

INCIDENCIA DE *Colletotrichum gloeosporioides* SOBRE L'ACIDESA DE L'OLI «IN VITRO»

Garcia Figueres, Francesc

Servei de Laboratoris de Sanitat Agrària del Departament d'Agricultura Ramaderia i Pesca. (D.A.R.P.), C/ 3, Zona Franca 08040 Barcelona .

Nadal Puigdefàbregas, Martí

Dept Biologia Vegetal. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona (UB).

Avgda. Diagonal, 637-647. 08028 Barcelona

Assumpció Moret

Dept Biologia Vegetal. Facultat de Biologia. UB. Avgda. Diagonal, 637-647. 08028 Barcelona

RESUM

La gravetat de la infecció de *C. gloeosporioides* Sacc. & Penz en oliva, es basa en la pèrdua de collita i principalment en un increment de l'acidesa de l'oli obtingut. En aquest treball es posa de manifest que aquest increment d'acidesa, pot estar produït, si més no en part, per la acció directa del fong sobre l'oli ja sintetitzat per l'oliva. S'han dissenyat dues experiències «in vitro», per tal de veure l'efecte del fong sobre oli d'oliva verge, sense la presència de teixit vegetal. D'una banda s'ha incubat el fong amb contacte directe amb l'oli; i per una altra banda, s'han separat el cultiu i l'oli mitjançant un filtre de PTFE de 0.22 µ amb la qual cosa permet el creixement de la colònia difonent només els metabolits a l'oli. En ambdós casos s'ha observat una clara hidròlisi de l'oli.

INTRODUCCIO

Des de fa anys hom considera que la infecció de l'oliva per *Colletotrichum gloeosporioides*, (= *Gloeosporium olivarum*), produeix un increment de l'acidesa de l'oli (Vasco de Garcia, 1949; Mateo-Sagasta, 1967; Jiménez, 1985; Guerrero, 1988, etc.). A més de l'efecte en l'acidesa, aquest fong és responsable d'una característica coloració acaramel·lada de l'oli, en canvi no te gaire incidència directa sobre altres paràmetres com l'Índex de peròxids (Garcia, 1994).

Mateo-Sagasta (1967), va determinar valors d'acidesa del 12% en olives amb una infecció del 100%. obtinguts a partir d'olives a mitja momificació, el que comporta un temps d'incubació considerable i assenyala també que aquests valors van augmentant amb la momificació del fruit, la qual considera completa al cap d'uns dos mesos de l'inici de la infecció.

Malgrat observar la influència d'aquestes infeccions sobre l'oli avaluant olives infectades de forma natural, no s'havia determinat en cap moment si la acció era deguda a una activitat directa del fong o be una acció derivada de la necrosi dels teixits vegetals. Per la qual cosa es van dissenyar unes experiències «in vitro» per tal de veure quina és l'acció real i directa de *Colletotrichum gloeosporioides* (CG) sobre l'oli.

MATERIAL I METODES

Per fer l'avaluació de la incidència de CG en l'oli «un vitro», s'han dissenyat les següents experiències:

– 1. Efecte del creixement fúngic en medi líquid i en contacte directe amb l'oli, en el qual no hi ha formació de colònia miceliana; i efecte d'extractes de cultiu de CG en líquid, prèviament esterilitzat amb filtres de PTFE de 0.22 µ.

– 2. Efecte del creixement micelià en colònia mitjançant la utilització d'un filtre de 47 mm de O de PTFE de 0.22 µ de porus que permet el pas de substàncies però no d'estructures micelians del fong, les quals no estaven en contacte amb l'oli.

L'esquema de treball és el següent:

TESI	MEDI	EXT	DISC	CG	OLI
0	LIQ	-	-	-	X
0'	SOL	-	-	-	X
1	LIQ	X	-	-	X
2	LIQ	-	-	X	X
3	SOL	-	X	-	X
4	SOL	-	X	X	X

MEDI: Medi de cultiu on es fa la incubació:
LIQ: Extracte d'oliva líquid
SOL: Extracte d'oliva-agar
EXT: Extracte de cultiu de CG (estèril)
DISC: Cultiu amb disc de PTFE de 0.22 μ
CG: Presència del fong
OLI: 2 ml. d'oli / incubació

L'extracte d'oliva es va preparar de la manera següent: Es fan bullir 300 grams de polpa triturada amb 1 litre d'aigua destil·lada durant 20 minuts. Mitjançant una gasa estèril es filtra per retenir la polpa i després amb paper de filtre per treure la terbolesa. S'enrasa a 1 L i s'autoclava durant 10 minuts. L'obtenció del Medi-Extracte d'oliva es va fer: 100 ml d'extracte/1 L d'aigua destil·lada estèril + 2 g/L d'extracte de llevats. En el cas del medi sòlid s'afegeix 15 g/L d'agar. La proporció de medi complet amb oli era 1:1.

La preparació dels filtres per al cultiu es va fer submergint-los amb el medi a 50° C , escorrent-los i deixant-los refredar per tal de que el medi solidifiqui sobre el filtre. Els filtres es posaven en contacte, només per la part inferior, amb 2 ml d'oli en plaques de Petri .

La incubació amb CG s'ha realitzat amb inòcul procedent de cultius purs aïllats directament d'olives infectades. En les tesis 0, 1 i 2 s'ha emprat una suspensió d'espores de 50.000 esp/ml., mentre que en les 0', 3 i 4 s'ha emprat un cilindre de medi agaritzat de 5 mm de O i 5 mm d'alçada amb creixement micelià actiu .

Per obtenir l'extracte del cultiu de CG per la tesi 1, es va incubar 1 cilindre de 5 mm de O i 5 mm d'alçada aproximadament per 20 ml de medi de cultiu amb extracte d'oliva. Al cap de 10 dies d'incubació es va procedir a l'extracció del sobrenadant amb filtres estèrils de 0.22 μ , del qual se'n va prendre la quantitat corresponent per fer un cultiu 1:1 amb oli verge. Tot el procediment d'extracció es va fer en fred i la preparació del cultiu va ser ràpida per tal d'evitar la desnaturalització excessiva dels enzims.

L'acidesa s'ha determinat amb el mètode oficial descrit pel M.A.P.A. i els àcids grassos per cromatografia de gasos.

Tan les diferents tesis com els testimonis van estar processats amb les mateixes condicions. Els cultius líquids s'agitaven periòdicament per inversió i els cultius en filtre amb agitació orbital suau.

El mostreig es va dur a terme mitjançant centrifugació i recuperació de l'oli sobrenadant a diferents temps. Es van fer 4 repeticions i les anàlisis es van determinar per duplicat.

RESULTATS I DISCUSSIO

Els valors d'acidesa de la Taula 1, mostren una evolució en el temps paral·lela de l'oli control i del medi amb extracte de cultiu de **CG**, cosa que indica que no hi ha hagut cap activitat enzimàtica capaç d'alterar aquest paràmetre i que per tant, hom pot deduir que els enzims produïts són molt inestables. En canvi, el cultiu que conté el fong, produeix un increment força significatiu a partir dels 3 dies, assolint valors de 6.56% d'acidesa als 30 dies d'incubació. En el cas en que es fa la incubació de l'oli amb colònia de **CG** sobre filtre, l'acidesa assoleix uns nivells molt alts respecte als controls i també superior als obtinguts en l'anterior experiència, assolint valors de més del 8% d'oleic. Als 3 dies d'incubació, s'aprecia que aquest increment ja és força significatiu.

En la representació d'aquests valors en el Gràfic 1, s'observa en ambdós casos que l'increment de l'acidesa segueix una evolució exponencial en funció del *temps d'incubació*, si bé la pendent és lleugerament més

alta en la incubació amb colònia sobre filtre. Com es pot apreciar, en tot moment hi ha una forta diferència entre les incubacions amb presència de fong i les que s'ha incubat oli sol o amb extracte de cultiu. Hom pot considerar que si bé el factor *temps d'incubació* en les condicions experimental pot afavorir un lleuger increment d'acidesa en l'oli, és la presència de **CG** el que realment incideix en aquest paràmetre.

Taula 1. Valors d'acidesa en incubacions amb medis líquids.

TEMPS	SITUACIONS DE CULTIU		
	dies	Oli verge	Oli + Extracte
0	0.45 ± 0,003	0.45 ± 0,003	0.45 ± 0,003
1	0.46 ± 0,008	0.45 ± 0,004	0.49 ± 0,025
2	0.45 ± 0,010	0.45 ± 0,007	0.68 ± 0,028
3	0.5 ± 0,010	0.52 ± 0,008	0.89 ± 0,118
7	0.54 ± 0,020	0.55 ± 0,010	1.78 ± 0,059
15	0.63 ± 0,020	0.62 ± 0,020	1.99 ± 0,085
30	0.68 ± 0,040	0.65 ± 0,040	6.56 ± 0,297

Taula 2. Valors d'acidesa en incubacions de colònia de CG amb filtre de PTFE.

TEMPS	SITUACIONS DE CULTIU		
	dies	Oli verge	Oli + Medi
0	0.50 ± 0,003	0.50 ± 0,003	0.05 ± 0,003
1	0.52 ± 0,007	0.53 ± 0,004	0.50 ± 0,025
2	0.535 ± 0,009	0.53 ± 0,007	1.81 ± 0,062
3	0.53 ± 0,010	0.53 ± 0,008	2.52 ± 0,072
7	0.54 ± 0,012	0.59 ± 0,010	2.65 ± 0,055
15	0.60 ± 0,018	0.63 ± 0,020	3.30 ± 0,082
30	0.61 ± 0,024	0.70 ± 0,040	8.53 ± 0,299

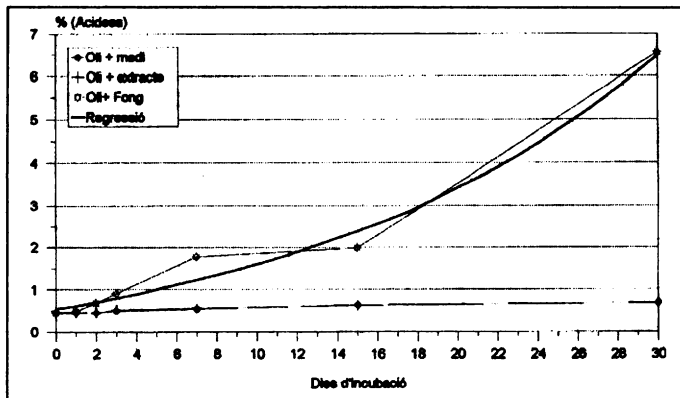
El fet que l'increment de l'acidesa es produeixi sense haver contacte del fong amb l'oli, indica que hi ha una difusió d'enzims procedents del fong a través del filtre de membrana produint tot seguit la hidròlisi i l'increment d'àcids grassos lliures.

A més cal assenyalar que aquests enzims (generalment lipasses i lipooxigenasses) són molt làbils, ja que les incubacions fetes amb medi líquid que contenia extracte de cultiu del fong, no presentaven alteracions de l'acidesa. Comparant les dades obtingudes hom pot deduir també que l'activitat hidrolítica a més d'estar en funció del temps i per suposat dependent de la temperatura també està influenciada per la capacitat de creixement del fong en el medi greixós.

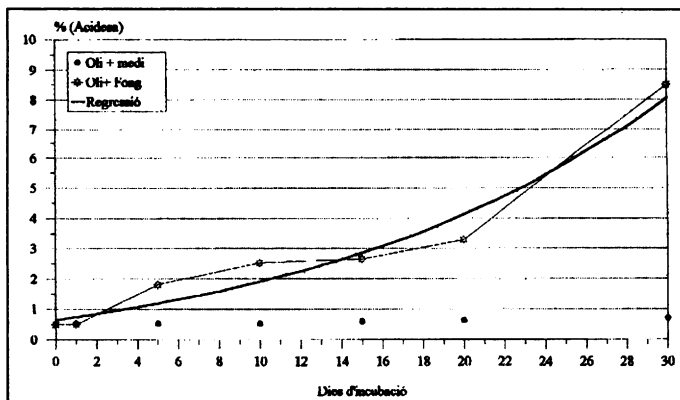
Observant la corba d'evolució (Gràfics 1 i 2) s'aprecia una inflexió entre els 7 i 16-18 dies. Una explicació podria ser la temporal inactivació del enzim per reaccions d'equilibri en el procés enzimàtic, però un posterior increment en la síntesi de l'enzim produït com a resposta a la inactivació, podria permetre de continuar posteriorment el procés enzimàtic.

En ambdues experiències, el coeficient de correlació va ser superior al 95%. Hom pot observar com la pendent, tot i sent molt similar, és sensiblement més alta en el cas del cultiu sobre filtre assolint als 30 dies gairebé 2° més que el cultiu en medi líquid.

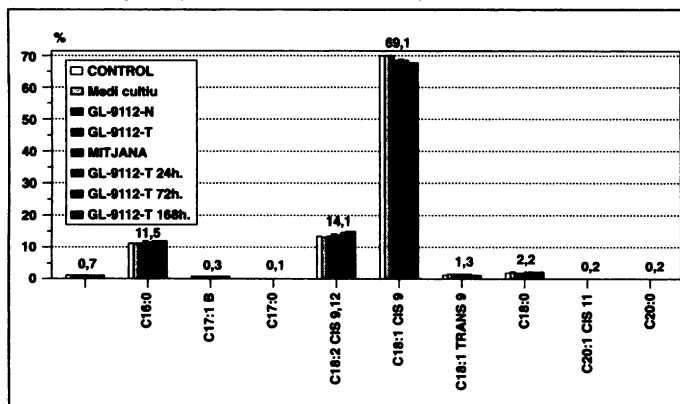
Gràfic 1. Evolució de l'acidesa d'oli incubat amb *Colletotrichum gloeosporioides* en medi líquid en funció del temps.



Gràfic 2. Evolució de l'acidesa d'oli incubat amb *Colletotrichum gloeosporioides* en cultiu sobre disc.



Gràfic 3. Perfils d'àcids grassos d'olis incubats amb diferents soques de *Colletotrichum gloeosporioides* i a diferents temps.



Aquestes dades hom les pot extrapolar a nivell de camp, preveien que la infecció per CG, pot ocasionar alteracions important en la qualitat de l'oli i que serà més gran segons el temps transcorregut des de l'inici de la infecció fins a la recol·lecció i extracció de l'oli.

Si bé CG afecta de forma considerable en l'acidesa de l'oli, no s'han observat alteracions importants en l'Índex de peròxids (Garcia, 1994) ni en el perfil d'àcids grassos (Gràfica 3) tant pel que fa a diferents soques com a diferents temps d'incubació.

CONCLUSIO

La incidència de **CG** sobre l'acidesa de l'oli està en funció del temps d'incubació el qual presenta una evolució exponencial.

Es necessària la presència activa del fong per tal de que es pugui produir l'activitat hidrolítica.

Les experiències amb colònia sobre filtres de membrana, donen unes condicions òptimes de treball, ja que permeten veure l'acció enzimàtica directa del fong sense que aquest estigui en contacte amb el substrat.

L'activitat enzimàtica desapareix amb extractes del medi on prèviament s'ha incubat **CG**, el que demostra la inestabilitat dels enzims.

BIBLIOGRAFIA

- GARCIA FIGUERES, FRANCESC. (1994). *Contribució al coneixement de les patologies de l'oliva i la seva relació amb la qualitat de l'oli, a la comarca del Montsià*. Tesis Doctoral de la Universitat de Barcelona, Departament de Biologia Vegetal, Facultat de Biologia.
- GUERRERO, A. (1988). *Nueva Olivicultura*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- JIMÉNEZ, R.M. (1985). *Enfermedades del olivo*. *Olivae*, II año, n° 8:24-27
- MATEO SAGASTA, E. (1967). *Estudios básicos sobre Gloeosporium olivarum*. *Boletín de Patología Vegetal y Entomología Agrícola*, 30: 31-135
- VASCO DE GARCIA CABRAL, R. (1949). *Notas sobre o Gloeosporium olivarum Alm. Influença dos ataques de G. olivarum do Fusarium sp. e do Dacus oleae no rendimento e qualidade do azeite*. *Boletim da Junta Nacional do Azeite*. 4(16):41-49.