

Inibição do fungo *Colletotrichum lindemuthianum* na presença de diferentes concentrações de sorbato de potássio

Fernanda Engel¹

Antônio Azeredo Coutinho Neto²

Resumo

Um dos grandes problemas do cultivo vegetal *in vitro* é causado por contaminações como as fúngicas, que representam grandes perdas para os laboratórios de cultivo vegetal. Diante da problemática acerca das contaminações e das lacunas em protocolos eficientes de desinfecção, o presente estudo teve como objetivo avaliar a inibição do fungo *Colletotrichum lindemuthianum* na presença do conservante alimentar Sorbato de Potássio em diferentes concentrações (T1: controle, T2: 0,076 g L⁻¹; T3: 0,15 g L⁻¹; T4: 0,30 g L⁻¹; T5: 0,45 g L⁻¹; T6: 0,60 g L⁻¹ e T7: 0,75 g L⁻¹). Quantificaram-se as análises da Porcentagem de Inibição do Crescimento Micelial (PIC) e o crescimento em 24 e 72 horas em diferentes concentrações. Observou-se que o Sorbato de Potássio foi efetivo na análise de PIC nas diferentes concentrações com relação ao controle, com maior efetividade para o T4 a T7. As maiores porcentagens de inibição (T5 a T7) tiveram uma taxa de inibição média de 17,5 % em relação ao controle para o período de 72 h, indicando, portanto, que com mais estudos este conservante pode ser utilizado no combate a microrganismos fúngicos no cultivo *in vitro*.

Palavras-chave: Inibição de microrganismos. Contaminação *in vitro*. Inibição fúngica. Crescimento micelial. Conservante alimentar.

Introdução

O desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas de manipulação vegetal *in vitro* contribuem com a produção de espécies vegetais em larga escala e em todas as épocas do ano (LEIFERT; CASSELS, 2003). Estas técnicas consistem na produção de clones de uma planta a partir de um explante, sendo que a completa regeneração de um fragmento a uma planta completa está fundamentada no princípio da totipotência celular e ao final se obterá uma planta que apresentará a mesma constituição genotípica daquela que lhe deu origem (TORRES *et al.*, 2000).

Apesar de inúmeras vantagens encontradas na produção *in vitro* em larga escala, alguns problemas ainda não foram totalmente ou seguramente resolvidos, como é o caso das contaminações, que ocasionam grandes perdas de material vegetal e que constituem possivelmente o principal problema encontrado na cultura de tecidos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; LEIFERT; MORRIS; WAITES, 1994; CASSELS, 2000b). As contaminações podem ocorrer por fungos, leveduras, bactérias, vírus e ainda por parte do operador que manipula o material vegetal (GEORGE, 1993; CASSELS, 2000a). Deste modo, para inibir ou minimizar o problema advindo das contaminações, inúmeros procedimentos e protocolos de

1 Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI). Estudante de Pós Graduação (Doutorado em Ciência e Tecnologia Ambiental). fernanda_engel@hotmail.com.

2 Universidade de São Paulo (USP). Estudante de Pós Graduação (Mestrado em Ciências Biológicas). antonioacneto@biologo.bio.br.

desinfecção são utilizados nos laboratórios de micropropagação *in vitro* (YEPES; ALDWINCKLE, 1994; PIERIK, 1997; VIANA *et al.*, 1997; PASQUAL, 2001; HIRATA; MANCINI-FILHO, 2002; COLOMBO *et al.*, 2004; EMMANUEL *et al.*, 2004).

Uma possibilidade diante da problemática das contaminações é o uso de conservantes alimentares, como é o caso do Sorbato de Potássio ($C_6H_7O_2K$), adicionados ao meio de cultura, tendo em vista que este já é utilizado largamente em diversos alimentos, cosméticos e farmacêuticos para a contenção de microrganismos deteriorantes tais como fungos e seus esporos, bactérias e leveduras (OLIVIER *et al.*, 1998; SUHR; NIELSEN, 2004; GUYNOT *et al.*, 2005; BRASIL, 1999; ESFANDIARI *et al.*, 2013), sendo considerado um produto com ação dose dependente (OLIVIER *et al.*, 1998; FAGUNDES *et al.*, 2013). Possui uma temperatura de decomposição acima de 270 °C, o que favorece o seu uso em meios de cultivo em virtude de sua prévia esterilização (SOFOS, 1995). Sua ação inibitória tem sido atribuída à inibição de enzimas, podendo a substância se acumular na membrana citoplasmática dos microrganismos, interferindo no transporte de substratos e na forforilação oxidativa, resultando no não crescimento micelial e sua esporulação (FREESE; SHEU; GALLIERS, 1973; SOFOS, 1995; FALLIK *et al.*, 1997; PALMER; HORST; LANGHANS, 1997; HEYDARYNIA; VEISSI; SADADI, 2011). Alguns estudos tem demonstrado sua eficácia em plantações, ou seja, na condição *in vivo* (DELIOPOULOS; KETTLEWELL; HARE, 2010; MECTEAU; ARUL; TWEDDELL, 2002), e estudos que utilizam o Sorbato de Potássio ou seus derivados como inibidores de microrganismos *in vitro* são escassos. Em virtude desta lacuna, este artigo teve como objetivo avaliar a inibição de um fungo (*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Briosi & Cavara 1889 em presença de diferentes concentrações de sorbato de potássio, com vistas no seu uso no cultivo vegetal *in vitro*.

Material e métodos

Escolha do conservante alimentar Sorbato de Potássio

A escolha deste conservante alimentar foi devido ao fato do mesmo já ser utilizado na área alimentícia, cosmética e farmacêutica, possuir fácil obtenção, ter um custo acessível e possuir temperatura de decomposição acima de 270°C e desta forma, se manter estável durante o processo de autoclavagem, bem como apresentar uma versatilidade quanto ao largo espectro de microrganismos cujo crescimento é inibido (BRASIL, 1999; GUYNOT *et al.*, 2005; ESFANDIARI *et al.*, 2013), tendo em vista a gama de microrganismos que ocorrem *in vitro* e, ainda, por apresentar baixos níveis de toxicidade humana, apresentando dose letal mediana de 500g em um adulto (OLIVIER *et al.*, 1998).

Isolamento, escolha e meio de cultura do fungo *C. lindemuthianum*

O fungo fitopatogênico *C. lindemuthianum* foi isolado de lesões existentes no feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Pequenos fragmentos esterilizados das lesões foram coletados e inoculados no centro de placas com meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA), 20 mL e mantidos no escuro a 25 ± 2 °C por 72 horas. Após o isolamento e crescimento nas placas, o fungo foi utilizado nos tratamentos.

A escolha do presente fungo foi pela sua facilidade de isolamento e cultivo, bem como pela literatura mostrar que fungos do gênero *Colletotrichum* infectam várias culturas e algumas são causadoras da doença Antracnose (MUNCH *et al.*, 2008; DAMM *et al.*, 2010). Além das infecções que podem ser observadas na condição *ex vivo*, tais fungos também podem infectar explantes quando inoculados *in vitro* nas mais diferentes espécies de plantas, tornando este fungo bastante recorrente no cultivo *in vitro* (HORNER; AUGUSTIN; FORCELINI, 2001; MARTIN *et al.*, 2003), aproveitando-se do meio nutritivo para seu desenvolvimento (KRISHNA; SINGH, 2007; ANDRADE *et al.*, 2008).

Concentrações de Sorbato de Potássio

Foram feitos meios de cultivo com 6 diferentes concentrações de Sorbato de Potássio da marca Adicel, além do controle. Assim obtiveram-se os seguintes tratamentos: T1: controle; T2: 0,076 g. L⁻¹; T3: 0,15 g. L⁻¹; T4: 0,30 g. L⁻¹; T5: 0,45 g. L⁻¹; T6: 0,60 g. L⁻¹ e T7: 0,75 g. L⁻¹. Estas concentrações basearam-se em trabalhos próprios anteriores que utilizaram o mesmo conservante alimentar no cultivo *in vitro*, e os resultados demonstraram que concentrações acima de 0,75 g. L⁻¹ provocaram a completa oxidação do explante e posterior morte, e deste modo, seu uso ficaria inviável para contenção dos microrganismos para os fins de cultivo.

Estes meios também foram esterilizados ($121 \pm 1^\circ\text{C}$ e 1,1 atm) por 15 minutos em autoclave (Prismatec 18L) e, em seguida, foram colocados em placas de Petri de 9 cm de diâmetro (20 mL por placa) em câmara de fluxo laminar. Foram feitas 3 placas para cada tratamento.

Efeito da inibição do crescimento micelial do fungo *C. lindemuthianum*

Com o auxílio de um furador de 5 mm, obteve-se fragmentos uniformes de 5 mm de diâmetro de meio BDA com os micélios do fungo em crescimento após 72 h do isolamento previamente descrito (MENTEN *et al.*, 1976). Estes discos de meio de cultura contendo os micélios foram inseridos no centro de três placas para cada um dos tratamentos e em três placas sem a presença do sorbato de potássio (controle).

Após a inoculação dos discos, as placas permaneceram em sala de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 12 h por um tempo total de 72 h, tendo em vista que acima deste tempo a placa controle atinge a margem máxima de crescimento dentro do meio de cultura. Realizou-se a medição do diâmetro médio radial do crescimento do fungo a cada 24 horas. A capacidade em Porcentagem de Inibição do Crescimento Micelial (PIC) foi verificada através da equação descrita por Edgington, Khew e Barron (1971), com modificações sugeridas por Menten *et al.* (1976).

O crescimento radial do fungo foi mensurado sempre no mesmo eixo durante o período analisado, tomando como ponto referencial o centro da amostra inoculada no tempo zero. Inferiu-se a partir do centro amostral à borda do crescimento micelial, todos os dias no mesmo horário. Foi demarcado o centro do disco amostral de 5 mm, além disso, foi demarcada sempre a mesma posição para a amostragem dos valores do crescimento micelial até a borda dos micélios ao longo do tempo de teste.

Estatística

Os dados foram logaritimizados para normalização dos valores e submetidos à análise estatística de variância através do Teste de Tukey e ANOVA de um fator no programa estatístico R (OKSANEN; KINDT; BLANCHET, 2013 - R core Team 2014). A representação dos dados foi feita através de gráficos com as médias das triplicatas de cada tratamento e controle, juntamente com o erro padrão das amostras no programa Graphpad Prism Version 5.0.

Resultados e discussão

As diferentes concentrações de sorbato de potássio testadas sobre a porcentagem de inibição micelial, crescimento total (72 h) e taxa de crescimento diário (24 h) demonstraram diferenças significativas ($p < 0,001$) de acordo com a Tabela 1, evidenciando essas diferenças entre o início da inoculação e até as 72 h de cultivo.

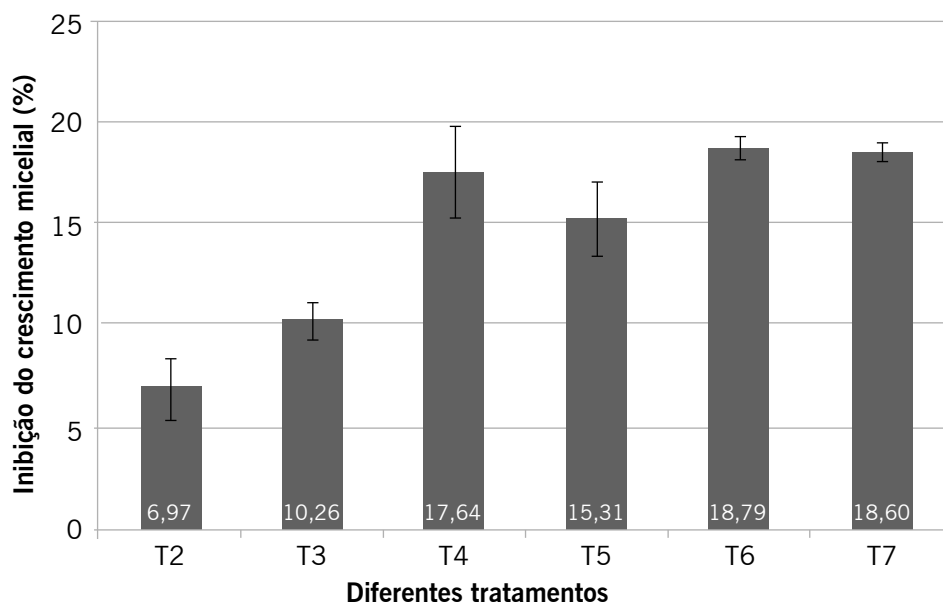
Tabela 1 – Dados referentes à comparação de médias (Tukey) em relação à significância da inibição do crescimento micelial, inibição do crescimento após as 72 h de incubação e a cada 24 h.

Variação	Tratamentos		
	d.f	F	P
Inibição do crescimento micelial	9	35.15	0,000000919
Crescimento após 72 horas de incubação	6	67.95	0,00000000151
Crescimento a cada 24 horas	6	67.95	0,00000000151

Fonte: Elaborado pelos autores na Universidade de São Paulo (2019).

O Sorbato de Potássio é usado para o controle de diferentes espécies fúngicas e seus esporos, com eficácia em algumas concentrações específicas, e sua ação antifúngica tem sido atribuída à inibição de enzimas, interferência no transporte de substratos e na etapa de fosforilação oxidativa (FREESE; SHEU; GALLIERS, 1973; SOFOS, 1995). Sua eficácia também está diretamente relacionada com o pH, sendo que os meios ácidos causam maior inibição no desenvolvimento de fungos, bactérias e leveduras (SOFOS, 1995).

Na Figura 1 é possível verificar que nas menores concentrações (0,076 g L⁻¹ e 0,15 g L⁻¹) houve uma menor inibição do crescimento micelial do fungo *C. lindemuthianum* após 72 h de cultivo *in vitro*, sendo que as maiores porcentagens de inibição ocorreram nas maiores concentrações, sendo 0,30 g L⁻¹; 0,45g L⁻¹; 0,60 g L⁻¹ e 0,75 g L⁻¹ do conservante Sorbato de Potássio.

Figura 1 – Porcentagem de inibição média do crescimento micelial do fungo *C. lindemuthianum* após 72 h de cultivo *in vitro* sob diferentes concentrações de Sorbato de Potássio.

Fonte: Elaborado pelos autores na Universidade de São Paulo (2019).

Alguns poucos estudos e/ou relatórios informam que este conservante é eficaz em concentrações entre 0,5 g L⁻¹ e 3 g L⁻¹ (BRASIL, 1999), não fornecendo a porcentagem de inibição nem mais informações. Mecteau, Arul e Tweddell (2002) realizaram um estudo analisando os diferentes efeitos de sais orgânicos e inorgânicos contra o fungo fitopatogênico *Fusarium sambucinum* causador da podridão em tubérculos de batata. Ao analisar o crescimento micelial e a germinação de esporos,

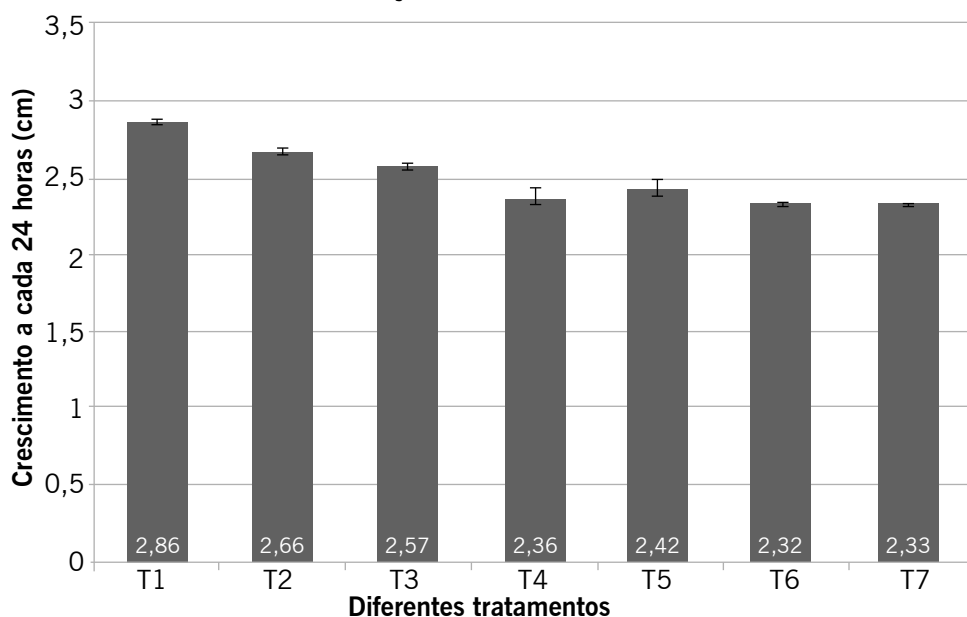
o presente estudo constatou taxas de inibição de 100 % para ambas as condições, ao utilizar a concentração de 30 g L⁻¹ em 24 h de experimento. No presente artigo, na concentração mais elevada (0,75 g L⁻¹), ocorreu uma taxa de inibição de 18,6 % e proporcionalmente a taxa de inibição foi maior, tendo em vista que a concentração utilizada foi menor, bem como o tempo de exposição foi maior (72 h). Embora seja também um fungo fitopatogênico, fica evidenciado que as respostas a nível de concentração variam bastante de um organismo para outro e que concentrações altas aumentam o efeito conforme esperado de um produto dose dependente.

Al Zaemey, Magan e Thompson (1993) verificaram que o Sorbato de Potássio foi eficiente em suprimir completamente o patógeno da banana *Colletotrichum musae* na concentração de 1,25 g L⁻¹ em condições *in vitro*. A maior concentração usada no presente artigo foi de 0,75 g L⁻¹ e esta não foi eficiente em suprimir completamente o presente fungo fitopatogênico pertencente ao mesmo gênero, e isso pode ter ocorrido pela diferença da concentração, que é cerca de 1,6 vezes maior do que a utilizada no presente artigo.

Verificou-se também que na concentração de 1.000 mg L⁻¹ ocorreu 95 % de inibição de fungos que causam a sinusite quando utilizado o Sorbato de Potássio *in vitro*. A concentração mais elevada do presente estudo foi de 750 mg L⁻¹, e a inibição foi bem menor quando comparada com este estudo, tendo em vista, desta vez, nenhuma semelhança quanto ao gênero das espécies testadas (ALSUDANI, 2017).

Com o acompanhamento do crescimento micelial a cada 24 h, observou-se diferença no ganho em centímetros nos intervalos do crescimento total até que a placa fosse coberta com micélios do fungo ao final das 72 h de cultivo. Observaram-se médias menores de crescimento nos dois primeiros tratamentos com 0,076 g L⁻¹ e 0,15 g L⁻¹ (T2 e T3) com relação ao controle e médias de crescimento ainda menores nas concentrações de 0,30 g L⁻¹; 0,45 g L⁻¹; 0,60 g L⁻¹ e 0,75 g L⁻¹ (T4 a T7) de Sorbato de Potássio por litro de meio de cultura BDA (FIGURA 2), evidenciando que as concentrações mais elevadas de Sorbato de Potássio promoveram uma taxa média de crescimento menor.

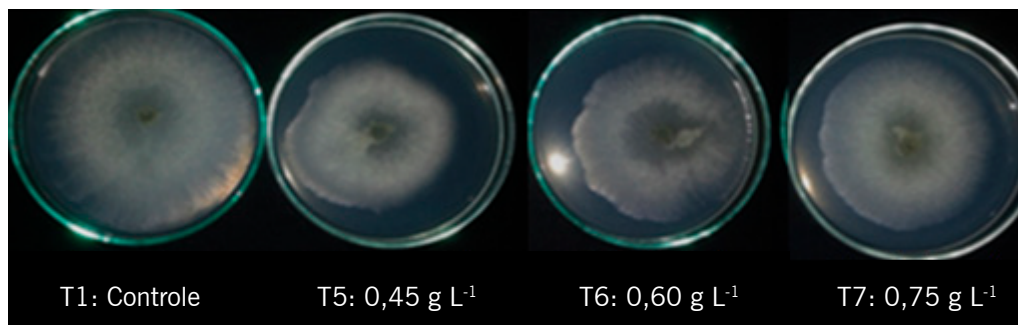
Figura 2 – Crescimento médio em diâmetro (centímetros) do fungo do *C. lindemuthianum* em condição *in vitro* no intervalo de 24 h sob diferentes concentrações de Sorbato de Potássio.



Fonte: Elaborado pelos autores na Universidade de São Paulo (2019).

Verificou-se também que após 72 h do cultivo *in vitro* o fungo *C. lindemuthianum* chegou a colonizar 90 % da placa no T1 (controle) e nas concentrações mais elevadas (T5 a T7: 0,45 g L⁻¹, 0,60 g L⁻¹ e 0,75 g L⁻¹) tal colonização chegou a 70 %, ocasionando, portanto, redução da colonização da placa de 20 % (FIGURA 3).

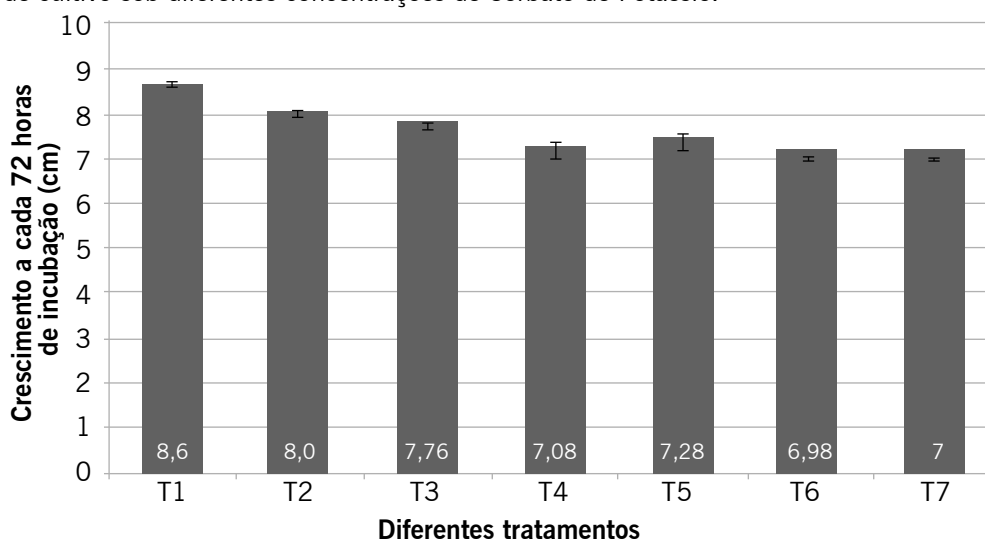
Figura 3 – Comparação do crescimento micelial após 72 h de cultivo *in vitro* das placas T1, T5, T6 e T7 respectivamente, evidenciando a diminuição da colonização do fungo *C. lindemuthianum* em presença de Sorbato de Potássio.



Fonte: Elaborado pelos autores na Universidade de São Paulo (2019).

Estes resultados foram obtidos a partir da média do crescimento total do presente fungo após as 72 h de cultivo (FIGURA 4).

Figura 4 – Comparação do crescimento micelial médio em diâmetro (centímetros) do fungo *C. lindemuthianum* após 72 h de cultivo sob diferentes concentrações de Sorbato de Potássio.



Fonte: Elaborado pelos autores na Universidade de São Paulo (2019).

Salienta-se que, embora a placa tenha sido colonizada pelo fungo mesmo na concentração mais elevada de Sorbato de Potássio (0,75 g L⁻¹), é de conhecimento que quando se manipula um explante no cultivo *in vitro* a contaminação ocorre em proporções muito menores das praticadas no presente estudo, tendo em vista todos os processos de assepsia que são realizados previamente conforme estudos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; MORAES *et al.*, 2007). Deste modo, sugere-se que com a assepsia

realizada previamente e com os demais cuidados que devem ser adotados durante os cultivos e as fases seguintes de multiplicação (repiques), a porcentagem de inibição certamente pode ser muito acima dos 20 % observados, podendo até mesmo resultar em um material livre de contaminação.

Já se sabe que existem diversas alternativas no controle das contaminações fúngicas no cultivo *in vitro*, como os citados anteriormente e com relação ao seu uso nos meios de cultivo, estudos revelaram que o uso de alguns fungicidas tais como Benomil, Clorotalonil e Azoxistrobina demonstraram efeitos letais para explantes de uma espécie de orquídea e eucalipto até mesmo nas concentrações mais baixas estudadas, evidenciando também suas características tóxicas para o ambiente (WATT; GAUNTLETT; BLAKEWAY, 1996; ODA *et al.*, 2003), e, portanto, o Sorbato de Potássio pode vir a somar como uma estratégia no combate a fungos observados *in vitro*, pelas características já apresentadas.

Desta forma, tendo em vista que ainda existem algumas lacunas nos processos de desinfecção para multiplicação *in vitro*, bem como riscos e inviabilidade em se utilizar fungicidas comerciais para o combate das contaminações fúngicas *in vitro*, o conservante alimentar Sorbato de Potássio pode ser um produto a ser utilizado no controle do desenvolvimento de fungos em culturas vegetais em estágio de multiplicação *in vitro*, haja vista os resultados apresentados, podendo auxiliar em uma diminuição significativa de perdas de material vegetal em virtude da contaminação, o que, em alguns casos, pode causar o insucesso da multiplicação *in vitro* de espécies vegetais com consequente perda comercial, bem como a inviabilidade destes laboratórios de cultivo celular *in vitro* (CASSELS, 1991; CASSELLS, 1997).

Conclusões

Os tratamentos de T4 a T7 tiveram desempenhos de inibição estatisticamente iguais e superiores em relação aos tratamentos T2 e T3. As maiores porcentagens de inibição ocorreram do T5 ao T7, com taxa de inibição média de 17,5 % para o período de 72 h, embora o aumento de concentração de Sorbato de Potássio ocasionou também uma maior porcentagem de inibição, independentemente do tempo, em todos os tratamentos.

O presente estudo indicou que o Sorbato de Potássio pode fornecer um controle do fungo *C. lindemuthianum*, e, no entanto, mais informações sobre suas atividades antifúngicas no combate de microrganismos *in vitro* correlacionadas com o cultivo celular vegetal precisam ser elucidadas.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelas bolsas concedidas durante a realização desta pesquisa.

Inhibition of the fungus *Colletotrichum lindemuthianum* in the presence of different potassium sorbate concentrations.

Abstract

One of the major problems of *in vitro* plant cultivation is caused by contaminations such as fungal, which represent great losses for plant cultivation laboratories. In view of the problem about contamination and gaps in efficient disinfection protocols, the present study aimed to evaluate the inhibition of the

fungus *Colletotrichum lindemuthianum* in the presence of the potassium sorbate food preservative at different concentrations (0 g L⁻¹; 0.076 g L⁻¹; 0.15 g L⁻¹; 0.30 g L⁻¹; 0.45 g L⁻¹; 0.60 g L⁻¹ and 0.75 g L⁻¹). The analyses of the Percentage of Micelial Growth Inhibition (ICP) and the growth at 24 hours and 72 hours at different concentrations were quantified. It was observed that Potassium Sorbate was effective in the analysis of ICP at different concentrations in relation to control, with greater effectiveness for T4 to T7. The highest percentages of inhibition (T5 to T7) presenting an inhibition rate of mean mycelial growth of 17.5 % in relation to the control for the 72 h period, indicating, therefore, that with further studies this preservative can be used to combat fungal microorganisms *in vitro* culture.

Keywords: Inhibition. Microorganism. In vitro contamination. Fungal inhibition. Mycelial growth. Food preservative.

Referências

AL ZAEMEY, A. B.; MAGAN, N.; THOMPSON, A. K. Studies on the effect of fruit-coating polymers and organic acids on growth of *Colletotrichum musae* in vitro and on postharvest control of anthracnose of bananas. **Mycological Research**, v. 97, n. 12, p. 1463-1468, 1993. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80218-9](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80218-9).

ALSUDANI, A. A. In vitro antifungal effect of potassium sorbate and sodium benzoate on the growth of fungi causing sinusitis. **African Journal of Microbiology Research**, v. 11, n. 6, p. 232-236, 2017. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJMR2016.8414>.

ANDRADE, S. R. M.; OLIVEIRA, W. C.; REIS JUNIOR, F. B.; CHARCHAR, M. J. D. A.; FALEIRO, F. G.; MEHTA, A.; PEIXOTO, J. R. **Controle do crescimento e identificação de microrganismos contaminantes visando à micropropagação de gemas laterais de mangueira**. Planaltina: Embrapa Cerrados. 2008. 28p.

BRASIL. Resolução RDC n.389, de 05 de agosto de 1999. 16: bebidas - subcategoria 16.2.2 - bebidas não alcoólicas gaseificadas e não gaseificadas. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Distrito Federal, Brasil. Seção 1. 45-53.

CASSELLS, A. C. **Contamination and its impact in tissue culture. IV International symposium on in vitro culture and horticultural breeding**, 560, 2000a.

CASSELLS, A. C. 1991. Problems in tissue culture: culture contamination. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.). **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p. 31-44.

CASSELLS, A. C. Aseptic microhydroponics: a strategy to advance microplant development and improve microplant physiology. *Acta Horticulturae*, v. 530, p. 187-194, 2000b. DOI: 10.17660/ActaHortic.2000.530.21.

CASSELLS, A. C. **Pathogen and microbial contamination management in micropropagation**. Dordrecht: Springer, 1997. 371 p.

COLOMBO, L. A.; FARIA, R. T.; CARVALHO, J. F. R. P.; ASSIS, A. M.; FONSECA, I. C. B. Influência do fungicida clorotalonil no desenvolvimento vegetativo e enraizamento in vitro de duas espécies

de orquídeas brasileiras. **Acta Horticulturae**, v. 26. n. 2, p. 253-258, 2004. DOI: <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v26i2.1893>.

DAMM, U.; BARONCELLI, R.; CAI, L.; KUBO, Y.; O'CONNELL, R.; WEIR, B.; CANNON, P. F. *Colletotrichum*: species, ecology and interactions. **IMA Fungus**, v. 1, n. 2, p. 161-165, 2010. DOI: [10.5598/imafungus.2010.01.02.08](https://doi.org/10.5598/imafungus.2010.01.02.08).

DELIOPOULOS, T.; KETTLEWELL, P. S.; HARE, M. C. Fungal disease suppression by inorganic salts: A review. **Crop Protection**, v. 29, p. 1059-1075, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.05.011>.

EDGINGTON, L. V.; KHEW, K. L & BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazoles compounds. **Phytopathology**, v. 61, p. 42-44, 1971.

EMMANUEL, E.; HECK, G.; BLANCHARD, J.; VERMANDE, P.; PERRODIN, Y. Toxicological effects of disinfestations using sodium hypochlorite on aquatic organisms and its contribution to AOX formation in hospital wastewater. **Environment Internacional**, v. 30, p. 891-900, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2004.02.004>.

ESFANDIARI, Z.; BADIEY, M.; MAHMOODIAN, P.; SARHANG-POUR, R.; YAZDANI, E.; MIRLOHI, M. Simultaneous determination of sodium benzoate, potassium sorbate and natamycin content in Iranian yoghurt drink (Doogh) and the associated risk of their intake through Doogh consumption. **Iranian Journal of Public Health**, v. 42, p. 915-920, 2013.

FAGUNDES, C.; PÉREZ, M. B.; MONTEIRO, A. R.; PALOU, L. Antifungal activity of food additives in vitro and as ingredients of hydroxypropyl methylcellulose lipid edible coatings against *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata* on cherry tomato fruit. **International Journal of Food Microbiology**, v. 166, p. 391-398, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.001>.

FALLIK, E.; ZIV, O.; GRINBERG, S.; ALKALAI, S.; KLEIN, J. D. Bicarbonate solutions control powdery mildew (*Leveillula taurica*) on sweet red pepper and reduce the development of postharvest fruit rotting. **Phytoparasitica**, v. 25, p. 41-43, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02981478>.

FREESE, E.; SHEU, C. W.; GALLIERS, E. Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. **Nature**, v. 241, p. 321-325, 1973. DOI: <https://doi.org/10.1038/241321a0>.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. 2. ed. Edington: Exegetics, 1993. 574p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa/SPI, 1998. p. 183-260.

GUYNOT, M. E.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V.; MARIN, S. Study of benzoate, propionate, and sorbate salts as mould spoilage inhibitors on intermediate moisture bakery products of low pH (4.5- 5.5). **International Journal of Food. Microbiology**, v. 101, p. 161-168, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.003>.

HEYDARYINIA, A.; VEISSI, M.; SADADI, A. A comparative study of the effects of the two preservatives, sodium benzoate and potassium sorbate on *Aspergillus niger* and *Penicillium notatum*. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 301-307, 2011.

HIRATA, M. H.; MANCINI-FILHO, J. **Manual de biossegurança**. Barueri: Manole, 2002. 496p.

HORNER, L. de A.; AUGUSTIN, L.; FORCELINI, C. A. Estudo do desenvolvimento e identificação dos agentes contaminantes da erva-mate cultivada in vitro. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA MATE, 2.; REUNIÃO TÉCNICA DA ERVA MATE, 3. 2000. Encantado. **Anais...** Porto Alegre: Comissão dos Organizadores; Universidade do Rio Grande do Sul; Fundação de Pesquisa Agropecuária, 2001. p. 453-456.

KRISHNA, H.; SINGH, S. K. Biotechnological advances in mango (*Mangifera indica* L.) and their future implications in crop improvement – A review. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 223-243, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.01.001>.

LEIFERT, C.; CASSELLS, A. C. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. **In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 37, p. 133-138, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11627-001-0025-y>.

LEIFERT, C.; MORRIS, C. E.; WAITES, W. M. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plants: reason for contamination problems in vitro. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 13, p. 139-183, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1080/07352689409701912>.

MARTIN, M. C.; SUAREZ, M. A.; PÉREZ, A. C.; MICHEL, L. M.; CAPÓ Y. A. Efecto del carbendazim para el control de *Colletotrichum* sp., contaminante del establecimiento in vitro de callos de café. **Biotecnología Vegetal**, v. 3, n. 2, p.111-113, 2003.

MECTEAU, M. R.; ARUL, J.; TWEDDELL, R. J. Effect of organic and inorganic salts on the growth and development of *Fusarium sambucinum*, a causal agent of potato dry rot. **Mycology Research**, v. 106, n. 6, p. 688-696, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0953756202005944>.

MENTEN, J. O. M.; MACHADO, C. C.; MUNISSI, E.; CASTRO, C.; KIMATI, H. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid “in vitro”. **Fitopatologia Brasileira**, v. 1, p. 57-66, 1976.

MORAES, R. M.; CALDAS, L. S.; SILVEIRA, C. E. S.; SOUZA, A. V.; BERTONI, B. W.; PEREIRA, A. M. S. Micropropagação e Banco de Germoplasma “in vitro” para produção e conservação de plantas nativas do Cerrado. In: PEREIRA, A. M. S. (Ed.). **Recursos genéticos e conservação de plantas medicinais do Cerrado**. Ribeirão Preto: Editora Legis Summa, 2007. v. 1, p. 185-214.

MUNCH, S.; LINGNER, U.; FLOSS, D. S.; LUDWIG, N.; SAUER, N.; DEISING, H. B. The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, n. 1, p. 41-51, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.06.008>.

ODA, M. L.; FARIA, R. T.; FONSECA, I. C. B.; SILVA, G. L. Avaliação da fitotoxicidade de fungicidas e germicidas na propagação in vitro de *Oncidium varicosum* Lindl. (Orchidaceae) para o controle de microrganismos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, n. 2, p. 273-276, 2003.

OKSANEN, J.; KINDT, R.; BLANCHET, F. G. 2013 Vegan: community ecology package. R package version 2.0-9. Disponível em: <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>. Acesso em: 26 jan. 2021.

OLIVIER, C.; HALSETH, D. E.; MIZUBUTI, E.; LORIA, R. Postharvest application of organic and inorganic salts for suppression of silver scurf on potato tubers. **Plant Disease**, v. 82, p. 213-217, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.2.213>.

PALMER, C. L.; HORST, R. K.; LANGHANS, R. W. Use of bicarbonates to inhibit in vitro colony growth of *Botrytis cinerea*. **Plant Disease**, v. 81, p. 1432-1438, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.12.1432>.

PASQUAL, M. **Meios de cultura**. Lavras: UFLA-FAEPE, 2001. 74p.

PIERIK, R. L. M. **In vitro culture of higher plants**. 1a ed. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1997. 348p.

R Core Team. 2014. R: a language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria. Disponível em: <http://www.R-project.org/>. Acesso em: 26 jan. 2021.

SOFOS, J. N. Antimicrobial agents. In: MAGA, J. A.; TU, A. T. (Eds.). **Food additive toxicology**. Marcel Dekker, New York, United States, 1995. p. 501-529.

SUHR, K. I.; NIELSEN, P. V. Effect of weak acid preservatives on growth of bakery product spoilage fungi at different water activities and pH values. **International Journal of Food Microbiology**, v. 95, p. 67-78, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.02.004>.

TORRES, A.C.; FERREIRA, A. T.; SÀ, F. G. de.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRIGIDO, M. de M.; ROMANO, E. 2000. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Embrapa Hortaliças, Brasília, 128p.

VIANA, G. R. COUTO, F. A. A.; OLIVEIRA, A. B.; ZAMBOLIM, L.; MARIA, J. A rifampicina na descontaminação bacteriana de explantes de mamoeiro provenientes do campo. **Bragantia**, v. 56, p. 249-254, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0006-87051997000200003>.

WATT, M. P.; GAUNTLETT, B. A.; BLAKEWAY, F. C. Effect of anti-fungal agents on in vitro cultures of *Eucalyptus grandis*. **South African Forestry Journal**, v. 175, n.1, p. 23-27, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1080/00382167.1996.9629889>.

YEPES, M. L.; ALDWINCKLE, H. S. Micropropagation of thirteen Malus cultivars and rootstocks, and effect of antibiotic on proliferation. **Plant Growth Regulation**, v. 15, p. 55-67, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00024677>.

Submetido: 04/06/2020

Aceito: 12/11/2020