haver mais de um lançamento)
(A) sem dano aparente (B) injúria mecânica () anelamento () outros (C) broto ladrão (D) dendrocirurgia (E) colo soterrado altura (m) _____ (F) oco 1- _____ % 2- _____ %
Sanidade (pode haver mais de um lançamento) () Aparentemente Sadia () Com deterioração
() podridão branca () superficial () ataque () moderado () corpo de frutificação () sim () não
() podridão parda () intenso () coleta () sim () não
() indeterminada () subterrâneo () resíduo () vestígio do túnel () ataque () leve () coleta () sim () não
() madeira seca () dispersão no solo () estrutura do ninho () leve () atividade () moderada () sim () não
() de solo () túnel () intenso () intensa () não
Broca () Formiga () Outros macroorganismos () Outros organismos fitopatogênicos ()

AVALIAÇÃO DO TRONCO () Prospeção SETOR: _____ h1(m): _____ h2(m): _____ l(m): _____ P(m): _____
Interferências (pode haver mais de um lançamento)
(A) sem interferência (B) abrigo/ ponto de ônibus (C) edificações (D) iluminação pública (E) muro (F) poste (G) rede de energia elétrica domiciliar (H) rede de energia elétrica primária
(I) rede de energia elétrica secundária (J) semáforo (K) sinalização de trânsito (L) telecomunicações (M) transformador (N) TV a cabo

aparente	1- _____ %	2- _____ %	(J) fenda/ rachadura	largura (m) _____	profundidade (m) _____	altura em relação ao colo (m) _____
Sanidade (pode haver mais de um lançamento) () Aparentemente Sadia () Com deterioração						
() podridão branca		() superficial		() sim		() sim
() podridão parda		ataque () moderado		corpo de frutificação		coleta
(X) indeterminada		() intenso		(X) não		(X) não
(X) subterrâneo		() resíduo	(X) vestígio do túnel	ataque		() leve
() madeira seca		() dispersão no solo	() estrutura do ninho	() leve		atividade
() de solo		() túnel		(X) intenso		() moderada
						() intensa
						coleta
						() sim
						() não

Broca () Formiga () Outros macroorganismos () Outros organismos fitopatogênicos ()

AVALIAÇÃO DA COPA

Observações fenológicas (X) folhas () flores () frutos/sementes

(A) sem interferência	(B) abrigo/ ponto de ônibus	(G) edifícios	(D) iluminação pública	(E) muro	(F) poste	(G) rede de energia elétrica domiciliar	(H) rede de energia elétrica primária	(I) rede de energia elétrica deslocada
(J) rede de energia elétrica secundária	(K) semáforo	(L) sinalização de trânsito	(M) telecomunicações	(N) transformador	(O) trânsito de pedestres	(P) trânsito de veículos	(Q) TV a cabo	

Diagnóstico

(A) sem dano aparente	(B) injúria mecânica	(C) focos	(D) ramos cruzados	(E) ramos secos/ podres	(F) epífitas	(G) má formação	(H) copa desequilibrada	direção () imóvel () leito carroçável () passeio
(I) poda drástica	(J) poda inadequada lateral	(K) poda inadequada	(L) poda inadequada em "V"	(M) erva de passarinho	(N) fios de ovos	(O) figueira mata pau		

Sanidade acima da 1ª bifurcação

(A) aparentemente sadia	(B) () madeira seca cupim	(C) broca	(D) lagarta	(E) outros macroorganismos	(F) ação fitopatogênica
-------------------------	----------------------------	-----------	-------------	----------------------------	-------------------------

Sanidade galhos 1ª bifurcação

() podridão branca		() superficial		() sim		() sim	
() podridão parda		ataque () moderado		corpo de frutificação		coleta	
(X) indeterminada		(X) intenso		(X) não		(X) não	
(X) subterrâneo		() resíduo	(X) vestígio do túnel	ataque		() leve	coleta
() madeira seca		() dispersão no solo	() estrutura do ninho	() leve		atividade	() moderada
() de solo		(X) túnel		(X) intenso		() intensa	(X) não

Broca () Formiga ()

AVALIAÇÃO GERAL

Situação da árvore

(A) bueiro/ boca de lobo/ leão	(B) esquina	(C) faixa de pedestres	(D) galeria de águas pluviais	(E) galeria de esgotos	(F) hidrante	(G) leito carroçável/sarjeta/ guia/passeio/muro/ edificação	(H) poço de visita	(I) semáforo
--------------------------------	-------------	------------------------	-------------------------------	------------------------	--------------	---	--------------------	--------------

ESTADO GERAL

(A) bom	(B) mau	(C) regular
---------	---------	-------------

RECOMENDAÇÕES

(A) avaliação técnica especializada

(B) tratamento fitossanitário

(C) poda de limpeza (D) poda corretiva (E) poda de levantamento (F) poda de condução (G) poda de adequação

(H) remoção por supressão (X) passível de substituição () sem substituição

(I) remoção por transplante () passível de substituição () sem substituição

(J) remoção vegetação parasita

(K) remoção vegetação interferente (INSERIR DADOS NO CAMPO OBSERVAÇÕES)

(L) adequação do elemento urbano

(M) adequação do canteiro () ampliação do canteiro () retirada da mureta () remoção do solo () construção de mureta

(N) monitoramento

() estado fitossanitário () interferência com elementos urbanos () inclinação da árvore () compatibilidade com o espaço físico () biodeterioração por organismos xilófagos () outros

(O) controle de organismos xilófagos () cupins subterrâneos ou de solo () brocas de madeira () fungos apodrecedores () inspeção da eficácia do tratamento

(P) realização de análise de risco de queda

(Q) outros

Risco de queda () pequeno () médio () grande

Presença de abelhas, vespas, marimbondos ou outros () sim () não

Presença de ninhos/nidificação () sim () não

OBSERVAÇÕES:

Vegetação interferente: nome popular _____ nome científico _____ PAP (m) _____ DAP (m) _____

II e III - GP / REMOÇÃO IMEDIATA - Há sinais de que a árvore sofreu rebolamento de copa no passado e tratamento de cupim (Borcas e tampas e oclusos) também há muitos anos. Suspeita-se a mesma tem sido acometida por fogo na região do colo e tronco.

Patrimônio Ambiental () Carta () CONPRES () CONDEPHAAT ()

ANEXO B. Dados estatísticos da análise de variância.

Modelo Linear Generalizado: Lacases versus fungo; substrato; tempo

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
fungo	Fixo	14	1.15;1.16;10.13;2.15;21.13;28-13;3.16;32.13;33.13; 4.15;48.13; 5.15; 6.15; 8.15
substrato	Fixo	2	1; 2
tempo	Fixo	4	7; 14; 21; 28

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
fungo	13	4.4160	0.33970	19.75	0.000
substrato	1	0.5103	0.51027	29.67	0.000
tempo	3	5.9325	1.97752	114.98	0.000
fungo*substrato	13	0.4567	0.03513	2.04	0.018
fungo*tempo	39	6.3437	0.16266	9.46	0.000
Erro	266	4.5748	0.01720		
Falta de ajuste	42	3.3027	0.07863	13.85	0.000
Erro puro	224	1.2721	0.00568	*	*
Total	335	22.2340			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0.131142	79.42%	74.09%	67.17%

Modelo Linear Generalizado: Peroxidases totais versus fungo; substrato; tempo

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
fungo	Fixo	14	1.15;1.16;10.13;2.15;21.13;28-13;3.16;32.13;33.13; 4.15;48.13; 5.15; 6.15; 8.15
substrato	Fixo	2	1; 2
tempo	Fixo	4	7; 14; 21; 28

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
fungo	13	5.0656	0.38966	14.13	0.000
substrato	1	0.8481	0.84810	30.76	0.000
tempo	3	4.6609	1.55364	56.35	0.000

fungo*substrato	13	1.2004	0.09234	3.35	0.000
fungo*tempo	39	6.2520	0.16031	5.81	0.000
Erro	266	7.3343	0.02757		
Falta de ajuste	42	5.3200	0.12667	14.09	0.000
Erro puro	224	2.0143	0.00899	*	*
Total	335	25.3614			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0.166050	71.08%	63.58%	53.86%

Modelo Linear Generalizado: MnPs versus fungo; substrato; tempo

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
fungo	Fixo	14	1.15;1.16;10.13;2.15;21.13;28-13;3.16;32.13;33.13; 4.15;48.13; 5.15; 6.15; 8.15
substrato	Fixo	2	1; 2
tempo	Fixo	4	7; 14; 21; 28

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
fungo	13	2.6944	0.207265	15.11	0.000
substrato	1	0.2789	0.278898	20.33	0.000
tempo	3	0.1690	0.056336	4.11	0.007
fungo*substrato	13	2.6052	0.200402	14.61	0.000
fungo*tempo	39	2.9297	0.075121	5.48	0.000
Erro	266	3.6486	0.013717		
Falta de ajuste	42	3.1141	0.074145	31.07	0.000
Erro puro	224	0.5345	0.002386	*	*
Total	335	12.3259			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0.117118	70.40%	62.72%	52.77%

Modelo Linear Generalizado: Xilanases versus fungo; substrato; tempo

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
-------	------	--------	---------

fungo	Fixo	14	1.15;1.16;10.13;2.15;21.13;28-13;3.16;32.13;33.13; 4.15;48.13; 5.15; 6.15; 8.15
substrato	Fixo	2	1; 2
tempo	Fixo	4	7; 14; 21; 28

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
fungo	13	52.321	4.0247	13.23	0.000
substrato	1	1.229	1.2291	4.04	0.045
tempo	3	8.366	2.7887	9.17	0.000
fungo*substrato	13	3.511	0.2701	0.89	0.566
fungo*tempo	39	57.292	1.4690	4.83	0.000
Erro	266	80.907	0.3042		
Falta de ajuste	42	14.859	0.3538	1.20	0.202
Erro puro	224	66.048	0.2949	*	*
Total	335	203.626			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0.551508	60.27%	49.96%	36.60%

Modelo Linear Generalizado: Endoglucanases versus fungo; substrato; tempo

Informações dos Fatores

Fator	Tipo	Níveis	Valores
fungo	Fixo	14	1.15;1.16;10.13;2.15;21.13;28-13;3.16;32.13;33.13; 4.15;48.13; 5.15; 6.15; 8.15
substrato	Fixo	2	1; 2
tempo	Fixo	4	7; 14; 21; 28

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
fungo	13	7.939	0.61069	22.95	0.000
substrato	1	2.798	2.79838	105.14	0.000
tempo	3	1.404	0.46795	17.58	0.000
fungo*substrato	13	5.869	0.45148	16.96	0.000
fungo*tempo	39	2.333	0.05983	2.25	0.000
Erro	266	7.080	0.02661		
Falta de ajuste	42	2.398	0.05709	2.73	0.000
Erro puro	224	4.682	0.02090	*	*
Total	335	27.423			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0.163140	74.18%	67.49%	58.81%

Modelo Linear Generalizado: Exoglucanases versus fungo; substrato; tempo**Informações dos Fatores****Fator Tipo Níveis Valores**

fungo	Fixo	14	1.15;1.16;10.13;2.15;21.13;28-13;3.16;32.13;33.13; 4.15;48.13; 5.15; 6.15; 8.15
substrato	Fixo	2	1; 2
tempo	Fixo	4	7; 14; 21; 28

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
fungo	13	1.4965	0.11511	3.22	0.000
substrato	1	0.7986	0.79859	22.33	0.000
tempo	3	0.2267	0.07555	2.11	0.099
fungo*substrato	13	1.9127	0.14713	4.11	0.000
fungo*tempo	39	3.4985	0.08970	2.51	0.000
Erro	266	9.5138	0.03577		
Falta de ajuste	42	3.2218	0.07671	2.73	0.000
Erro puro	224	6.2920	0.02809	*	*
Total	335	17.4467			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0.189120	45.47%	31.32%	12.99%