



LIVAE

N° 122
ED. ITALIANA
NOVEMBRE 2015

RIVISTA UFFICIALE DEL CONSIGLIO OLEICOLO INTERNAZIONALE

INDICE

Tendenze della caratterizzazione chimica del profilo fenolico dell'olio di oliva vergine: panoramica e nuove sfide

Variabilità delle prestazioni agronomiche di una collezione di ibridi di olivo (*Olea europaea* L.) della varietà locale da olio "Chemlali Sfax"

Oleocoronale e oleomissionale: nuovi principali componenti fenolici dell'olio extra vergine di oliva

Problematiche fitopatologiche e aspetti fitosanitari dell'olivo nell'Italia centro-meridionale tra avversità note e nuove emergenze



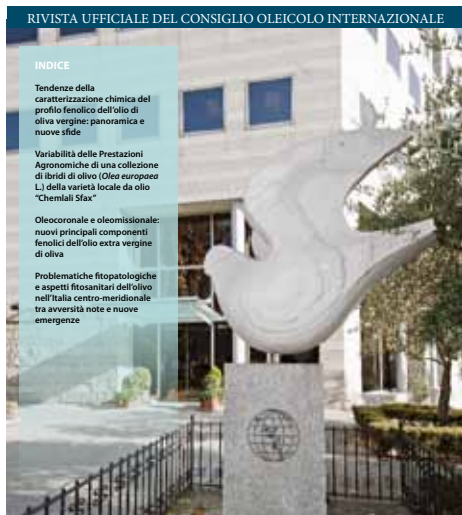
INDICE

Tendenze della caratterizzazione chimica del profilo fenolico dell'olio di oliva vergine: panoramica e nuove sfide

Variabilità delle Prestazioni Agronomiche di una collezione di ibridi di olivo (*Olea europaea* L.) della varietà locale da olio "Chemlali Sfax"

Oleocoronale e oleomissionale: nuovi principali componenti fenolici dell'olio extra vergine di oliva

Problematiche fitopatologiche e aspetti fitosanitari dell'olivo nell'Italia centro-meridionale tra avversità note e nuove emergenze



INDICE

OLIVAE | n°122

OLIVAE

Rivista Ufficiale del Consiglio Oleicolo Internazionale

Pubblicata in: arabo, francese, inglese, italiano e spagnolo.
Rivista Peer Reviewed

Príncipe de Vergara, 154
28002 Madrid, Spagna
Tel.: 34-915 903 638
Fax: 34-915 631 263
E-mail: iooc@internationaloliveoil.org
Web: www.internationaloliveoil.org

ISSN: 0255-996X

Deposito legale: M-18626-1984

Le denominazioni utilizzate e i dati riportati in questa pubblicazione non implicano alcuna espressione di opinione della Segreteria Esecutiva del COI in merito allo stato giuridico di paesi, territori, città o zone, o della loro autorità, né sul tracciato delle loro frontiere o limiti.

Il contenuto degli articoli riportati in questa pubblicazione non riflette necessariamente il punto di vista della Segreteria Esecutiva del COI in materia.

La riproduzione parziale o totale degli articoli di OLIVAE è autorizzata a condizione di indicarne l'origine.

3

Tendenze della caratterizzazione chimica del profilo fenolico dell'olio di oliva vergine: panoramica e nuove sfide

Abdelhakim Bakhouché
Jesús Lozano-Sánchez
Alberto Fernández-Gutiérrez
Antonio Segura-Carretero

16

Variabilità delle prestazioni agronomiche di una collezione di ibridi di olivo (*Olea europaea* L.) della varietà locale da olio "Chemlali Sfax"

Ben Amar F. / Mezghani-Aiachi M.
Yengui A. / Belguith H. / Harrab S.
Hergli M.K.

22

Oleocoronale e oleomissionale: nuovi principali componenti fenolici dell'olio extra vergine di oliva

Panagiotis Diamantakos / Angeliki Velkou
K. Brian Killday / Thanasis Gimisis
Eleni Melliou / Prokopios Magiatis

34

Problematiche fitopatologiche e aspetti fitosanitari dell'olivo nell'Italia centro-meridionale tra avversità note e nuove emergenze

V. Vizzarri / L.Tosi

Tendenze della caratterizzazione chimica del profilo fenolico dell'olio di oliva vergine: panoramica e nuove sfide

**Abdelhakim Bakhouché^{a,b}, Jesús Lozano-Sánchez^{b,c*},
Alberto Fernández-Gutiérrez^{a,b}, Antonio Segura-Carretero^{a,b}.**

^a Dipartimento di chimica analitica, Facoltà di scienze, Università di Granada, Fuentenueva s/n, E- 18071 Granada, Spagna.

^b Centro di ricerca e sviluppo dell'alimento funzionale, Parco tecnologico di scienze della salute, Avenida del Conocimiento s/n, E-18016 Granada, Spagna

^c Dipartimento di ricerca e sviluppo funzionale dell'olio d'oliva, Aceites Maeva S. L. Avda. Incar, S/N 18130 Escúzar Granada (Spagna).

*Autore corrispondente.

*Tel.: +34 958249510.

Fax: +34 958249510.

E-mail: jesusls@ugr.es.

Riassunto

Questa relazione offre una panoramica dei diversi approcci analitici alla determinazione dei composti fenolici nell'OOV. In linea di principio, la procedura analitica per la determinazione dei singoli composti fenolici nell'OOV comporta tre passaggi fondamentali: estrazione dal campione d'olio, separazione cromatografica e caratterizzazione. I sistemi di estrazione più utilizzati sono l'estrazione liquido-liquido (LLE) e l'estrazione in fase solida (SPE). Tra le tecniche di separazione documentate, la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) è quella più diffusa per l'analisi dei composti fenolici. È stato tuttavia dimostrato che la gascromatografia (GC) e l'elettroforesi capillare (CE) sono in grado di raggiungere gli stessi obiettivi dell'HPLC offrendo metodologie alternative per la caratterizzazione dei composti fenolici nell'OOV. In questa relazione sono riportati i parametri ottimizzati, i vantaggi e gli svantaggi di ogni tecnica. Vengono inoltre esaminati i diversi rilevatori abbinati alle tecniche di separazione. Sono infine presentati anche gli attuali problemi analitici della determinazione dei composti fenolici nell'OOV. Per superare questi problemi, i ricercatori devono prendere in considerazione gli svantaggi dei metodi indicati in precedenza. La sfida futura consisterà nel determinare un singolo metodo da applicare a tutti gli studi dell'OOV in relazione ai composti fenolici.

Parole Chiave

OOV, composti fenolici, estrazione, tecniche di separazione, problemi analitici.

Abstract

Due to the important role played by phenolic compounds in the nutritional value of virgin olive oil (VOO), it is necessary to develop efficient and accurate analytical methods for their qualitative and quantitative analysis. This review presents an overview of different analytical approaches to the determination of phenolic compounds in VOO. In principle, the analytical procedure for the determination of individual phenolic compounds

in VOO involves three basic steps: extraction from the oil sample, chromatographic separation, and characterization. The extraction systems in widest use are liquid-liquid extraction (LLE) and solid-phase extraction (SPE). Among the separation techniques reported, high performance liquid chromatography (HPLC) was the most widespread technique applied for the analysis of phenolic compounds. However, it was demonstrated that gas chromatography (GC) and capillary electrophoresis (CE) are able to achieve the same aims as HPLC while providing alternative methodologies for the characterization of phenolic compounds in VOO. The optimized parameters, advantages and disadvantages of each technique are reported in this review. In addition, the different detectors coupled to the separation techniques are reviewed. Finally, the current analytical problems in the determination of phenolic compounds in VOO are also presented. In order to overcome these problems, researchers have to take into consideration the drawbacks of the previous methods. The future challenge will be to establish one single method for application to all VOO studies relating to phenolic compounds.

Parole chiave

VOO, phenolic compounds, extraction, separation techniques, analytical problems.

Introduzione

L'olio di oliva vergine (OOV) è sempre più diffuso nel mondo, non solo per le sue esclusive caratteristiche sensoriali ma anche per gli effetti benefici sulla salute associati al suo consumo, in particolare nell'ambito della dieta mediterranea. I benefici dell'olio d'oliva per la salute sono stati attribuiti al profilo di acidi grassi e alla presenza di molti componenti bioattivi come tocoferoli, fosfolipidi e composti fenolici. Sono state infatti riconosciute ai composti fenolici varie funzioni e proprietà biologiche. Negli studi sull'uomo, si è rilevato che l'olio d'oliva ricco di composti fenolici migliora gli effetti antiossidanti e antinfiammatori e riduce la proliferazione delle molecole di adesione delle cellule rispetto agli oli d'oliva con pochi composti fenolici (Covas 2007; Fitó, de la Torre *et al.*, 2007). Nel 2011, l'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA) ha approvato una rivendicazione relativa all'efficacia dei composti fenolici dell'olio d'oliva (5 mg/giorno) per proteggere i lipidi del sangue dal danno ossidativo (Franco, Galeano-Díaz *et al.*, 2014).

Nell'OOV sono stati identificati almeno trentasei composti fenolici strutturalmente diversi. I fenolici idrofili, come gli alcool fenolici, gli acidi fenolici, i lignani, i flavonoidi e i secoiridoidi sono la categoria più importante di antiossidanti naturali presenti nell'OOV. Purtroppo, la loro concentrazione non è costante nell'OOV ma varia secondo molti fattori tra cui la cultivar di olivo, la fase di maturazione del frutto, la gestione dell'irrigazione e le condizioni pedoclimatiche nell'area di coltura (Bajoub, Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2015; Bakhouch, Lozano-Sánchez *et al.*, 2015; Dabbou, Chehab *et al.*, 2010). Vari studi hanno riportato inoltre l'effetto sulla composizione fenolica dei diversi stadi di lavorazione dell'OOV, come spremitura, gramolatura, centrifugazione, stoccaggio e filtraggio (Bakhouch, Lozano-Sánchez, *et al.*, 2014a; Frankel, Bakhouch *et al.*, 2013).

A causa della continua variazione dei composti fenolici nell'OOV per gli effetti dei fattori segnalati in precedenza e dell'esigenza di una corretta discriminazione degli OOV più ricchi da quelli più poveri in termini di contenuto di composti fenolici, sono stati proposti vari metodi analitici per determinare tali composti utilizzando diverse tecniche di estrazione, separazione e caratterizzazione qualitativa e quantitativa. Per il recupero dei fenoli sono stati utilizzati due metodi principali: l'estrazione liquido-liquido (LLE) e l'estrazione in fase solida (SPE). Nel primo metodo sono state testate varie miscele di solventi e nel secondo vari tipi di adsorbenti per massimizzare il recupero di composti fenolici dall'OOV (Bendini, Bonoli *et al.*, 2003). Nel caso della caratterizzazione fenolica, la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) è la principale tecnica utilizzata per la separazione dei composti fenolici (Bayram, Esatbeyoglu *et al.*, 2012). Sono state riferite anche altre tecniche come la gascromatografia (GC) e l'elettroforesi capillare (CE) (Ballus, Meinhart *et al.*, 2011; García-Villalba, Pacchiarotta *et al.*, 2011). Le tecniche di separazione citate sono abbinate a diversi rilevatori. La rivelazione UV-visibile a serie di diodi (DAD) è il metodo standard utilizzato per i composti fenolici e, insieme alla spettrometria di massa, è attualmente il sistema prevalente (Bakhouch, Lozano-Sánchez *et al.*, 2013). Anche la spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (RMN) è stata utilizzata come rilevatore nella caratterizzazione dei composti fenolici dell'OOV ma a causa del costo elevato è disponibile soltanto in un numero limitato di istituzioni (Etrakis, Giomyrganaki *et al.*, 2008).

Anche se molti metodi sono stati ottimizzati per determinare la concentrazione di composti fenolici nell'OOV, il confronto diretto dei dati disponibili nel-

la letteratura è ancora difficile perché le concentrazioni riportate presentano spesso notevoli differenze. Le spiegazioni avanzate, per esempio il fatto che vari fattori agronomici e tecnologici potrebbero influire sulla concentrazione fenolica dell'OOV, possono giustificare tali discrepanze, ma solo in parte. Alcuni autori hanno suggerito tuttavia che le discrepanze osservate nelle concentrazioni dell'OOV possano essere determinate dai metodi analitici utilizzati (Bakhouché, Lozano-Sánchez *et al.*, 2014b; Karkoula, Skantzari *et al.*, 2012). Di conseguenza, gli obiettivi di questa relazione sono stati: primo, offrire una panoramica dei principali metodi di estrazione e separazione utilizzati nell'analisi dei composti fenolici dell'OOV; secondo, evidenziare gli svantaggi dei metodi più citati affinché se ne tenga conto negli studi futuri sui composti fenolici dell'OOV.

Metodi per l'estrazione di composti fenolici dall'olio d'oliva vergine

L'isolamento dalla matrice del campione è generalmente un prerequisito per qualsiasi programma esecutivo di analisi. Il principale obiettivo è preparare un estratto campione che sia uniformemente arricchito di tutti i composti interessati e privo dei componenti della matrice che possono interferire. L'LE e la SPE sono i due sistemi riferiti per la maggior parte dell'estrazione di composti fenolici dall'OOV. Questi sistemi variano non soltanto per i solventi e/o adsorbenti in fase solida utilizzati ma anche per i quantitativi di campione necessari per l'analisi, e per i volumi dei solventi.

Estrazione liquido-liquido

I composti fenolici dell'olio di oliva sono stati isolati prevalentemente estraendo una soluzione d'olio con miscele di metanolo o metanolo/acqua. Prima dell'estrazione, la procedura liquido-liquido comporta un passaggio preliminare in cui l'OOV viene dissolto con un solvente apolare per eliminare la frazione lipidica e facilitare l'estrazione dei composti fenolici con il solvente polare. A tal fine si utilizzano esano, etere di petrolio e cloroformio anche se l'esano è quello maggiormente impiegato (Lerma-García, Lantano *et al.*, 2009; Montedoro, Servili *et al.*, 1992). Nel caso dei solventi di estrazione, sono stati riportati nella letteratura dati controversi in relazione al migliore solvente per il completo recupero dei composti fenolici dall'OOV. Inizialmente, è sembrato che l'estrazione con meta-

nolo/acqua 80:20 permettesse di ottenere risultati migliori rispetto a metanolo assoluto o metanolo/acqua 60:40 (Montedoro, Servili *et al.*, 1992). Cinque anni dopo, tuttavia, il metanolo assoluto è stato scelto per estrarre i composti fenolici dall'OOV invece del composto di metanolo/acqua a causa dell'estrazione incompleta di alcuni composti fenolici quando si utilizzava la seconda miscela come solvente di estrazione. Questa ipotesi potrebbe essere dovuta alla considerevole formazione di emulsione tra l'acqua e l'olio (Angerosa, D'Alessandro *et al.*, 1995). Altri studi hanno dimostrato che riducendo la proporzione di metanolo al 60% si aumentava l'efficienza di recupero dei composti fenolici (Ballus, Meinhart *et al.*, 2014; Pirisi, Cabras *et al.*, 2000). È stato anche riportato l'uso di solventi organici diversi dal metanolo nell'LE, per esempio etanolo, acetone, nitrile e *N, N* dimetilformamide (DMF), l'ultimo dei quali sembra evidenziare risultati interessanti in termini di efficienza di recupero (Brenes, Garcá *et al.*, 2000).

Si è potuto dividere il sistema LE in diverse categorie secondo il quantitativo di campione e solvente utilizzato nell'estrazione dei composti fenolici dall'OOV. Il sistema convenzionale era caratterizzato dall'uso di quantitativi elevati di campione e solventi organici, che lo rendeva laborioso, costoso e richiedeva molto tempo (Gómez-Caravaca, Carrasco Pancorbo *et al.*, 2005). A causa di questi svantaggi, è stato sviluppato un nuovo sistema di LE denominato microestrazione liquido-liquido (LLME) al posto di quello tradizionale. Si potrebbe considerare una versione in miniatura dell'LE convenzionale perché richiede un quantitativo inferiore di campione e genera un minor volume di residui, oltre a essere più rapida. Nella letteratura è riportata l'applicazione di questo metodo per estrarre i composti fenolici dall'OOV. In uno studio comparativo, sono stati valutati i metodi di LE e LLME in termini di ripetibilità, riproducibilità e recupero dei composti fenolici. I risultati hanno evidenziato una buona ripetibilità e riproducibilità per entrambi. L'LE ha tuttavia fornito valori inferiori rispetto all'LLME in quanto a fenoli totali estratti dall'OOV (Pizarro, Becerra *et al.*, 2013). In uno studio più recente, lo stesso metodo di LLME è stato migliorato riducendo il volume di estraente da 1 a 0,5 ml al fine di caratterizzare i composti fenolici nell'OOV utilizzando la spettrometria di massa a triplo quadrupolo abbinata alla cromatografia liquida ad alta prestazione (Becerra-Herrera, Sánchez-Astudillo *et al.*, 2014). Per l'estrazione dei composti fenolici dall'OOV sono state anche sviluppate e applicate altre tecniche di estrazione liquido-liquido, quali la microestrazione dispersiva liquido-liquido (DLLME), e la microestrazione dispersiva liquido-liquido in fase inversa (RP-DLLME) (Godoy-Caballero, Acedo-Valenzuela *et al.*, 2013).

L'estrazione in fase solida

La tecnica di SPE si è diffusa maggiormente nell'ultimo decennio come passaggio per l'isolamento dei composti fenolici dall'OOV. È stata applicata utilizzando vari tipi di adsorbenti. Per esempio, cartucce C8 (500 mg, 3.5 mL, Alltech) che si sono rivelate rapide e semplici (Pirisi, Cabras *et al.*, 2000). Un anno dopo, sono state paragonate cartucce in fase diol-bonded e cartucce in fase amminica per stabilire quale tipo fosse migliore per l'estrazione di questi analiti. Gli autori hanno escluso la cartuccia in fase amminica a causa dell'apparizione di alcuni composti nell'estratto in seguito a un reperto originatosi durante l'estrazione attraverso le interazioni tra solvente e fase amminica (Mateos, Espartero *et al.*, 2001). Sono state applicate altre due cartucce commerciali, ottadecile C₁₈ (2g, 6 ml) e ottadecile C_{18EC} (terminato; 2g, 6 ml) per l'estrazione dei composti fenolici dall'OOV, ed è stato realizzato uno studio comparativo di entrambe. I risultati hanno evidenziato un recupero insoddisfacente con C_{18EC} mentre le cartucce C₁₈ hanno permesso un recupero quantitativo praticamente completo di tutti i composti esaminati. Gli autori hanno attribuito il diverso comportamento delle cartucce C₁₈ e C_{18EC} all'interazione tra il materiale adsorbente e l'analita. Il meccanismo alla base del rilascio indotto dall'eluente dell'analita dipende probabilmente dall'interazione tra i gruppi residui di Si-OH situati sulla superficie del silicio e dei composti adsorbenti. Nel caso di C_{18EC}, i gruppi polari residui vengono soppressi e questa caratteristica apparentemente peggiora il meccanismo di rilascio dell'analita (Liberatore and Procida *et al.*, 2001). In un altro interessante studio, sono state comparate tutte le cartucce citate in precedenza (C₈, C₁₈ e diol) in termini di efficienza di recupero dei composti fenolici dell'OOV. I risultati hanno dimostrato che l'estrazione utilizzando cartucce diol permette un recupero maggiore di fenoli totali, *o*-difonoli, tirosolo, idrossitirosolo e secoiridoidi rispetto ad altre procedure di estrazione (Bendini and Bonoli *et al.*, 2003). In uno studio più recente, la cartuccia diol-SPE è stata scelta come la più efficiente rispetto a C18-SPE e Sax-SPE (Gómez-Caravaca and Carrasco Pancorbo *et al.*, 2005). Un altro aspetto importante da considerare durante l'estrazione con SPE è l'equilibrio tra il quantitativo di OOV e il volume di adsorbente impiegato. Sotto questo aspetto, sono stati inizialmente addizionati di una dose standard di analiti 30 g di OOV ed è stata effettuata la SPE utilizzando cartucce diol di diversa capacità (500 mg e 1 g). I risultati ottenuti hanno indicato che quando si sono utilizzate cartucce da 500 mg, i valori di recupero dall'estrazione erano inferiori. Si è tuttavia registrato un notevole incremento con le cartucce da 1 g. Successivamente, nello stesso studio, è stata utilizzata una cartuccia diol da 1 g per estrarre i composti fenolici da 10, 20 e 30 g di OOV, con l'obiettivo di individuare il punto di

saturazione della cartuccia impiegata. I risultati hanno indicato che la maggior parte dei composti registrava un incremento lineare in area di picco parallelamente all'aumento del quantitativo di olio d'oliva; tuttavia, con 20 g di OOV, è stata osservata una curvatura del segnale, probabilmente correlata alla saturazione della cartuccia, per tirosolo, acido vanillico e acido siringico (Godoy-Caballero and Acedo-Valenzuela *et al.*, 2012). È stato riportato che generalmente si utilizzano 500 mg per la SPE in scala ridotta, e 1 g su vasta scala (Laura Capriotti, Cavaliere *et al.*, 2014).

Sono anche stati effettuati paragoni delle due tecniche di estrazione, SPE e LLE, che hanno portato alla pubblicazione di dati controversi. Mentre molti studi comparativi hanno indicato che l'LLE permette di ottenere un recupero maggiore rispetto all'SPE (Bendini, Bonoli *et al.*, 2003; Hrncirik e Fritsche, 2004), altri autori ritengono che l'SPE sia il metodo di riferimento per l'estrazione di composti fenolici dall'OOV e non l'LLE per via della facilità d'uso e del breve tempo di estrazione (Gómez-Caravaca, Carrasco Pancorbo *et al.*, 2005; Pirisi, Cabras *et al.*, 2000). Altre ricerche hanno tuttavia segnalato che il metodo di SPE è problematico per la sua selettività verso i singoli fenolici, in particolare gli agliconi (Hrncirik, e Fritsche, 2004). Inoltre, studiando gli effetti di ritenzione dei composti fenolici ossidati durante l'estrazione analitica dei composti fenolici nell'OOV, gli autori sono giunti alla conclusione che l'SPE sembra essere efficace soltanto per l'OOV fresco perché in caso di OOV ossidato, la fase stazionaria delle colonne della SPE interagisce con i fenoli ossidati. Questa interazione porterebbe a un'ulteriore ritenzione non selettiva dei composti fenolici non ossidati, riducendo così il recupero totale di questi analiti (Armaforte, Mancebo-Campos *et al.*, 2007).

Tecniche di separazione per l'analisi dei composti fenolici nell'OOV

Cromatografia liquida

La cromatografia liquida (LC) è considerata la tecnica più diffusa e affidabile per la separazione dei composti fenolici. Nella letteratura sono riportate la LC a fase normale e la LC a fase inversa. La prima utilizza un gel di silice come fase stazionaria nella colonna e un solvente non polare come eluente mentre la seconda usa una fase stazionaria legata con ottadecilsilano (C18) e un solvente polare come fase mobile. L'LC a fase inversa sembra essere la tecnica più utilizzata a

causa della miglior riproducibilità e separazione dei composti polari (Carrasco-Pancorbo, Cerretani *et al.*, 2005; Laura Capriotti, Cavaliere *et al.*, 2014). Si utilizzano molteplici colonne. Quelle preferite sono lunghe da 100 a 250 mm, con un diametro interno di 2-4,6 mm e una dimensione delle particelle di 1,8-5 μm (Selvagini, Servili *et al.*, 2006; Taamalli, Abaza *et al.*, 2013).

È stata sviluppata un'eluizione isocratica per la separazione dei composti fenolici ed è stata ottenuta una risoluzione adeguata utilizzando un'adeguata composizione della fase mobile (Akasbi, Shoeman *et al.*, 1993). Tuttavia gli studi recenti utilizzano esclusivamente la modalità di eluizione a gradiente. Questo conferma la complessità del profilo fenolico che non può essere adeguatamente separato nella modalità di eluizione isocratica. Sono state impiegate numerose fasi mobili ma i sistemi binari che comprendono acqua e un solvente organico meno polare come l'acetonitrile o il metanolo rimangono i più diffusi (Bakhouch, Lozano-Sánchez *et al.*, 2015; De la Torre-Carbot, Jauregui *et al.*, 2005). Di solito vengono aggiunti all'acqua acidi come l'acetico, il formico e il perclorico per mantenere una concentrazione costante di acidi durante le analisi con gradienti (Bayram, Esatbeyoglu *et al.*, 2012; De la Torre-Carbot, Jauregui *et al.*, 2005; Taamalli, Abaza *et al.*, 2013). La riduzione del pH ha contribuito in parte a migliorare la risoluzione. Ciononostante, la mancanza di separazione tra i picchi e il tempo di analisi prolungato sono ancora i principali svantaggi della tecnica di LC. Infatti la separazione di composti fenolici complessi dall'OOV ha richiesto tempi più lunghi usando i tradizionali metodi di HPLC. Lo sviluppo di colonne con piccole dimensioni delle particelle nella fase stazionaria ha tuttavia migliorato la risoluzione e ridotto il tempo di analisi. Le elevate pressioni determinate dall'uso di particelle di piccole dimensioni hanno reso necessario lo sviluppo di nuove apparecchiature come la cromatografia liquida a risoluzione rapida (RRLC) e la cromatografia liquida a ultra alta prestazione (UPLC). Nella letteratura sono state riportate l'applicazione della nuova colonna per la separazione dei composti fenolici dell'OOV e l'ottimizzazione di gradiente, temperatura e flusso. In uno studio recente, è stato ottimizzato un nuovo metodo di RRLC (Colonna Zorbax C18: 4,6 mm×150 mm e dimensione delle particelle 1,8 μm) sulla base delle condizioni cromatografiche di un precedente metodo di cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) (colonna Gemini C18: 3 mm×250 mm, dimensione delle particelle 5 μm). Inizialmente, è stata ottimizzata un'eluizione a gradiente usando acqua + 0,5% di acido acetico come fase mobile A, e acetonitrile come fase mobile B. Nel passaggio successivo, sono stati testati valori di flusso e temperatura rispettivamente da 0,5 a 2 ml/min e da 25 °C a 40 °C. I risultati hanno evidenziato

che incrementando flusso e temperatura si abbrevia il tempo di analisi senza compromettere eccessivamente la risoluzione, ma temperature superiori a 40 °C determinano una sovrapposizione di alcuni picchi e una perdita di composti. Infine, sono stati scelti per l'analisi un flusso ottimale di 1.5 mL/min e una temperatura ottimale di 30 °C. Con il metodo ottimizzato, si è potuto ridurre il tempo di analisi da 60 min (HPLC) a 20 min (RRLC) ed è stata ottenuta una buona risoluzione utilizzando una colonna con particelle di piccole dimensioni (García-Villalba, Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2010). In uno studio ancor più recente, è stata ottenuta una separazione cromatografica ottimale con la stessa apparecchiatura (RRLC) usando acqua + 0,25% di acido acetico come fase mobile A e metanolo come fase mobile B. La temperatura di prova e il flusso erano rispettivamente di 25 °C e 0,8 ml/min. Applicando tutte queste condizioni, i composti fenolici sono stati correttamente separati in soli 27 min (Lozano-Sánchez, Segura-Carretero *et al.*, 2010).

Gascromatografia

Da quando è stata inventata e specialmente quando è stata introdotta la colonna capillare con silice fusa (GC), la gascromatografia è diventata una delle tecniche più efficaci della chimica analitica grazie al notevole miglioramento della qualità della separazione (Carrasco-Pancorbo, Nevedomskaya *et al.*, 2009). La GC è stata impiegata per effettuare determinazioni qualitative e quantitative dei composti fenolici nell'OOV (García-Villalba, Pacchiarotta *et al.*, 2011; Saitta, Curto *et al.*, 2002); il suo utilizzo è stato tuttavia limitato dalla scarsa volatilità di molti composti fenolici. Per superare il problema, l'analisi richiede un passaggio preliminare denominato derivatizzazione in cui i composti fenolici sono trasformati in composti più volatili usando vari reagenti. Vi sono molti metodi di derivatizzazione, anche se la trimetilsililazione è quello più diffuso (Angerosa, D'Alessandro *et al.*, 1996; Zafra-Gómez, Luzón-Toro *et al.*, 2010).

In uno studio recente, la derivatizzazione è stata accuratamente ottimizzata paragonando diversi reagenti e testandone l'efficienza in soluzioni standard e in campioni reali. Inizialmente, il passaggio di derivatizzazione è stato ottimizzato in una soluzione standard a base di una miscela di tirosolo e idrossiltirosolo, usando N,O-Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamide (BSTFA), N, O-Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamide + trimetilclorosilano (BSTFA+TMCS), N,O-Bis (trimetilsilil) acetamide + trimetilclorosilano (BSA+TMCS) e ter-Butildimetilclorosilano (TBDMSCl) come agenti di derivatizzazione. Sono stati comparati piridina e ACN come solventi di reazione. Malgrado i buoni risultati ottenuti utilizzando BSTFA e BSTFA+TMCS, la miscela di BSA+TMCS ha

evidenziato la maggior efficienza. Tuttavia, è stato scelto il BSTFA per l'analisi dei composti fenolici nei campioni di OOV per evitare l'iniezione di TMCS, che può ridurre la vita della colonna (Purcaro, Codony *et al.*, 2014).

La letteratura riporta molti tentativi di ottenere una buona separazione usando la GC nell'analisi dei composti fenolici. I metodi di GC utilizzano colonne, programmi di temperature del forno, programmi di iniezione, modalità di iniezione e volumi di iniezione dell'estratto diversi (Angerosa, D'Alessandro *et al.*, 1996; García-Villalba, Pacchiarotta *et al.*, 2011; Ríos, Gil *et al.*, 2005). In quasi tutti i metodi riportati, è stato usato l'elio come gas vettore con una velocità lineare. Oltre alla qualità della separazione, nei metodi oggetto di pubblicazioni sono stati ottenuti tempi di analisi più brevi o più lunghi secondo i parametri di analisi indicati in precedenza. L'esigenza di effettuare la derivatizzazione rende tuttavia questa tecnica più laboriosa. Inoltre la derivatizzazione incompleta può essere accompagnata dalla formazione di varie specie chimiche provenienti dallo stesso composto, con risultati che possono creare confusione. Altro limite di questa tecnica è l'uso di temperature elevate, che possono danneggiare gli analiti (Carrasco-Pancorbo, Cerretani *et al.*, 2005).

Elettroforesi capillare

Negli ultimi anni, l'elettroforesi capillare (CE) si è rivelata una tecnica rapida che coniuga tempi brevi di analisi e un'elevata efficienza della separazione per l'analisi dei componenti alimentari. È stata usata in particolare per l'analisi dei composti fenolici nell'OOV (Bendini, Bonoli *et al.*, 2003). Sono stati ottimizzati vari metodi elettroforetici al fine di trovare le migliori condizioni di separazione per effettuare l'analisi nel più breve tempo possibile con una risoluzione sufficiente. I parametri tipici per l'ottimizzazione sono stati tampone (tipo, concentrazione e pH), temperatura capillare, voltaggio, effettivo diametro capillare e tipo di iniezione del campione. I primi metodi ottimizzati erano laboriosi a causa dell'esigenza di ottimizzazione individuale di tutti i parametri citati in precedenza (Bonoli, Montanucci *et al.*, 2003; Carrasco-Pancorbo, Gómez-Caravaca *et al.*, 2006a; Gómez-Caravaca, Carrasco Pancorbo *et al.*, 2005). Recentemente tuttavia l'uso di metodi basati su molteplici criteri, che tengono conto simultaneamente di tutte le separazioni critiche, facilita e velocizza lo sviluppo di nuovi metodi elettroforetici (Ballus, Meinhart *et al.*, 2011; Ballus, Meinhart *et al.*, 2014). Inoltre, al fine di ridurre il numero di passaggi necessari per l'analisi dei composti fenolici usando l'elettroforesi capillare, è stato riferito l'uso di una nuova tecnica denominata elettroforesi capillare non-acquosa (NACE). Il principale vantaggio rispetto alla tecnica convenzionale è la capacità

di lavorare con un ampio ventaglio di solventi organici (metanolo, etanolo, 1-propanolo, 2-propanolo, o acetonitrile, tra gli altri). Come è risaputo, è spesso necessaria una LLE o SPE per ottenere la concentrazione preliminare con solventi organici prima dell'analisi di matrici complesse. Dopo la concentrazione preliminare, gli analiti interessati sono normalmente diluiti in un solvente organico. Nella CE acquosa, l'estratto viene di solito fatto evaporare e gli analiti vengono dissolti in mezzi acquosi. Tuttavia, utilizzando la NACE si può evitare questo passaggio (Godoy-Caballero, Acedo-Valenzuela *et al.*, 2012b). Malgrado gli sforzi di vari gruppi di ricerca per sviluppare metodi di CE affidabili, sono stati pubblicati solo alcuni lavori sull'applicazione di questa tecnica nel campo dell'*Olea europaea*, probabilmente a causa di alcuni svantaggi della CE quali la scarsa riproducibilità, la scarsa sensibilità al rilevamento con UV e le difficoltà di accoppiamento con l'MS (Carrasco-Pancorbo, Gómez-Caravaca *et al.*, 2006a; Godoy-Caballero, Acedo-Valenzuela *et al.*, 2012b).

Rilevatori

I composti fenolici vengono normalmente determinati utilizzando rilevatori UV/VIS e DAD, in particolare abbinati a LC e CE. Negli studi fenolici basati su LC, si usano 280 nm per l'analisi di routine dato che la maggior parte dei fenolici dell'OOV assorbono a questa lunghezza d'onda mentre si usano 240 nm per alcuni secoiridoidi e i loro derivati, 310-320 nm per gli acidi idrossicinnamici, e 350 nm per i flavoni (Bakhouch, Lozano-Sánchez *et al.*, 2013; Garcia, Coelho *et al.*, 2013; Godoy-Caballero, Acedo-Valenzuela *et al.*, 2012a). Nel metodo di analisi fenolica ufficiale pubblicato dal Consiglio oleicolo internazionale (COI), si usa uno spettro UV-visibile per il rilevamento. Il metodo stabilisce i valori massimi di assorbanza di 27 composti fenolici diversi e stabilisce una procedura per la quantificazione di questi analiti sulla base dei dati forniti dal rilevatore UV (COI 2009). I rilevatori UV sono stati usati anche per studiare la variazione di contenuto fenolico nell'OOV sotto l'influenza di diversi fattori agronomici e tecnologici (Gómez-Rico, Salvador *et al.*, 2006; Parenti, Spugnoli *et al.*, 2008). In relazione all'analisi con CE, la letteratura riferisce anche le prestazioni del rilevamento di UV a 200, 240, 280 e 330 nm per la caratterizzazione di diversi gruppi fenolici nell'OOV, anche se è stato utilizzato il rilevamento a serie di diodi nel range di 190-600 nm per ottenere dati spettrali (Carrasco-Pancorbo, Gómez-Caravaca *et al.*, 2006a). In studi più recenti, è stata utilizzata la CE abbinata

a un rilevatore UV per sviluppare un nuovo metodo elettroforetico per la separazione dei composti fenolici degli estratti di OOV, per confrontare i diversi sistemi di estrazione in termini di recupero dei fenoli e per studiare la composizione fenolica dell'OOV ottenuto da diverse varietà di oliva (Ballus, Meinhart *et al.*, 2014; Godoy-Caballero, Galeano-Díaz *et al.*, 2012c; Gómez-Caravaca, Carrasco Pancorbo *et al.*, 2005).

Nella GC, il rilevatore di ionizzazione di fiamma (FID) è il rilevatore più diffuso in abbinamento con questa tecnica di separazione. In effetti, la GC-FID è stata utilizzata per analizzare il profilo fenolico di vari oli, tra cui l'OOV. Il metodo proposto per questa finalità ha reso possibile stimare il contenuto fenolico dell'olio di girasole, dell'olio di colza e dell'OOV (Farajzadeh, Yadeghari *et al.*, 2014). Altri autori hanno utilizzato la GC-FID per analizzare il contenuto totale di idrossitirosole e tirosole degli oli extravergine di oliva, dopo idrolisi delle forme legate (Purcaro, Codony *et al.*, 2014).

Recentemente, gli spettrometri di massa (MS) sono stati abbinati a varie tecniche di separazione per l'ulteriore caratterizzazione dei composti fenolici nell'OOV. Gli spettrometri a tempo di volo (TOF-MS), a tempo di volo e a quadrupolo (QTOF-MS), e a trappola ionica (IT-MS) sono le tipologie più diffusamente riportate nella letteratura (Bakhouché, Lozano-Sánchez *et al.*, 2014b; Fu, Segura-Carretero *et al.*, 2009; Laura Capriotti, Cavaliere *et al.*, 2014). A parte la rapida acquisizione di dati e un ampio range di rilevamento di massa, un'altra importante caratteristica dello spettrometro di massa è la grande precisione delle misurazioni della massa. Offre un'elevata selettività nella determinazione dei composti fenolici usando il cromatogramma degli ioni estratti (EIC) quando vi sono picchi sovrapposti e permette una conferma rapida ed efficiente della composizione elementare degli ioni quando si effettua la frammentazione. L'abbinamento di LC, GC o CE con uno spettrometro di massa ha permesso una caratterizzazione dettagliata della frazione fenolica nei vari studi sulla qualità dell'OOV (Bengana, Bakhouché *et al.*, 2013; Carrasco-Pancorbo, Arráez-Román *et al.*, 2006b; Saitta, Curto *et al.*, 2002). Inoltre, l'uso di uno spettrometro di massa permette di esaminare il rapporto tra la natura o concentrazione chimica dei singoli composti fenolici negli estratti di OOV e la loro capacità di ridurre determinate malattie croniche (García-Villalba, Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2010). Sono documentati anche altri rilevatori come i rilevatori di fluorescenza e i rilevatori RMN (Etrakis, Giomyrgianaki *et al.*, 2008; Tena, García-González *et al.*, 2009), che tuttavia non sono diffusi come i rilevatori di UV e gli spettrometri di massa.

Problemi analitici della caratterizzazione dei composti fenolici nell'OOV

In tutti gli studi destinati a quantificare i composti fenolici nell'OOV, i ricercatori si sono preoccupati di ottenere il recupero totale di questi analiti dalla matrice. Inizialmente, è stata utilizzata una miscela di standard commerciali aggiunti all'olio di arachide raffinato per comparare l'efficienza di recupero delle varie tecniche di isolamento. L'olio addizionato è stato poi sottoposto a vari sistemi di estrazione (LLE e SPE). Gli estratti risultanti sono stati analizzati con HPLC e il quantitativo di ogni standard è stato comparato con quello della miscela standard che non era stata sottoposta ad alcuna procedura di estrazione (Bendini, Bonoli *et al.*, 2003). Tuttavia, nella valutazione dei risultati ottenuti, si deve tenere a mente che la maggior parte dei composti fenolici naturalmente presenti nell'olio d'oliva non sono disponibili in commercio. Di conseguenza, la ricerca è continuata sulla base di altri composti con struttura simile. La reazione degli standard può essere diversa da quella di altri analiti presenti nei campioni di olio, per cui i risultati del recupero possono solo essere stime. Per superare questo problema, altri autori hanno proposto un metodo di estrazione basato sull'aggiunta all'olio di girasole raffinato (senza fenoli) di una dose esatta di un estratto fenolico di OOV preparato con LLE. L'olio addizionato è stato estratto usando l'SPE, e se ne è calcolata l'efficienza di recupero (Gómez-Caravaca, Carrasco Pancorbo *et al.*, 2005). Questo approccio ha fornito una soluzione parziale per la stima del recupero di composti fenolici dall'OOV. I precedenti tentativi in cui sono stati comparati diversi sistemi di estrazione in termini di efficienza di recupero non consideravano le interazioni tra composti matrice e target. Infatti, in entrambi i sistemi (LLE e SPE) si deve tenere conto dell'effetto del contenuto di acqua dell'OOV sull'estrazione fenolica. Vari studi hanno dimostrato il rapporto tra il contenuto di acqua e i composti fenolici. È risaputo che l'olio di oliva contiene una ridotta quantità di acqua, per questo motivo può essere considerato un'emulsione di acqua in olio. I composti fenolici si trovano nell'interfaccia acqua/olio (Ambrosone, Cinelli *et al.*, 2006; Frankel, Huang *et al.*, 1994).

L'effetto del contenuto di acqua sull'estrazione di composti fenolici dall'OOV è stato osservato per la prima volta in laboratorio studiando l'effetto del sistema di

filtraggio del contenuto fenolico dell'OOV (Gómez-Caravaca, Cerretani *et al.*, 2007). In questa ricerca, è stata utilizzata l'LE per estrarre i composti fenolici. I risultati ottenuti dagli autori hanno evidenziato che i composti appartenenti al gruppo dei secoiridoidi, come il ligstroside aglicone e l'oleuropeina aglicone aumentavano notevolmente dopo riduzione del contenuto di acqua mediante filtraggio con cotone rispetto a OOV non filtrato. In effetti, in un'emulsione di tipo acqua in olio, i composti fenolici si stabilizzano intorno alle goccioline d'acqua, e l'affinità dei composti fenolici con l'estrazione mediante solvente è bassa in una matrice più polare (oli d'oliva con elevato contenuto di acqua), il che ne rende più difficile il recupero. Tuttavia, l'eliminazione parziale dell'acqua durante il processo di filtraggio rende i composti fenolici disponibili per l'estrazione con una miscela a base di sol-

vente apolare, il che determina l'apparente aumento della concentrazione nell'OOV filtrato. Cinque anni dopo, l'effetto del contenuto di acqua sull'estrazione di composti fenolici da campioni di OOV è stato confermato utilizzando l'SPE (Lozano-Sánchez, Cerretani *et al.*, 2012). Lavorando a livello di impianto pilota e usando filtri, gli autori hanno scoperto che i secoiridoidi nell'OOV filtrato sono responsabili dell'apparente incremento del contenuto fenolico totale. Infine, l'apparente incremento dei vari composti del gruppo dei secoiridoidi dovuto alla variazione del contenuto di acqua dell'OOV è stato confermato in uno studio più recente (Bakhouch, Lozano-Sánchez *et al.*, 2014a). Le strutture chimiche dei principali composti il cui recupero è stato influenzato dalla variazione del contenuto di acqua dell'OOV sono riportate nella **Figura 1**.

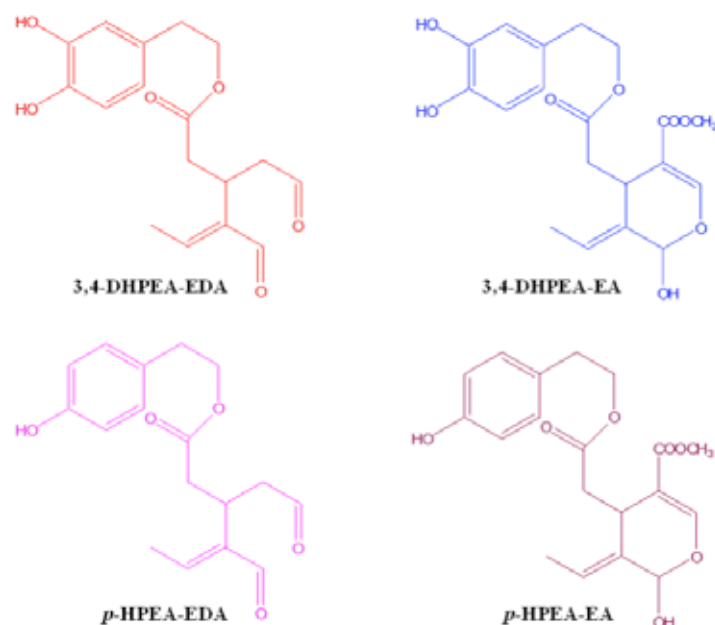


Figura 1: Struttura di alcuni composti fenolici influenzata dalla variazione del contenuto di acqua dell'OOV durante l'estrazione: 3,4-DHPEA-EDA, decarbossimetil oleuropeina aglicone; 3,4-DHPEA-EA, oleuropeina aglicone; p-HPEA-EDA, decarbossimetil-ligstroside aglicone; p-HPEA-EA, ligstroside aglicone.

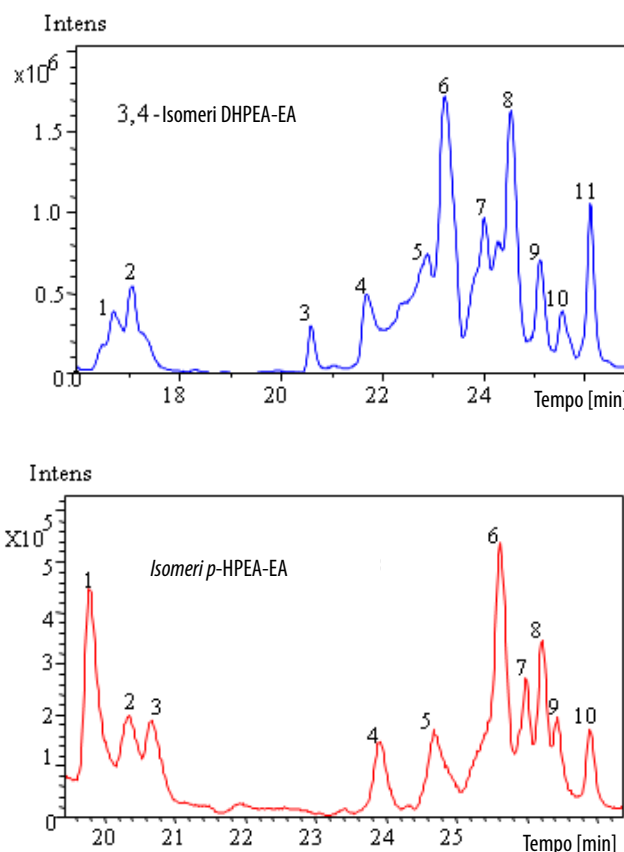
Questi studi hanno confermato l'effetto della variazione del contenuto di acqua dell'OOV indotta dal filtraggio sull'estrazione dei composti fenolici. È tuttavia risaputo che il contenuto di acqua dell'OOV varia anche secondo la fase di maturazione del frutto, la varietà di oliva e l'area geografica (Motilva, Tovar *et al.*, 2000; Taamalli, Gómez-Caravaca *et al.*, 2010). Molti studi hanno usato il profilo fenolico come impronta per distinguere le varietà di olive e per classificare l'OOV in base

all'origine geografica (denominazione d'origine) e stabilire il miglior periodo di raccolta per ottenere un OOV con elevato contenuto fenolico mentre sono stati realizzati altri studi sulla bioattività dei suoi composti fenolici (García-Villalba, Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2010; Karkoula, Skantzari *et al.*, 2012; Ouni, Taamalli *et al.*, 2011; Rotondi, Bendini *et al.*, 2004; Taamalli, Gómez-Caravaca *et al.*, 2010). Purtroppo, in tutti questi studi, non è stata considerata la variazione di contenuto di acqua

dell'OOV durante l'estrazione fenolica e questo potrebbe influire sulla precisione dei dati riportati nelle varie pubblicazioni per la concentrazione di questi analiti in tale olio. Recentemente, nel tentativo di risolvere il problema, è stato sviluppato un nuovo approccio per correggere l'effetto esercitato dalla riduzione di acqua dopo filtraggio dell'OOV sul recupero di composti fenolici usando uno standard interno durante l'estrazione. Di conseguenza, è stato corretto l'apparente aumento di secoiridoidi e i composti fenolici nell'OOV filtrato sono stati quantificati correttamente (Bakhouch, Lozano-Sánchez *et al.*, 2014b). Tuttavia, l'ottimizzazione del metodo proposto si basava unicamente sulla variazione del contenuto di acqua dell'OOV dopo il filtraggio. Le ricerche future devono quindi sviluppare un nuovo metodo estrattivo che si possa applicare a tutti i tipi di studi sull'OOV in relazione alla frazione fenolica e al contenuto di acqua. Fino ad allora, l'estrazione di composti fenolici dall'OOV continuerà a essere problematica.

Come è risaputo, dopo l'isolamento dei composti fenolici dall'OOV, la sfida successiva consiste nello stabilire un metodo affidabile per l'analisi degli estratti ottenuti. Anche se sono stati sviluppati metodi e apparecchiature analitiche potenti, a volte la caratterizzazione strutturale totale della frazione fenolica è tuttora impossibile a causa della complessità dell'ampio gruppo dei secoiridoidi. I principali composti identificati in questo gruppo sono l'oleuropeina aglicone, il ligstroside aglicone e i loro derivati come le forme idrossilate, decarbossimetilate, disidratate, e metilate. Attualmente, gli isomeri di questi composti sono oggetto di ricerche scientifiche. La prima ricerca ha caratterizzato undici isomeri dell'oleuropeina aglicone in OOV spagnolo (Fu, Segura-Carretero *et al.*, 2009) utilizzando la cromatografia liquida a risoluzione rapida abbinata alla spettrometria di massa electrospray a tempo di volo e a trappola ionica. In uno studio più recente, sono stati rilevati diciotto, diciassette e nove isomeri rispettivamente per l'oleuropeina aglicone, il ligstroside aglicone e l'acido elenico, utilizzando la cromatografia a fase inversa con tecnologia fused-core abbinata alla spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRMS) e alla spettrometria di massa tandem ad alta risoluzione (HRMS/MS), nelle modalità di ionizzazione a electrospray (ESI) positiva e negativa (Vichi, Cortés-Francisco *et al.*, 2013). Questi isomeri sono stati considerati risultato dell'isomerizzazione dell'oleuropeina e del ligstroside dopo idrolisi durante la maturazione dell'oliva

e la lavorazione industriale dell'olio d'oliva. Tuttavia, uno studio basato su HPLC-UV con colonne a fase inversa ha dimostrato che gli isomeri del decarbossimetil-ligstroside aglicone e del decarbossimetil-oleuropeina aglicone erano formati dalla reazione di questi due composti con l'acqua o il metanolo usati come fase mobile (Karkoula, Skantzari *et al.*, 2012). Inoltre, in uno studio più recente, gli stessi autori hanno dimostrato la formazione artificiale degli isomeri dell'oleuropeina e del ligstroside aglicone (Karkoula, Skantzari *et al.*, 2014). Gli isomeri quindi potrebbero anche formarsi durante l'analisi cromatografica a seconda della fase mobile utilizzata. Questo rilevamento ha confermato che la classica misurazione cromatografica di questi composti è problematica, specialmente in mezzi acquatici, e che molte delle misurazioni precedenti riportate nella letteratura sono più o meno discutibili. Si deve considerare che i metodi validati e ufficiali proposti da vari autori e commissioni internazionali utilizzano l'acqua come eluente per la fase mobile. Questo può influire sui risultati a causa dell'interazione tra acqua e alcuni composti fenolici, mettendo in dubbio la stima di questa frazione indicata per esempio nella **Figura 2** per i principali isomeri rilevato nell'OOV.



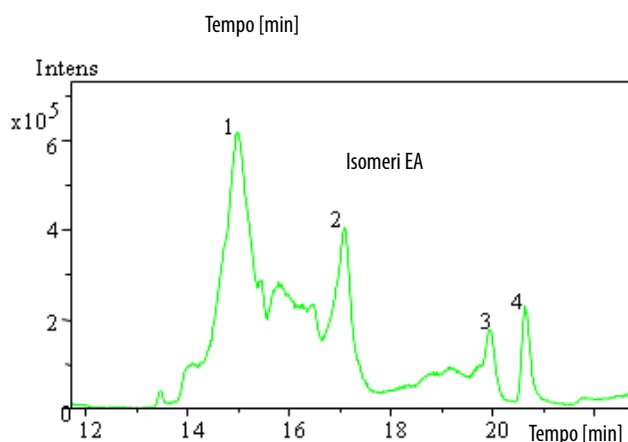


Figura 2: Isomeri di oleuropeina aglicone (3,4-DHPEA-EA), ligstroside aglicone (p-HPEA-EA), e acido elenolico (EA) ottenuti utilizzando HPLC-ESI-TOF/MS.

Conclusioni

I diversi metodi per l'isolamento e la separazione dei composti fenolici hanno risolto molti problemi relativi alla stima di questa frazione nell'OOV. Così facendo, sono stati facilmente dimostrati il valore nutrizionale e le proprietà salutari dell'OOV. Tuttavia, alcuni aspetti dei metodi citati devono essere migliorati. Per esempio, i dati controversi riportati nella letteratura rendono difficile la comparazione degli OOV prodotti in diverse parti del mondo in termini di contenuto fenolico. Sono quindi necessarie nuove ricerche al fine di individuare metodi accurati e armonizzati volti a evitare la confusione quando si comparano i diversi dati pubblicati. I miglioramenti richiesti devono tenere conto degli attuali problemi, specialmente l'effetto del contenuto di acqua dell'OOV sull'isolamento dei composti fenolici, e della formazione artificiale di alcuni isomeri durante la separazione cromatografica dovuta alla fase mobile impiegata.

Ringraziamenti

Siamo grati al Ministero spagnolo dell'economia e della competitività (progetto BFU2014-52433-C3-2-R) al Consiglio per l'Innovazione e la scienza del Governo regionale Andaluso (P11-CTS-7625), all'Università di Granada, al Centro di ricerca e sviluppo dell'alimento funzionale, al Consiglio Oleicolo Internazionale (IOC) per aver concesso una borsa di studio allo studente di dottorato.

Bibliografia

- Akasbi, M., Shoeman, D. M. and Saari Csallany, A. 1993. High-Performance Liquid Chromatography of Selected Phenolic Compounds in Olive Oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 70: 367–370.
- Ambrosone, L., Cinelli, G., Mosca, M. and Ceglie, A. 2006. Susceptibility of water-emulsified extra virgin olive oils to oxidation. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 83: 165–170.
- Angerosa, F., D'Alessandro, N., Corana, F. and Mellerio, G. 1996. Characterization of phenolic and secoiridoid aglycons present in virgin olive oil by gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 736: 195–203.
- Angerosa, F., D'Alessandro, N., Konstantinou, P. and Di Giacinto, L. 1995. GC-MS Evaluation of Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. *J. Agric. Food Chem.* 43: 1802–1807.
- Armaforte, E., Mancebo-Campos, V., Bendini, A., Desamparados Salvador, M., Fregapane, G. and Cerretani, L. 2007. Retention effects of oxidized polyphenols during analytical extraction of phenolic compounds of virgin olive oil. *J. Sep. Sci.* 30: 2401–2406.
- Bajoub, A., Carrasco-Pancorbo, A., Ajal, E. A., Ouazani, N. and Fernández-Gutiérrez, A. 2015. Potential of LC-MS phenolic profiling combined with multivariate analysis as an approach for the determination of the geographical origin of north Moroccan virgin olive oils. *Food Chem.* 166: 292–300.
- Bakhouch, A., Lozano-Sánchez, J., Ballus, C. A., Bendini, A., Gallina-Toschi, T., Fernández-Gutiérrez, A. and Segura-Carretero, A. 2014b. A new extraction approach to correct the effect of apparent increase in the secoiridoid content after filtration of virgin olive oil. *Talanta.* 127: 18–25.
- Bakhouch, A., Lozano-Sánchez, J., Ballus, C. A., Martínez-García, M., Velasco, G. M., Govantes, Á. O., Gallina-Toschi, T., Fernández-Gutiérrez, A. and Segura-Carretero, A. 2014a. Monitoring the moisture reduction and status of bioactive compounds in extra-virgin olive oil over the industrial filtration process. *Food Control.* 40: 292–299.
- Bakhouch, A., Lozano-Sánchez, J., Beltrán-Debón, R., Joven, J., Segura-Carretero, A. and Fernández-Gutiérrez, A. 2013. Phenolic characterization and geographical classification of commercial Arbequina extra-virgin olive oils produced in southern Catalonia. *Food Res. Int.* 50: 401–408.
- Bakhouch, A., Lozano-Sánchez, J., Bengana, M., Fernández-Gutiérrez, A. and Segura-Carretero, A. 2015. Time course of Algerian Azeradj extra-virgin olive oil quality during olive ripening. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 117: 0000–0000.
- Ballus, C. A., Meinhart, A. D., Bruns, R. E. and Godoy,

- H. T. 2011. Use of multivariate statistical techniques to optimize the simultaneous separation of 13 phenolic compounds from extra-virgin olive oil by capillary electrophoresis. *Talanta*, 83: 1181–1187.
- Ballus, C. A., Meinhardt, A. D., de Souza Campos, F. A., Bruns, R. E. and Godoy, H. T. 2014. Doehlert design-desirability function multi-criteria optimal separation of 17 phenolic compounds from extra-virgin olive oil by capillary zone electrophoresis. *Food Chem.* 146: 558–68.
- Bayram, B., Esatbeyoglu, T., Schulze, N., Ozcelik, B., Frank, J. and Rimbach, G. 2012. Comprehensive analysis of polyphenols in 55 extra virgin olive oils by HPLC-ECD and their correlation with antioxidant activities. *Plant foods Hum. Nutr.* 67: 326–36.
- Becerra-Herrera, M., Sánchez-Astudillo, M., Beltrán, R. and Sayago, A. 2014. Determination of phenolic compounds in olive oil: New method based on liquid-liquid micro extraction and ultra high performance liquid chromatography-triple-quadrupole mass spectrometry. *LWT - Food Sci. Technol.* 57: 49–57.
- Bendini, A., Bonoli, M., Cerretani, L., Biguzzi, B., Lercker, G. and Toschi, T. G. 2003. Liquid – liquid and solid-phase extractions of phenols from virgin olive oil and their separation by chromatographic and electrophoretic methods. *J. Chromatogr. A* 985:425–433
- Bengana, M., Bakhouch, A., Lozano-sánchez, J., Amir, Y., Youyou, A., Segura-Carretero, A. and Fernández-Gutiérrez, A. 2013. Influence of olive ripeness on chemical properties and phenolic composition of Chemlal extra-virgin olive oil. *Food Res. Int.* 54: 1868–1875.
- Bonoli, M., Montanucci, M., Toschi, T. G. and Lercker, G. 2003. Fast separation and determination of tyrosol, hydroxytyrosol and other phenolic compounds in extra-virgin olive oil by capillary zone electrophoresis with ultraviolet-diode array detection. *J. Chromatogr. A* 1011: 163–172.
- Brenes, M., Garcá, A., Garcá, P. and Garrido, A. 2000. Rapid and Complete Extraction of Phenols from Olive Oil and Determination by Means of a Coulometric Electrode Array System. *J. Agric. Food Chem.* 48: 5178–5183.
- Carrasco-pancorbo, A., Arráez-román, D., Segura-carretero, A. and Fernández-gutiérrez, A. 2006b. Capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry method to determine the phenolic fraction of extra-virgin olive oil. *Electrophoresis*. 27: 2182–2196.
- Carrasco-Pancorbo, A., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Gallina-Toschi, T. and Fernández-Gutiérrez, A. 2005. Analytical determination of polyphenols in olive oils. *J. Sep. Sci.* 28: 837–858.
- Carrasco-Pancorbo, A., Gómez-Caravaca, A. M., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A. and Fernández-Gutiérrez, A. 2006a. A simple and rapid electrophoretic method to characterize simple phenols, lignans, complex phenols, phenolic acids, and flavonoids in extra-virgin olive oil. *J. Sep. Sci.* 29: 2221–2233.
- Carrasco-Pancorbo, A., Nevedomskaya, E., Arthen-Engeland, T., Zurek, G., Baessmann, C., Deelder, A. M. and Mayboroda, O. A. 2009. Gas Chromatography/ Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry: Analytical Validation and. *Anal. Chem.* 81: 10071–10079.
- Covas, M. I. 2007. Olive oil and the cardiovascular system. *Pharmacol. Res.* 55: 175–86.
- Dabbou, S., Chehab, H., Faten, B., Dabbou, S., Esposto, S., Selvaggini, R., Taticchi, A., Servili, M., Montedoro, G. F. and Hammamia, M. 2010. Effect of three irrigation regimes on Arbequina olive oil produced under Tunisian growing conditions. *Agric. Water Manage.* 97: 763–768
- De la Torre-Carbot, K., Jauregui, O., Gimeno, E., Castellote, A. I., Lamuela-Raventó, R. M. and López-Sabater, M. C. 2005. Characterization and Quantification of Phenolic Compounds in Olive Oils by Solid-Phase Extraction , HPLC-DAD , and HPLC-MS / MS. *J. Agric. Food Chem.* 53: 4331–4340.
- Etrakis, P. A. V. P., Giomyrgianaki, A. L. A., Hristophoridou, S. T. C., Pyros, A. P. S. and Ais, P. H. D. 2008. Geographical Characterization of Greek Virgin Olive Oils (Cv. Koroneiki) Using ^1H and ^{31}P NMR Fingerprinting with Canonical Discriminant Analysis and Classification Binary Trees. *J. Agric. Food Chem.* 56: 3200–3207.
- Farajzadeh, M. A., Yadeghari, A., Khoshmaram, L. and Ghorbanpour, H. 2014. Analytical Methods Development and validation of a rapid and sensitive gas chromatographic method for the analysis of some phenolic compounds in vegetable oils. *Anal. Methods*. 6: 5314–5321.
- Fitó, M., de la Torre, R. and Covas, M. I. 2007. Olive oil and oxidative stress. *Mol. Nutr. Food Res.* 51: 1215–24.
- Franco, M. N., Galeano-Díaz, T., López, O., Fernández-Bolaños, J. G., Sánchez, J., De Miguel, C., Gil, M. V. and Martín-Vertedor, D. 2014. Phenolic compounds and antioxidant capacity of virgin olive oil. *Food Chem.* 163: 289–98.
- Frankel, E., Bakhouch, A., Lozano-Sánchez, J., Segura-Carretero, A. and Fernández Gutiérrez, A. 2013. Literature Review on Production Process To Obtain Extra Virgin Olive Oil Enriched in Bioactive Compounds. Potential Use of Byproducts as Alternative Sources of Polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 61: 5179–5188.
- Frankel, E., Huang, S., Kanner, J. and German, J. B. 1994. Interfacial Phenomena in the Evaluation of Antioxidants: Bulk Oils vs Emulsionst. *J. Agric. Food Chem.* 42: 1054–1059.
- Fu, S., Segura-Carretero, A., Arráez-Román, D.,

- Menéndez, J. A., De La Torre, A. and Fernández-Gutiérrez, A. 2009. Tentative characterization of novel phenolic compounds in extra virgin olive oils by rapid-resolution liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 57: 11140–11147.
- Garcia, B., Coelho, J., Costa, M., Pinto, J. and Paiva-Martins, F. 2013. A simple method for the determination of bioactive antioxidants in virgin olive oils. *J. Sci. Food Agric.* 93: 1727–32.
- García-Villalba, R., Carrasco-Pancorbo, A., Oliveras-Ferreros, C., Vázquez-Martín, A., Menéndez, J. A., Segura-Carretero, A. and Fernández-Gutiérrez, A. 2010. Characterization and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils with anticancer properties by a rapid and resolute LC-ESI-TOF MS method. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51: 416–29.
- García-Villalba, R., Pacchiarotta, T., Carrasco-Pancorbo, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Deelder, A. M. and Mayboroda, O. A. 2011. Gas chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-time of flight mass spectrometry for profiling of phenolic compounds in extra virgin olive oil. *J. Chromatogr. A* 1218: 959–971.
- Godoy-Caballero, M. D. P., Acedo-Valenzuela, M. I. and Galeano-Díaz, T. 2013. New reversed phase dispersive liquid-liquid microextraction method for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil by rapid resolution liquid chromatography with ultraviolet-visible and mass spectrometry detection. *J. Chromatogr. A* 1313: 291–301.
- Godoy-Caballero, M. D. P., Acedo-Valenzuela, M. I. and Galeano-Díaz, T. 2012a. Simple quantification of phenolic compounds present in the minor fraction of virgin olive oil by LC-DAD-FLD. *Talanta* 101: 479–87.
- Godoy-Caballero, M. D. P., Acedo-Valenzuela, M. I., Durán-Merás, I. and Galeano-Díaz, T. 2012b. Development of a non-aqueous capillary electrophoresis method with UV-visible and fluorescence detection for phenolics compounds in olive oil. *Anal. Bioanal. Chem.* 403: 279–90.
- Godoy-Caballero, M. D. P., Galeano-Díaz, T. and Acedo-Valenzuela, M. I. 2012c. Simple and fast determination of phenolic compounds from different varieties of olive oil by nonaqueous capillary electrophoresis with UV-visible and fluorescence detection. *J. Sep. Sci.* 35: 3529–39.
- Gómez-Caravaca, A. M., Carrasco Pancorbo, A., Cañabate Díaz, B., Segura Carretero, A. and Fernández Gutiérrez, A. 2005. Electrophoretic identification and quantitation of compounds in the polyphenolic fraction of extra-virgin olive oil. *Electrophoresis* 26: 3538–51.
- Gómez-Caravaca, A. M., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. and Lcker, G. 2007. Effect of filtration systems on the phenolic content in virgin olive oil by HPLC-DAD-MSD. *Am. J. Food Technol.* 2: 671–678.
- Gómez-Rico, A., Salvador, M. D., La Greca, M. and Fregapane, G. 2006. Phenolic and Volatile Compounds of Extra Virgin Olive Oil (*Olea europaea* L . Cv . Cornicabra) with Regard to Fruit. *J. Agric. Food Chem.* 54: 7130–7136.
- Hrncirik, K. and Fritsche, S. 2004. Comparability and reliability of different techniques for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 106: 540–549.
- International Olive Council. 2009. Determination of biophenols in olive oils by HPLC. COI/T.20/Doc No 29.
- Karkoula, E., Skantzari, A., Melliou, E. and Magiatis, P. 2012. Direct measurement of oleocanthal and oleacein levels in olive oil by quantitative (1)H NMR. Establishment of a new index for the characterization of extra virgin olive oils. *J. Agric. Food Chem.* 60: 11696–703.
- Karkoula, E., Skantzari, A., Melliou, E. and Magiatis, P. 2014. Quantitative Measurement of Major Secoiridoid Derivatives in Olive Oil Using qNMR. Proof of the Artificial Formation of Aldehydic Oleuropein and Ligstroside Aglycon Isomers. *J. Agric. Food Chem.* 62: 600–607.
- Laura Capriotti, A., Cavaliere, C., Crescenzi, C., Foglia, P., Nescatelli, R., Samperi, R. and Laganà, A. 2014. Comparison of extraction methods for the identification and quantification of polyphenols in virgin olive oil by ultra-HPLC-QToF mass spectrometry. *Food Chem.* 158: 392–400.
- Lerma-García, M. J., Lantano, C., Chiavaro, E., Cerretani, L., Herrero-Martínez, J. M. and Simó-Alfonso, E. F. 2009. Classification of extra virgin olive oils according to their geographical origin using phenolic compound profiles obtained by capillary electrochromatography. *Food Res. Int.* 42: 1446–1452.
- Liberatore, L., Procida, G., D'Alessandro, N. and Cichelli, A. 2001. Solid-phase extraction and gas chromatographic analysis of phenolic compounds in virgin olive oil. *Food Chem.* 73: 119–124.
- Lozano-Sánchez, J., Cerretani, L., Bendini, A., Gallina-Toschi, T., Segura-Carretero, A. and Fernández-Gutiérrez, A. 2012. New filtration systems for extra-virgin olive oil: effect on antioxidant compounds, oxidative stability, and physicochemical and sensory properties. *J. Agric. Food Chem.* 60: 3754–62.
- Lozano-Sánchez, J., Segura-Carretero, A., Menendez, A. J., Oliveras-Ferreros, C., Cerretani, L. and Fernández-Gutiérrez, A. 2010. Prediction of Extra Virgin Olive Oil Varieties through Their Phenolic Profile . Potential Cytotoxic Activity against Human Breast Cancer Cells. *J. Agric. Food Chem.* 58: 9942–9955.
- Mateos, R., Espartero, L., Trujillo, M., Rí, J. J. and Leo,

- M. 2001. Determination of Phenols , Flavones , and Lignans in Virgin Olive Oils by Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Ultraviolet Detection. *J. Agric. Food Chem.* 49: 2185–2192.
- Montedoro, G., Servili, M., Baldioli, M., Miniati, E., Agrarie, I. and Costanzo, V. S. 1992. Simple and Hydrolyzable Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. 1 . Their Extraction , Separation , and Quantitative and Semiquantitative Evaluation by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* 40: 1571–1576.
- Motilva, M. J., Tovar, M. J., Romero, M. P., Alegre, S. and Girona, J. 2000. Influence of regulated deficit irrigation strategies applied to olive trees (Arbequina cultivar) on oil yield and oil composition during the fruit ripening period. *J. Sci. Food Agric.* 80: 2037–2043.
- Ouni, Y., Taamalli, A., Gómez-Caravaca, A. M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. and Zarrouk, M. 2011. Characterisation and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils according to their geographical origin by a rapid and resolute LC-ESI-TOF MS method. *Food Chem.* 127: 1263–7.
- Parenti, A., Spugnoli, P., Masella, P. and Calamai, L. 2008. The effect of malaxation temperature on the virgin olive oil phenolic profile under laboratory-scale conditions. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 110: 735–741.
- Pirisi, F. M., Cabras, P., Cao, C. F., Migliorini, M. and Muggelli, M. 2000. Phenolic compounds in virgin olive oil. 2. Reappraisal of the extraction, HPLC separation, and quantification procedures. *J. Agric. Food Chem.* 48: 1191–1196.
- Pizarro, M. L., Becerra, M., Sayago, A., Beltrán, M. and Beltrán, R. 2013. Comparison of Different Extraction Methods to Determine Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. *Food Anal. Methods.* 6: 123–132.
- Purcaro, G., Codony, R., Pizzale, L., Mariani, C. and Conte, L. 2014. Evaluation of total hydroxytyrosol and tyrosol in extra virgin olive oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 116: 805–811.
- Ríos, J. J., Gil, M. J. and Gutiérrez-Rosales, F. 2005. Solid-phase extraction gas chromatography-ion trap-mass spectrometry qualitative method for evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil and structural confirmation of oleuropein and ligstroside aglycons and their oxidation products. *J. Chromatogr. A.* 1093: 167–176.
- Rotondi, A., Bendini, A., Cerretani, L., Mari, M., Lercker, G. and Toschi, T. G. 2004. Effect of olive ripening degree on the oxidative stability and organoleptic properties of cv. Nostrana di Brisighella extra virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* 52: 3649–54.
- Saitta, M., Curto, S. Lo, Salvo, F., Bella, G. D. and Dugo, G. 2002. Gas chromatographic–tandem mass spectrometric identification of phenolic compounds in Sicilian olive oils. *Anal. Chim. Acta.* 466: 335–344.
- Selvaggini, R., Servili, M., Urbani, S., Esposto, S., Taticchi, A. and Montero, G. F. 2006. Evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil by direct injection in high-performance liquid chromatography with fluorometric detection. *J. Agric. Food Chem.* 54: 2832–2838.
- Servili, M., Montedoro, G. F. and Hammami, M. 2010. Effect of three irrigation regimes on Arbequina olive oil produced under Tunisian growing conditions. *Agric. Water Manag.* 97: 763–768.
- Taamalli, A., Abaza, L., Arráez Román, D., Segura-Carretero, A., Fernández Gutiérrez, A., Zarrouk, M. and Nabil, B. Y. 2013. Characterisation of phenolic compounds by HPLC-TOF/IT/MS in buds and open flowers of “Chemlali” olive cultivar. *Phytochem. Anal.* 24: 504–512.
- Taamalli, A., Gómez-Caravaca, A. M., Zarrouk, M., Segura-Carretero, A. and Fernández-Gutiérrez, A. 2010. Determination of apolar and minor polar compounds and other chemical parameters for the discrimination of six different varieties of Tunisian extra-virgin olive oil cultivated in their traditional growing area. *Eur. Food Res. Technol.* 231: 965–975.
- Tena, N., García-González, D. L. and Aparicio, R. 2009. Evaluation of Virgin Olive Oil Thermal Deterioration by Fluorescence Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 57: 10505–10511.
- Vichi, S., Cortés-Francisco, N. and Caixach, J. 2013. Insight into virgin olive oil secoiridoids characterization by high-resolution mass spectrometry and accurate mass measurements. *J. Chromatogr. A.* 1301: 48–59.
- Zafra-Gómez, A., Luzón-Toro, B., Jiménez-Díaz, I., Ballesteros, O. and Navalón, A. 2010. Quantification of phenolic antioxidants in rat cerebrospinal fluid by GC-MS after oral administration of compounds. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 53: 103–108.

Variabilità delle prestazioni agronomiche di una collezione di ibridi di olivo (*Olea europaea* L.) della varietà locale da olio “Chemlali Sfax”

**Ben Amar F.*, Mezghani-Aiachi M., Yengui A., Belguith H.,
Harrab S., Hergli M.K.**

¹ Institut de l'Olivier – Route de l'aéroport Km 1,5 – BP 1087 – 3000 Sfax (Tunisia)

*Corrispondente: fathi.benamar@iresa.agrinet.tn

Riassunto

Lo studio di alcuni parametri agronomici in una collezione di ibridi della varietà locale di oliva Chemlali Sfax ha evidenziato una variabilità piuttosto importante. La collezione comprende 145 ibridi di Chemlali Sfax con vari genitori locali e stranieri e soprattutto con la varietà italiana Coratina (90). La produzione annuale di olive della collezione varia da 1,9 kg nel 2010 a 9 kg nel 2005, con un'ampia variabilità interannuale. La produzione media per incrocio varia tra 3,35 kg (Chemlali/Sigoise) e 4,86 kg (Chemlali/Souri), con una variabilità meno importante rispetto a quella annuale. L'indice di alternanza della produzione è elevato e varia da 0,71 (Chemlali/Souri) a 0,87 (Arbéquina/Chemlali) con scarsa variabilità nell'ambito di ogni incrocio. Per quanto riguarda il portamento dell'albero, il 97% degli ibridi della collezione hanno un portamento espanso (55 %) o eretto (35 %), con il portamento ricadente scarsamente rappresentato (10 %). La caratteristica degli ibridi ottenuti dagli incroci tra Chemlali Sfax e Coratina è di avere una percentuale di portamento ricadente più elevata rispetto a quella di tutta la collezione (26%). Lo stato dell'albero (produttivo o vegetativo) degli ibridi varia a seconda dell'anno e lo stato produttivo su due anni consecutivi è più elevato tra gli ibridi di Chemlali Sfax e Coratina (58%) che in tutta la collezione (17,5%).

Abstract

Study of a number of agronomic parameters in a collection of hybrids of the local 'Chemlali Sfax' olive variety revealed considerable variability. The collection contains 145 hybrids of 'Chemlali Sfax' obtained from several local and foreign genitors, in particular the Italian 'Coratina' variety (90). The annual crop production of the collection varied from 1.9 kg in 2010 to 9 kg in 2005 and showed wide intra-annual variability. Average production per cross varied between 3.35 kg ('Chemlali'/'Sigoise') and 4.86 kg ('Chemlali'/'Souri'), thus recording smaller variability than annual production. The alternate bearing index was high, ranging from 0.71 ('Chemlali'/'Souri') to 0.87 ('Arbequina'/'Chemlali'), and showed little variability within each cross. The growth habit of the hybrids in the collection was spreading (55%) or erect (35%) in 90% of the cases and drooping in only 10%. The hybrids obtained by crossing 'Chemlali Sfax' and 'Coratina' were characterised by a higher percentage of trees with a drooping growth habit (26%) compared with the collection as a whole. Hybrid tree status (on-crop or off-crop) differed according to year. The percentage of 'Chemlali Sfax'/'Coratina' hybrids with on-crop status in two consecutive years (58%) was higher than in the collection as a whole (17.5%).

Introduzione

L'ibridazione controllata nell'olivo è relativamente recente e risale alla seconda metà del secolo scorso. Gli incroci controllati sono stati adottati in Israele per mettere a punto varietà in grado di rispondere a condizioni di coltura lussuose e adattate a un'industria intensiva e redditizia (Lavee *et al.*, 2003). I lavori svolti hanno permesso di ottenere diverse nuove varietà: *Kadesh* (Lavee, 1978), *Barnea* (Lavee *et al.*, 1986), *Maalot* (Lavee *et al.*, 1999), *Askal* (Lavee *et al.*, 2003) e *Kadeshon*, *Sepoka* e *Masepo* (Lavee *et al.*, 2004).

In Spagna, è stato attuato un programma di ibridazione a partire dal 1991. Così, sono stati realizzati incroci reciproci tra cultivar al fine di ridurre il periodo giovanile e di migliorare la produzione di olive e la resa in olio delle olive. Recentemente, è stata selezionata una nuova varietà (*Chiquitita*) (Rallo *et al.*, 2008).

Questa tecnica è stata utilizzata anche in Cina per tentare di selezionare varietà adattate alle condizioni pedoclimatiche del paese in seguito al fallimento della sperimentazione di varietà introdotte dal Mediterraneo (Fontanazza e Baldoni, 1990). Sono state ottenute nuove cultivar resistenti al freddo (Gu Ying *et al.*, 1984).

In Italia, è stato avviato un programma di miglioramento genetico nel 1971 a partire da incroci controllati che hanno portato all'ottenimento di 5.000 ibridi (Bellini *et al.*, 2000 a). I lavori di selezione che tengono conto dei criteri di vigore, di produttività e di qualità della drupa hanno permesso di individuare nuove cultivar a duplice vocazione: *Arno*, *Tevere* e *Basento* (Bellini *et al.*, 2000 b).

In Francia, un programma di selezione di semenzali ottenute con ibridazione non controllata ha permesso di includere nel 1998 una nuova varietà nel *Catalogue officiel des espèces et variétés fruitières* (Catalogo ufficiale delle specie e varietà fruttifere), la *Moncita* (www.Olivettes.fr), caratterizzata da un periodo di improduttività ridotto e da una buona qualità dell'olio.

Nei paesi del Sud del Mediterraneo, il Consiglio oleicolo internazionale ha avviato nel 1993 un programma di miglioramento genetico attraverso incroci controllati che ha interessato 5 paesi mediterranei, tra cui Tunisia e Marocco (Trigui e Msallem, 2002). In Marocco, lo studio degli ibridi ottenuti ha permesso di selezionare cinque cultivar con buone prestazioni (Ministero dell'Agricoltura marocchino, 2013).

In Tunisia, dal 1993 al 1996, questo programma ha interessato le varietà più coltivate, ossia *Chemlali Sfax*, *Chétoui* e *Meski*. La varietà da olio *Chemlali Sfax* si caratterizza per il vigore, l'adattamento a diversi ambienti e la produttività (Trigui, 1996). Presenta tuttavia problemi a livello di composizione acidica del suo olio: scarso contenuto di acido oleico ed elevato contenuto di acido palmitico (Grati-Kamoun e Khelif, 2001). Le ibridazioni di questa varietà hanno lo scopo di ottenere nuovi genotipi performanti a livello di composizione acidica conservando al tempo stesso le buone qualità di questa varietà.

Gli ibridi ottenuti vengono piantati sotto forma di collezione nella regione di Sfax dal 1997 in due località: la stazione di "Taous" e la sede dell'Institut de l'Olivier (IO). È stata fatta una selezione preliminare di un centinaio di ibridi sulla base della composizione di acido oleico (> 65%) (IO, 2005). È stato avviato un lavoro di caratterizzazione di questi ibridi per una selezione finale.

L'obiettivo di questa comunicazione è presentare determinate prestazioni agronomiche di una collezione di ibridi, relative al portamento e allo stato dell'albero, e alla produzione.

Materiale e metodi

Il materiale vegetale di questo studio era costituito da 145 ibridi piantati presso la sede dell'Institut de l'Olivier a Sfax (Tunisia) che ha le seguenti coordinate geografiche: latitudine 34° 44' 02" Nord; longitudine 10° 43' 59" Est; altitudine 6 m. L'ibridazione della varietà *Chemlali Sfax* è stata effettuata con diverse varietà locali e introdotte.

L'impianto è stato effettuato con una densità di 1.250 alberi/ettaro, ossia una distanza di 2 m x 4 m e in regime di irrigazione localizzata.

Il monitoraggio di questa collezione ha riguardato i seguenti parametri:

- La produzione di olive in kg per ibrido è stata rilevata a novembre durante il periodo 2005-2013. Si è calcolata così la produzione media per anno di tutta la collezione e per incrocio per tutto il periodo di monitoraggio.
- L'indice di alternanza per tutto il periodo di monitoraggio è stato calcolato per mezzo della formula di Hoblyn *et al.* (1936) a livello di singolo incrocio.

- Il portamento dell'albero è stato rilevato in novembre come eretto, espanso o ricadente in base alle norme del COI (1997).
- Lo stato dell'albero è stato controllato per due anni successivi ed è stato qualificato come produttivo o vegetativo.

I dati raccolti sono presentati per l'intera collezione e per ogni incrocio. Ogni media è presentata con la deviazione standard e la variabilità di ogni media è misurata mediante coefficiente di variazione ((deviazione standard/media)*100).

Risultati e discussione

Inventario della collezione

La collezione dell'Institut de l'Olivier accoglie in totale 145 ibridi appartenenti a 13 incroci diversi (Tabella 1). A parte i due ibridi ottenuti con impollinazione li-

bera della varietà *Chemlali Sfax*, gli altri incroci hanno fatto intervenire diversi genitori di paesi mediterranei. Si tratta di genitori provenienti da Francia (*Picholine* e *Lucques*), Libano (*Souri*), Algeria (*Sigoise*), Tunisia (*Chemchali* e *Sig 4*), Spagna (*Arbequina* e *Manzanilla*) e Italia (*Coratina*).

Sottolineiamo che il 62% degli ibridi provengono dall'incrocio tra *Chemlali Sfax* e *Coratina* e il suo reciproco. Questo numero rappresenta un punto di forza del programma di ibridazione per via delle buone attitudini floreali e tecnologiche della varietà *Coratina*. In effetti, Al-Kasasbeh *et al.* (2005) riferiscono che questa varietà è dotata di buone caratteristiche polliniche e floreali poiché presenta percentuali elevati per quanto riguarda i fiori perfetti, il numero di pollini per fiore e i fiori fertili mediante impollinazione incrociata. D'altra parte, Zarrouk *et al.* (2009) evidenziano che l'olio di *Coratina* ha una composizione acidica equilibrata poiché presenta un contenuto elevato di acido oleico (70%) e piuttosto scarso di acido palmitico (9%). Ci si può aspettare da questo incrocio una selezione efficace di ibridi.

Tabella 1. Ripartizione degli ibridi della collezione dell'Institut de l'Olivier secondo l'incrocio

Incrocio	Numero di ibridi
Arbequina/Chemlali	6
Chemlali/Arbequina	2
Chemlali/Coratina	84
Coratina/Chemlali	6
Chemlali/Lucques	8
Chemlali/Sigoise	13
Chemlali/Souri	17
Koroneiki/Chemlali	3
Chemlali Libre	2
Chemlali/Manzanilla	1
Chemlali/Picholine	1
Chemlali/Sig 4	1
Chemlali/Chemchali	1
Totale	145

Produzione di olive all'anno

La produzione annua di olive della collezione di ibridi presenta variazioni importanti, da 1,9 kg nel 2010 a 9 kg nel 2005 (Figura 1). Per ogni anno, si nota una notevole variabilità tra gli ibridi poiché il coefficiente di variazione ha superato nel 2013 il 200%. La variabilità interan-

nale denota un comportamento produttivo abbastanza diversificato tra gli ibridi, che può permettere una selezione efficace a livello di produttività nelle condizioni di gestione dell'appezzamento. D'altra parte, la variabilità interannuale può rivelare una tendenza all'alternanza di produzione. Si deve quindi riservare particolare attenzione a questo criterio nella selezione finale degli ibridi.

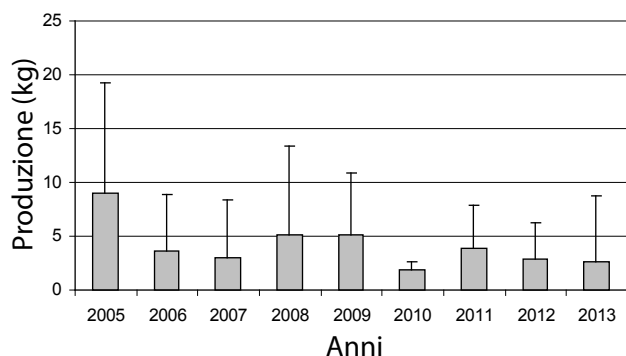


Figura 1: Produzione di olive degli ibridi secondo l'anno (barra orizzontale = deviazione standard)

Produzione di olive per incrocio

La produzione media per incrocio ha interessato sei incroci con più di tre ibridi nella collezione (Figura 2). Questo criterio è meno variabile di quello della produzione annua poiché i valori oscillano tra 3,35 kg (*Chemlali/Sigoise*) e 4,86 kg (*Chemlali/Souri*). Anche la variabilità tra gli ibridi di ogni incrocio è meno importante di quella annuale, con un coefficiente di variazione massimo dell'83,7%. La variabilità constatata permetterà di effettuare una selezione di ibridi provenienti dalla maggior parte degli incroci.

Notiamo che l'andamento della produzione è praticamente lo stesso per gli incroci reciproci tra *Chemlali Sfax* e *Coratina*. Questa constatazione può indicare che in questo incrocio il determinismo genetico del carattere di produzione è indipendente dal genitore. La selezione per la produzione di olive può così essere efficace nei due incroci reciproci.

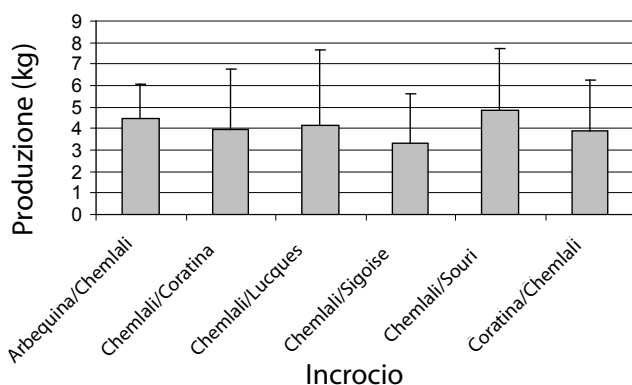


Figura 2: Produzione di olive degli ibridi secondo l'incrocio (Barra orizzontale = deviazione standard)

Alternanza di produzione

L'indice di alternanza ha interessato gli stessi sei ibridi (Figura 3). È molto poco variabile tra gli incroci ma abbastanza elevato, poiché i valori variano da 0,71 (*Chemlali/Souri*) a 0,87 (*Arbequina/Chemlali*). Anche la variabilità tra gli ibridi di ogni incrocio è poco importante, con un coefficiente di variazione massimo del 16,2%. Questi risultati indicano che la collezione degli ibridi studiati è caratterizzata da un fenomeno di alternanza rigorosa nelle condizioni dello studio. Questo fa supporre che la selezione di ibridi produttivi sarà accompagnata da un grado di alternanza elevato. L'aspetto di alternanza della collezione degli ibridi può trarre origine dalla varietà oggetto del programma di miglioramento *Chemlali Sfax*, conosciuta, secondo Trigui e Msallem (2002), per l'alternanza della produzione.

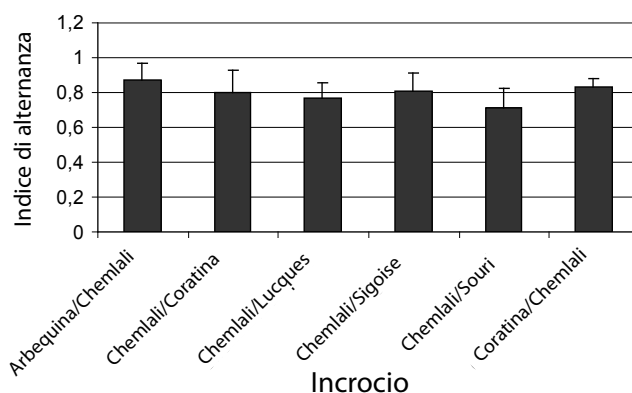


Figura 3: Indice di alternanza degli ibridi a seconda dell'incrocio (Barra orizzontale = deviazione standard)

Portamento dell'albero

In base alla Figura 4, quasi il 97% degli ibridi della collezione hanno un portamento espanso (55%) o eretto (35%). Il portamento ricadente è scarsamente rappresentato, con il 10%. Gli ibridi ottenuti dagli incroci tra *Chemlali Sfax* e *Coratina* evidenziano la percentuale di portamento espanso più elevata (45%), che rimane comunque più scarsa rispetto a quella di tutta la collezione (Figura 5). Il portamento eretto di questi ibridi è simile a quello della collezione (29%). Si nota tuttavia che la percentuale di portamento ricadente di questo gruppo di ibridi è nettamente più elevata di quella della collezione (26%).

Il predominio del portamento espanso nei due casi ricorda il portamento della varietà *Chemlali Sfax* riferito da Barranco *et al.* (2000) e Trigui e Msallem (2002). La presenza del portamento eretto negli ibridi della collezione può derivare dai genitori utilizzati, come *Souri* e *Lucques*, secondo Barranco *et al.* (2000). D'altra parte, l'aumento significativo della percentuale di portamento ricadente negli incroci di *Chemlali Sfax* e *Coratina* può indicare un determinismo genetico molto particolare in queste due varietà. Si deve quindi effettuare uno studio genetico e molecolare dei due genitori e dei loro ibridi per chiarire questo determinismo. I risultati di questo studio saranno molto utili nei programmi di miglioramento genetico dell'olivo per la selezione delle varietà con portamento ricadente. Queste varietà sono attualmente molto ricercate per la coltura iperintensiva dell'olivo che, secondo Tombesi (2013), guadagna sempre più terreno nell'oliveto mondiale. Nella nostra collezione, è possibile la selezione per i diversi tipi di portamento.

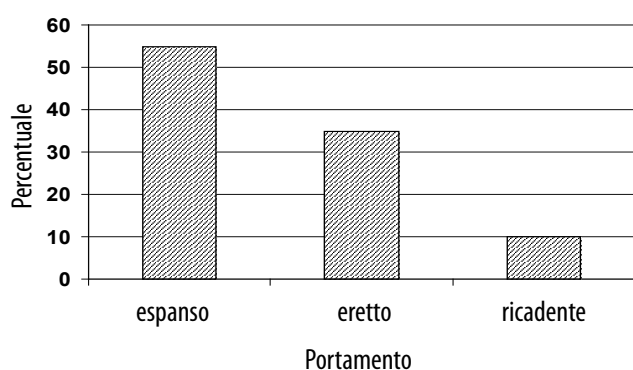


Figura 4: Variabilità del portamento dell'albero degli ibridi della collezione

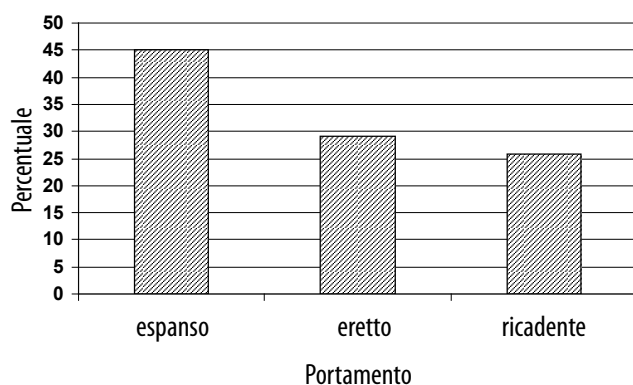


Figure 5: Variabilità del portamento dell'albero degli ibridi ottenuti mediante incroci tra *Chemlali Sfax* e *Coratina*

Stato dell'albero

La Tabella 2 evidenzia che il comportamento degli ibridi della collezione durante il primo anno è per la maggior parte non produttivo, con il 72%. Gli ibridi ot-

tenuti dagli incroci delle varietà *Chemlali Sfax* e *Coratina* sono invece abbastanza in produzione, con il 58%. Nel corso del secondo anno, gli ibridi di tutta la collezione sono per metà in produzione a fronte della totalità degli ibridi degli incroci di *Chemlali Sfax* e *Coratina*. Di conseguenza, gli ibridi in produzione durante i due anni rappresentano il 17,5% soltanto della collezione e il 58% del gruppo derivante dalle varietà *Chemlali Sfax* e *Coratina*.

Questi valori confermano la presenza del fenomeno dell'alternanza di produzione constatato in questa collezione di ibridi. Il fenomeno è tuttavia meno visibile negli ibridi ottenuti dagli incroci di *Chemlali Sfax* e *Coratina*. La selezione per l'alternanza di produzione sarà più efficace con gli ibridi delle due varietà *Chemlali Sfax* e *Coratina* che negli altri incroci.

Tabella 2. Percentuale dello stato dell'albero degli ibridi nel corso di due anni successivi

Materiale vegetale	Stato	Anno 1	Anno 2	2 anni
Collezione di ibridi	Vegetativo	72	48	
	Produttivo	28	52	17.5
Incrocio <i>Chemlali Sfax</i> e <i>Coratina</i>	Vegetativo	42	0	
	Produttivo	58	100	58

Conclusioni

Si evince dal presente studio dei parametri agronomici della collezione di ibridi della varietà *Chemlali Sfax* che la selezione per questi parametri è promettente. D'altronde, i lavori svolti dal 2005 hanno portato a una selezione preliminare di ibridi che sono oggetto di una valutazione finale. Si prevede in un prossimo futuro l'inserimento finale di determinati ibridi nel *Catalogue national des variétés* (Catalogo nazionale delle varietà).

Riferimenti bibliografici

Al-Kasasbeh M.F., Atteyyeh A.F., Qrunfleh M.M., 2005. A study on self and cross-pollination of three olive varieties in Jordan. *Dirasat Agricultural scien-*

ces 32 (2): 222-227.

Bellini E., Giordani E., Parlati M.V., Pandolfi S., 2000 a. Olive genetic improvement: Thirty years of research. *Acta Horticulturae* 586: 105-108.

Bellini E., Giordani E., Parlati M.V., 2000 b. Three new olive cultivars obtained by cross breeding. *Acta Horticulturae* 586: 221-223.

COI, 1997. Méthodologie pour la caractérisation primaire et secondaire des variétés d'olivier. Projet RES-GEN-CT (96/97). Union européenne-COI.

COI, 2000. Catalogue mondial des variétés d'olivier. Barranco D., Cimato A., Fiorino P., Rallo L., Touzani A., Castañeda C., Serafini F., Trujillo I., 360 p illustrées. Fontanazza G., Baldoni L., 1990. Proposition pour un programme d'amélioration génétique de l'olivier. *Olivae* 34 : 32-40.

Grati-Kamoun N., Khelif M., 2001. Caractérisation technologique des variétés d'olivier cultivées en Tunisie. *Revue Ezzitouna* (numéro spécial). 69 p.

IO, 2005. Rapport d'activité de l'Institut de l'Olivier pour l'année 2005.

Lavee S. 1978. Kadesh table olive. *HortScience* 131 (1): 62-63.

Lavee S., Haskal A., Wodner M. 1986. « Barnea »: a new olive cultivar from first breeding generation. *Olea* 17: 95-99.

Lavee S., Harshemesh H., Haskal A., Meni Y., Wodner M., Ogrodovich A., Avidan B., Wiesman Z., Avidan N., Trapero-Casus A. 1999. « Maalot », un nouveau cultivar résistant à l'œil de paon (*Spilocaea oleagina*, cast). *Olivae* 78 : 51-59.

Lavee S., Avidan B., Meni Y. 2003. « Askal » : une nouvelle variété performante d'olivier à huile pour les oliveraies intensives et super-intensives. *Olivae* 97 : 53-59.

Lavee S., Avidan B., Meni Y., Haskal A., Wodner M. 2004. Trois nouvelles variétés d'olivier demi-naines pour la table. *Olivae* 102 : 33-41.

Ministère de l'Agriculture et de la Pêche Maritime. 2013. Veille économique du secteur oléicole. Note stratégique n° 95. Septembre 2013. 14 p.

Rallo L., Barranco D., De La Rosa L., Leon L. 2008. Chiquitita olive. *HortScience* 43: 529-531.

Trigui A. 1996. L'amélioration quantitative et qualitative de la production oléicole en Tunisie : l'incontournable nécessité et les perspectives de l'identification et de l'amélioration génétique de l'olivier. *Olivae* 61 : 34-40.

Trigui A., et Msallem M. 2002. Catalogue des variétés autochtones et types locaux, 159 p.

Tombesi A. 2013. Advances in harvesting and pruning of olive trees. *La Rivista di Scienza dell'Alimentazione*. 42 (1): 97-103.

Ying G., Shu-zhi H., Ziu-jun S., Hui-chan B, Hou-jun W., Shan-an H., 1984. Studies on variation and selection of olive seedlings for cold resistance. In: Shan-an H, Ying G. (eds): Olive acclimatation and breeding.

Zarrouk W., Baccouri B., Taamalli W., Trigui A., Daoud D., Zarrouk M. 2009. Oil fatty acid composition of eighteen Mediterranean olive varieties cultivated under the arid conditions of Boughrara (southern Tunisia). *Grasas y aceites*. 60 (5): 498-506.

www.olivettes.fr/fr/biodiversité/olives.pdf (site consulté le 03/02/2015).

Oleocoronale e oleomissionale: nuovi principali componenti fenolici dell'olio extra vergine di oliva

Panagiotis Diamantakos¹, Angeliki Velkou², K. Brian Killday³,
Thanasis Gimisis², Eleni Melliou^{1,4} e Prokopios Magiatis^{1,4,*}

¹ Dipartimento di farmacognosia e chimica dei prodotti naturali, Facoltà di farmacia, Università di Atene, Panepistimiopolis-Zografou, Atene, Grecia

² Laboratorio di chimica organica, Facoltà di chimica, Università di Atene, Panepistimiopolis-Zografou, Atene, Grecia

³ Bruker BioSpin, Billerica, MA, USA

⁴ Dipartimento di fisiologia e biofisica, Virginia Commonwealth University, Richmond, VA, USA

* Autore corrispondente. Tel.: +30 210 7274052. E-mail: magiatis@pharm.uoa.gr

Riassunto

L'olio extra vergine di oliva possiede importanti quantità di componenti fenolici polari, la maggior parte dei quali è sostituita da esteri del tirosolo o dell'idrossitirosolo con secoiridoidi derivati dell'oleuropeina o del ligstroside. Il presente studio illustra una serie di forme nuove o non completamente caratterizzate del ligstroside aglicone e dell'oleuropeina aglicone. Due di esse sono forme enoliche stabili e vengono descritte per la prima volta come effettivi componenti dell'olio di oliva, nonostante la loro presenza nell'olio di oliva fosse già stata ipotizzata. Per evitare di fare confusione con i nomi complicati degli isomeri degli agliconi, proponiamo di chiamare questi due componenti oleocoronale e oleomissionale. Dopo aver selezionato 2000 campioni di olio di oliva delle varietà più diffuse, siamo riusciti a individuare i campioni in cui l'oleocoronale e l'oleomissionale rappresentavano i principali componenti fenolici e che potevano essere utilizzati come materiale di partenza per isolare tali ingredienti. Curiosamente, durante la cromatografia a fase normale o a fase inversa, entrambi i composti si sono trasformati nelle forme note degli agliconi ad anello chiuso monoaldeidici, il che spiega perché tali composti non erano stati individuati finora. La loro presenza effettiva nell'olio di oliva è stata confermata mediante osservazione diretta NMR senza l'impiego di alcun solvente.

Parole Chiave

Fenolici, secoiridoidi, ligstroside aglicone, oleuropeina aglicone, olio di oliva, NMR.

Abstract

Extra virgin olive oil contains significant quantities of polar phenolic ingredients. The large majority is made up of esters of tyrosol or hydroxytyrosol with secoiridoid derivatives from oleuropein or ligstroside. In the current study we describe a number of new or incompletely characterized forms of ligstroside and oleuropein aglycons. Two of them which are stable enolic forms are described for the first time as real olive oil ingredients although their presence in olive oil had been postulated. To minimize the confusion with the complicated names of the aglycon isomers we propose the names oleokoronal and oleomissional for the two ingredients.

After screening 2000 samples of olive oil from most major varieties we were able to identify samples of olive oil in which oleokoronol and oleomissional were the major phenolic ingredients and could be used as starting material for their isolation. Interestingly, during normal or reversed phase chromatography both compounds were transformed to the known forms of monoaldehydic closed ring aglycons, which offers an explanation as to why those compounds had not been identified so far. Their real presence in olive oil was confirmed by direct NMR observation without the use of any solvent.

Key words

Phenolics, secoiridoids, ligstroside aglycon, oleuropein aglycon, olive oil, NMR.

Introduzione

La tradizionale dieta mediterranea, che continua ad attirare l'interesse della comunità scientifica in virtù delle sue proprietà salutistiche, si basa sul consumo giornaliero di olio di oliva come principale fonte di lipidi. I derivati fenolici dei secoiridoidi rappresentano una delle classi di componenti più importanti nell'olio di oliva che offrono un potenziale sempre maggiore per la tutela della salute. Recentemente, l'introduzione del regolamento UE 432/2012, sulla base dell'opinione scientifica dell'EFSA, ha consentito la diffusione di specifiche indicazioni sulla salute relativamente ai livelli di composti fenolici specifici contenuti nell'olio di oliva.

I composti principali che possono essere effettivamente dichiarati efficaci nella "protezione dei lipidi ematici dallo stress ossidativo" sono l'idrossitirosolo (1), il tirosolo (2) e i loro derivati. Per questo motivo, è estremamente importante conoscere l'identità chimica di tutti questi componenti ed eseguire le rispettive misurazioni quantitative nell'olio di oliva. Di fatto non esiste ancora un metodo ufficiale per la misurazione dei componenti correlati all'indicazione sulla salute, a causa di note difficoltà tecniche. L'idrossitirosolo (3,4-DHPEA) e il tirosolo (p-HPEA) si trovano nell'olio di oliva per lo più sotto forma di esteri dell'oleaceina (3,4-DHPEA-EDA) (3) e dell'oleocantale (p-HPEA-EDA) (4) nonché dell'oleuropeina aglicone (3,4-DHPEA-EA) (5a) e del ligstroside aglicone (p-HPEA-EA) (6a), che vantano importanti attività biologiche.

Tuttavia, i termini "oleuropeina aglicone" e "ligstroside aglicone" non hanno ricevuto una chiara definizione e spesso vengono utilizzati in modo errato. In effetti esistono diversi possibili isomeri degli agliconi e molti di essi non sono ben caratterizzati. Spesso vengono citati con complicati nomi descrittivi, quali forma idrossilata, forma monoaldeidica, forma dialdeidica, forma idrata, anello aperto, anello chiuso, carbossilato, decarbossilato, ecc. La mancanza di precise definizioni ufficiali, dei nomi e di solidi dati di NMR è causa di vari problemi nella letteratura correlata. Nel presente documento vengono illustrati l'isolamento e la struttura di una serie di forme precedentemente non descritte di oleuropeina aglicone e di ligstroside aglicone, chiarendo i termini e la caratterizzazione NMR dei membri precedentemente descritti di questa famiglia di composti.

Materiali e Metodi

Informazioni generali

La β -glucosidasi della mandorla è stata acquistata da Sigma-Aldrich. L'oleuropeina è stata isolata dalle foglie di olivi selvatici con elevato contenuto di oleuropeina (15% a peso secco) come precedentemente descritto (Andreadou *et al* 2006). Gli spettri NMR sono stati effettuati usando uno spettrometro Avance 700, gli spostamenti chimici sono stati espressi in ppm e gli assi sono stati calibrati in base al segnale residuo di CDCl_3 . La cromatografia su colonna è stata effettuata su colonne contenenti gel di silice 60 RP-18 (40–63 μm) (Merck, Darmstadt, Germania). La cromatografia su strato sottile (TLC) è stata effettuata su lastre rivestite con gel di silice 60 RP-18 F254 Merck, 0,25 mm.

Olio di oliva

L'isolamento dei composti studiati è stato effettuato in due tipi di olio. Il primo è stato fornito dalla Cooperativa di Paleopanagia, nella regione della Laconia, in Grecia, ed è stato prodotto a novembre 2013 dalla varietà Koroneiki in un frantoio con sistema a 3 fasi a 25 °C con 30 minuti di gramolatura. Il secondo è stato fornito dall'oliveto Berkeley di Oroville, in California, ed è stato prodotto dalla varietà Mission a novembre 2013.

Altri oli di oliva utilizzati per la selezione provenivano dal database di campioni come descritto precedentemente (Karkoula *et al* 2014).

Estrazione e isolamento

L'olio di oliva (100 g) è stato mescolato con il cicloesano (400 ml) e l'acetonitrile (500 ml), la miscela ottenuta

è stata quindi omogeneizzata e centrifugata a 4.000 giri/min per 5 minuti. La fase di acetonitrile è stata raccolta in un imbuto separatore ed evaporata sotto vuoto con un evaporatore rotante. La parte residua è stata sottoposta a una cromatografia su colonna a fase inversa con gel di silice e l'acetonitrile è stato utilizzato per rimuovere al 100% i lipidi residui. Tutte le frazioni raccolte

senza lipidi sono state unite, evaporate e nuovamente sottoposte a TLC preparativa a fase inversa ($H_2O/Acetonitrile$ 60:40), isolando così due zone: A (2,3 mg/ rf = 0,5) e B (3,3 mg/ rf = 0,7). La struttura dei composti isolati (**Figura 1**) è stata studiata attraverso una combinazione di spettri NMR 1D e 2D: i picchi assegnati sono presentati nelle **Tabelle 1-4**.

Tabella 1. Dati 1H -NMR dell'oleocoronale (14) e dei ligstrodiali (12a,b) a una concentrazione di 3 mg/0,6 ml. Calibrazione degli assi basata su $CDCl_3$ = 7.26 ppm

	12a (5S,4R)	12b (5S,4S)	14
1	9.212, d, 2.0	9.218, d, 2.0	9.225, d, 1.7
3	9.68, d, 2.7	9.46, d, 2.7	7.386, dd, 12.6, 0.8
4	4.06, dd, 10.5, 2.7	4.11, dd, 10.5, 2.7	-
5	3.83, m, (overlap)	3.83, m (overlap)	4.16, ddd (overlap)
6a	2.81, (overlap)	2.82, (overlap)	2.97, dd, 16.1, 9.6
6b	2.62, (overlap)	2.58, (overlap)	2.78, dd, 16.1, 6.3
8	6.70, q, 7.1	6.72, q, 7.1	6.56, q, 7.1
10	2.055, d, 7.0	2.062, d, 7.1	2.062, d, 7.0
3-OH	-	-	11.75, d, 12.6
OCH ₃	3.65, s	3.77, s	3.75, s
1'	4.20, m	4.18, m	4.18, m
2'	2.81, m	2.81, m	2.81, m
4',8'	7.05, d (overlap)	7.05, d (overlap)	7.05, d (overlap)
5',7'	6.76, d (overlap)	6.76, d (overlap)	6.76, d (overlap)

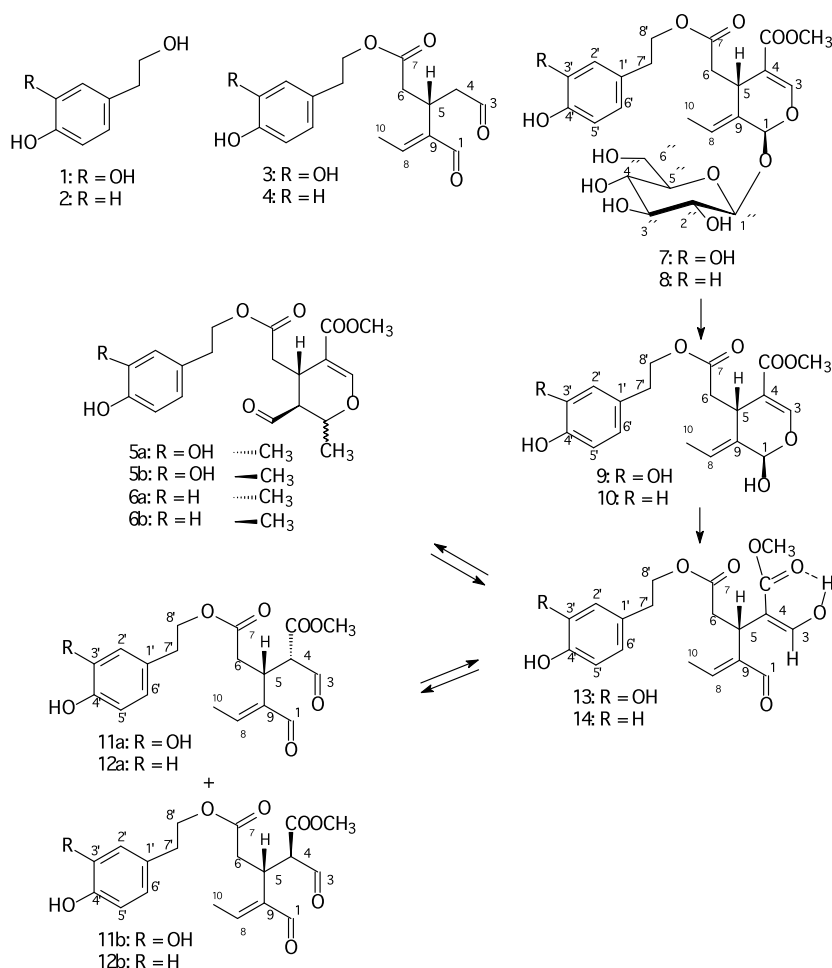


Figura 1: Strutture dei composti studiati

Analisi NMR dell'olio di oliva con estrazione

L'estrazione e l'analisi dell'olio di oliva sono state effettuate come precedentemente descritto (Karkoula *et al.* 2014). In breve, l'olio di oliva (5,0 g) è stato mescolato con il cicloesano (20 ml) e l'acetonitrile (25 ml) e la miscela così ottenuta è stata omogeneizzata con un mixer a vortice per 30 secondi e centrifugata a 4.000 giri/min per 5 minuti. A parte è stata raccolta la fase acetonitrilica (25 ml), che è stata miscelata con 1,0 ml di soluzione di siringaldeide (0,5 mg/ml) in acetonitrile ed evaporata sotto vuoto con un evaporatore rotante. Il residuo è stato disciolto in CDCl_3 (750 μL) e una frazione accuratamente misurata della soluzione (550 μL) è stata trasferita in un tubicino per NMR da 5 mm. Sono state raccolte 50 scansioni con un numero di punti di 32K all'interno di un intervallo spettrale di 0-16 ppm con un tempo di rilassamento di 1 s e un tempo di acquisizione di 1,7 s. Prima della trasformata di Fourier, è stato applicato un fattore esponenziale di ponderazione (line broadening) di 0,3 Hz. Gli spettri sono stati fasati, corretti e integrati automaticamente tramite il software TopSping (Bruker). L'integrazione è stata effettuata manualmente, così da ottenere un'integrazione accurata dei picchi d'interesse.

Analisi NMR a impulso di eccitazione selettivo dell'olio di oliva senza estrazione

600 μL di olio di oliva sono stati trasferiti in un tubicino per NMR da 5 mm senza solventi deuterati. Gli spettri NMR dei campioni puri sono stati ottenuti senza "deuterium lock", generando un offset del campo dello stesso valore ottenuto per il campione estratto con lock in CDCl_3 . La sequenza DPFGE è stata eseguita utilizzando un "reburp selective refocusing pulse" a 180° di 1,26 ms, con una finestra di eccitazione di 4900 Hz da 14 a 7 ppm. Sono stati raccolti i dati di 16 scansioni. Gli spettri sono stati fasati e corretti automaticamente tramite il software TopSping (Bruker).

Sintesi dell'oleuropeina aglicone

L'oleuropeina (100 mg) è stata disciolta in un matraccio dal fondo arrotondato da 25 ml contenente soluzione tampone all'acetato (pH = 5, 5 ml). È stato aggiunto il cloroformio (5 ml) e il sistema bifasico prodotto è stato mescolato delicatamente. A questo sistema è stata aggiunta la β -glucosidasi (3,4 unità/mg, 70 mg) e la miscela di reazione risultante è stata mescolata delicatamente a 30°C per 20 h o fino a quando la TLC (12% di MeOH in diclorometano) ha mostrato il consumo totale dell'oleuropeina. La fase organica è stata separata e la fase acquosa è stata estratta con il cloroformio (3x5 ml). Gli estratti organici combinati sono stati lavati con soluzione salina (20 ml), asciugati

su solfato di sodio, quindi filtrati ed evaporati sotto vuoto. Il prodotto grezzo (66 mg, 94%) è stato analizzato con ^1H NMR.

Risultati e discussione

I termini "oleuropeina aglicone" e "ligstroside aglicone" non hanno ricevuto una chiara definizione e spesso vengono utilizzati in modo errato. Entrambi i termini corrispondono a una grande quantità di isomeri che in diversi casi non sono ben descritti. Di fatto la maggior parte dei derivati fenolici dei secoiridoidi nell'olio di oliva deriva dall'oleuropeina (7) e dal ligstroside (8), che rappresentano i principali secoiridoidi nell'oliva. Durante la spremitura e la gramolatura per la produzione dell'olio di oliva, questi due componenti entrano in contatto con la β -glucosidasi (Koudounas *et al.* 2015) e vengono inizialmente trasformati nei corrispondenti agliconi effettivi 9 e 10. Si tratta di due forme non stabili, che sono state osservate solo in condizioni molto specifiche (Christophoridou e Dais 2009). All'interno della matrice dell'olio di oliva o in generale in un mezzo non acquoso, gli agliconi effettivi 9 e 10 non esistono e vengono solitamente trasformati per riassetto nelle forme monoaldeidiche ad anello chiuso 5a e 6a, più stabili (Limiroli *et al.* 1995), o nelle forme dialdeidiche ad anello aperto. Le forme ad anello chiuso sono state anche descritte in varie forme di stereoisomeri, quali 5b e 6b, ma ne esistono anche altre (Perez-Trujillo *et al.* 2010). Come abbiamo appena dimostrato, le forme ad anello chiuso dell'oleuropeina aglicone e del ligstroside aglicone preponderanti nell'olio di oliva si trovano nelle forme 5a e 6a, mentre gli altri stereoisomeri aumentano in modo artificiale durante la purificazione o l'analisi cromatografica (Karkoula *et al.* 2014) e normalmente si trovano in quantità molto basse o sono del tutto assenti.

Recentemente abbiamo pubblicato una metodologia per l'osservazione e la quantificazione delle forme monoaldeidiche ad anello chiuso 5a e 6a tramite qNMR, insieme all'oleaceina (3) e all'oleocantale (4) (Karkoula *et al.* 2012; Karkoula *et al.* 2014). Applicando questa metodologia a 2000 campioni di olio di oliva ottenuto da diverse varietà con differenti condizioni di produzione abbiamo potuto osservare in diversi casi un numero di picchi corrispondenti ai protoni aldeidici che non corrispondevano a nessuna delle strutture descritte ma che abbiamo tentato di correlare agli isomeri dell'oleuropeina aglicone e del ligstroside aglicone. Curiosamente, in alcuni campioni di olio di oliva, tali picchi

corrispondevano ai principali ingredienti fenolici. Per questo motivo, abbiamo deciso di isolare gli componenti sconosciuti e di caratterizzarne la struttura, utilizzando come materiale di base due oli di oliva appositamente selezionati delle varietà Koroneiki e Mission.

Sorprendentemente, tutti i tentativi iniziali di isolamento tramite cromatografia su colonna o su strato sottile, sia a fase normale sia a fase inversa, hanno portato solo alle strutture già note **5a,b** e **6a,b**, nonostante l'analisi NMR mostrasse solo ridotte concentrazioni di tali strutture nell'olio originale. In base a questa osservazione, è stato dedotto che gli ingredienti sconosciuti

erano strutture trasformate in **5a,b** e **6a,b** durante la purificazione. Attraverso un'attenta analisi successiva delle due zone TLC A e B, è stata rilevata la presenza di un piccolo residuo della forma iniziale, identica a quella osservata nell'estratto di olio di oliva prima della purificazione. L'analisi NMR delle zone summenzionate ha mostrato che si trattava, in entrambi i casi, di una miscela inseparabile di tre composti. Data la natura inseparabile della miscela, che veniva trasformata durante qualsiasi tentativo di purificazione, essa è stata studiata come miscela con approfonditi esperimenti NMR 2D per chiarire la struttura di ciascun composto e attribuire i picchi osservati (Tabelle 1-4).

Tabella 2. Dati ^{13}C -NMR dell'oleocoronale (14**) e dei ligstrodioli (**12a,b**) a una concentrazione di 3 mg/0,6 ml. Calibrazione degli assi basata su $\text{CDCl}_3 = 177.16 \text{ ppm}$**

	12a (5S,4R)	12b (5S,4S)	14
1	194.75	194.56	194.88
3	195.72	195.08	164.23
4	60.27	59.30	103.33
5	31.42	31.42	29.95
6	34.52	34.98	35.61
7	172.07	171.33	171.98
8	156.11	155.74	153.53
9	142.40	141.87	142.68
10	15.20	15.20	15.20
11	168.18	168.55	172.18
OCH3	52.38	52.61	51.59
1'	65.24	65.24	65.24
2'	34.02	34.02	34.02
3'	129.88	129.88	129.95
4',8'	130.03	130.03	130.05
5',7'	115.29	115.29	115.29
6'	154.13	154.13	154.13

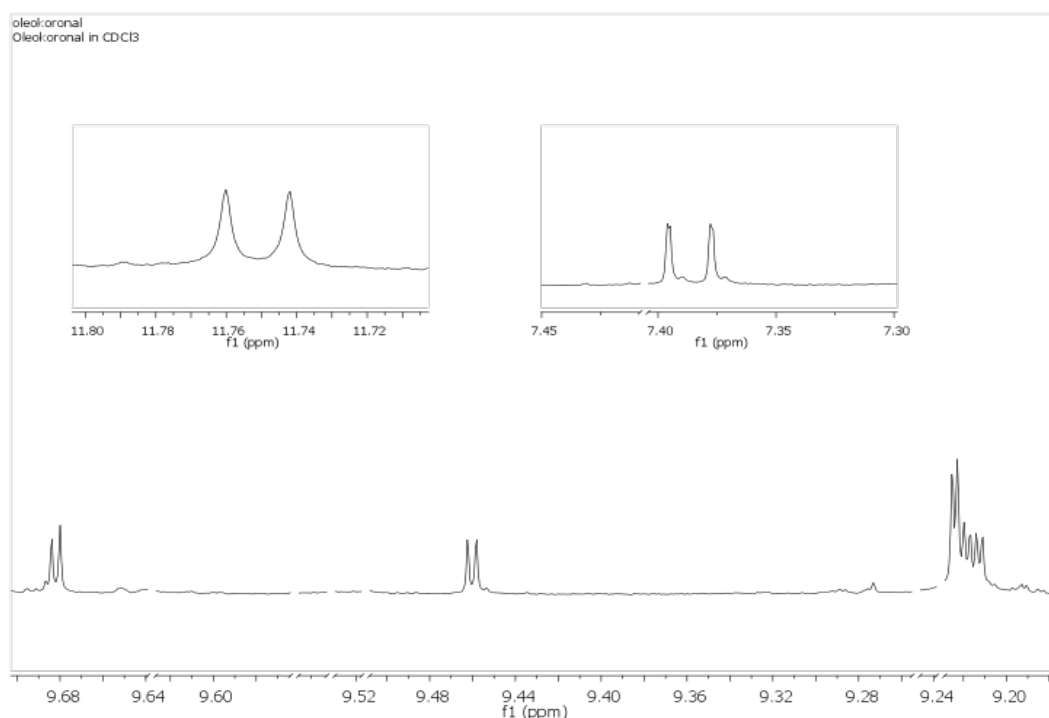


Figura 2: 1Spettro ^1H NMR della regione aldeidica e olefinica della miscela di oleocoronale e 4S/4R-ligstrodiol

La spiegazione della struttura ha rivelato che in ogni miscela il principale ingrediente era una forma monoaldeidica ad anello aperto, mentre le altre due corrispondevano a forme dialdeidiche ad anello aperto. Il rapporto tra i tre composti determinato dall'integrazione dei tre protoni aldeidici, ad esempio a 9.21-9.22 ppm per la zona A, era di 2:1:1 (**Figura 2**). La prima miscela dei tre composti della zona A ha mostrato i segnali caratteristici della porzione di tirosolo mentre la prima della zona B ha mostrato i segnali caratteristici della porzione di idrossitirosolo. Attraverso gli esperimenti HSQC, HMBC, COSY e TOCSY, abbiamo potuto assegnare tutti i picchi dei tre composti in ogni miscela. Tutti i composti hanno presentato i picchi caratteristici di un metile attaccato al doppio legame vicino a un protone olefinico nonché tutti gli altri picchi previsti per la forma ad anello aperto dell'acido elenolico esterificato con il tirosolo o l'idrossitirosolo. I due composti minori di ciascuna miscela sono state le coppie 4*R*,5*S* e 4*S*,5*S* delle forme dialdeidiche ad anello aperto dell'oleuropeina aglicone e del ligstroside aglicone **11a,b** e **12a,b**. Il terzo ingrediente prevalente in ciascuna miscela è risultato avere una struttura molto simile con una differenza sostanziale: l'assenza di un secondo aldeide. Curiosamente, al posto di un secondo aldeide, ogni molecola presentava un doppietto notevolmente deschermato a circa 11.8 ppm che nel HSQC non risultava correlato ad alcun carbonio. Inoltre è stato osservato un ulteriore protone olefinico a circa 7.3 ppm come doppietto (*J* = 16 Hz) correlato al doppietto a 11.8 ppm. Il protone olefinico nell'esperimento HMBC è stato correlato a un carbonile contenente un gruppo metossilico. Sulla base di questi dati è risultato chiaro che il principale ingrediente di ciascuna zona era la forma monoenolica dei dialdeidi **11a,b** e **12a,b**. Contrariamente alle aspettative, le forme enoliche **13** e **14** sono risultate stabili a causa del legame idrogeno tra l'idrossile enolico e il carbonile adiacente del gruppo carbometossilico.

In passato, la presenza della forma enolica del ligstroside aglicone **14** era già stata ipotizzata (e.g. Angerosa *et al* 1996); tuttavia, è sicuramente nel presente documento che tale forma viene indicata per la prima volta come prodotto naturale e come ingrediente dell'olio di oliva che proponiamo di chiamare oleocoronale. Le forme dialdeidiche del ligstroside aglicone **12a,b** sono state citate varie volte come ingredienti dell'olio di oliva tramite

identificazione MS (e.g. De Nino *et al* 2000) ma non è mai stata riportata la spiegazione della loro struttura con NMR. Allo stesso modo, tali forme sono state individuate tramite identificazione MS nell'acqua di vegetazione del frantoio da Sanchez de Medina *et al* (2011) e denominate con la sigla p-HPEA-FA. In alcuni casi sono state indicate come dialdeidi del ligstroside aglicone ma in realtà si riferiscono al p-HPEA-EDA o all'oleocantale, confuso con la forma dialdeidica del decarbossimetil-ligstroside aglicone (e.g. Gomez del Campo e Garcia 2012). Per ridurre l'uso di lunghi nomi descrittivi che possono risultare ambigui, proponiamo di utilizzare per **12a,b** il nome più appropriato di 4*R*/4*S*-ligstrodiale, in riferimento al ligstrale che indica la forma monoaldeidica ad anello chiuso del ligstroside aglicone **6a,b** (Calis *et al* 1993).

La forma enolica dell'oleuropeina aglicone **13** non è mai stata indicata come componente dell'olio di oliva ma solo come componente delle olive non elaborate (Bianco & Uccella 2000) o come prodotto dell'idrolisi enzimatica dell'oleuropeina (Bianco *et al* 1999a). Tuttavia, vi sono varie incongruenze nella descrizione NMR di questo composto (Bianco & Uccella 2000; Bianco *et al* 1999a) che devono essere riviste. Innanzitutto, gli autori non hanno citato il picco critico dell'idrossile enolico a 11.78 ppm. Inoltre hanno riportato lo spostamento chimico del carbonio olefinico contenente il gruppo carbometossilico a 130.37 ppm, mentre noi lo abbiamo osservato a 103.69 ppm. Il protone olefinico enolico a 7.36 ppm è stato considerato come doppietto con accoppiamento di 6 Hz, mentre l'accoppiamento effettivo è di 16 Hz e naturalmente non esiste segnale OH a 7.40 ppm come precedentemente riportato. Vi sono molte altre differenze nell'NMR ¹H e ¹³C NMR e diverse costanti di accoppiamento mancanti, che necessitano di una descrizione più completa e precisa. Va sottolineato il fatto che questo composto e **11a,b** presentano un'importante deriva di spostamento chimico specifici ¹H-NMR a seconda della concentrazione del campione (**Tabella 4** e **Figura 3**). Questo spiega alcune differenze rispetto ai dati della letteratura precedente ma non le principali. Curiosamente, gli stessi autori in un documento parallelo (Bianco *et al* 1999b) assegnano i picchi osservati a 11.79-11.83 ppm ai derivati dell'ossidazione (da aldeide a carbossile) che emergono lentamente in CDCl₃. In base ai nostri risultati, questi picchi non sono causati dall'ossidazione ma dall'equilibrio tra l'aldeide e l'enolo.

Tabella 3. Dati ¹H-NMR dell'oleomissionale (13) e degli oleuropeindiali 11a,b a una concentrazione di 20 mg/0,6 ml. a Calibrazione degli assi basata su CDCl₃ = 7.26 ppm

	11a (5S,4R)	11b (5S,4S)	13
1	9.17, d, 2.0	9.17, d, 2.0	9.17, d, 2.0
3	9.67, d, 2.7	9.44, d, 2.7	7.36, dd, 12.6, 0.8
4	4.04, dd, 10.5, 2.7	4.10, dd, 10.5, 2.7	-
5	3.84, tdd, 10.5, 4.7, 2.0	3.80, tdd, 10.5, 4.3, 2.0	4.17, ddd (overlap)
6a	2.82, dd, 16.0, 10.5	2.83, dd, 15.8, 10.5	2.98, dd, 15.8, 9.6
6b	2.63, dd, 16.0, 4.7	2.58, dd, 15.8, 4.3	2.77, dd, (overlap)
8	6.70, q, 7.1	6.73, q, 7.1	6.59, q, 7.1
10	2.02, d, 7.1	1.99, d, 7.1	2.05, d, 7.1
3-OH	-	-	11.78, d, 12.6
OCH ₃	3.65, s	3.78, s	3.74, s
1'	4.21, m	4.12, m	4.16, m
2'	2.75, m	2.75, m	2.75, m
4'	6.68, d, 1.8 ^b	6.67, d, 1.8 ^b	6.71, d, 1.8 ^b
7'	6.78, d (overlap)	6.78, d (overlap)	6.78, d (overlap)
8'	6.58	6.58	6.60 dd

^a Per 11a, 11b e 13 sono state osservate delle minime differenze quando gli spettri sono stati registrati a una concentrazione di 1 mg/0,6 ml (ad es. H-3: 9.70/9.46/7.39, H-10: 2.04/1.98/2.07, COOCH₃: 3.66/3.80/3.76 rispettivamente)

^b possono scambiarsi

Tabella 4. Dati ¹³C-NMR dell'oleomissionale (13) e degli oleuropeindiali (11a,b) a una concentrazione di 20 mg/0,6 ml. Calibrazione degli assi basata su CDCl₃ = 177.16 ppm

	11a (5S,4R)	11b (5S,4S)	13
1	195.53	195.65	196.04
3	196.24	195.41	164.07
4	60.45	59.50	103.69
5	31.58	31.97	30.14
6	34.80	35.44	35.92
7	171.71	171.46	172.18
8	156.78	157.29	155.05
9	141.14	140.52	142.40
10	15.40	15.49	15.41
11	168.23	169.02	172.12
OCH ₃	52.69	53.02	51.86
1'	65.52	65.52	65.52
2'	34.28	34.28	34.28
3'	130.46	130.46	130.53
4'	116.29	116.24	116.38
5'	143.60	143.65	143.68
6'	143.05	143.00	142.92
7'	115.39	115.39	115.39
8'	121.27	121.33	121.27

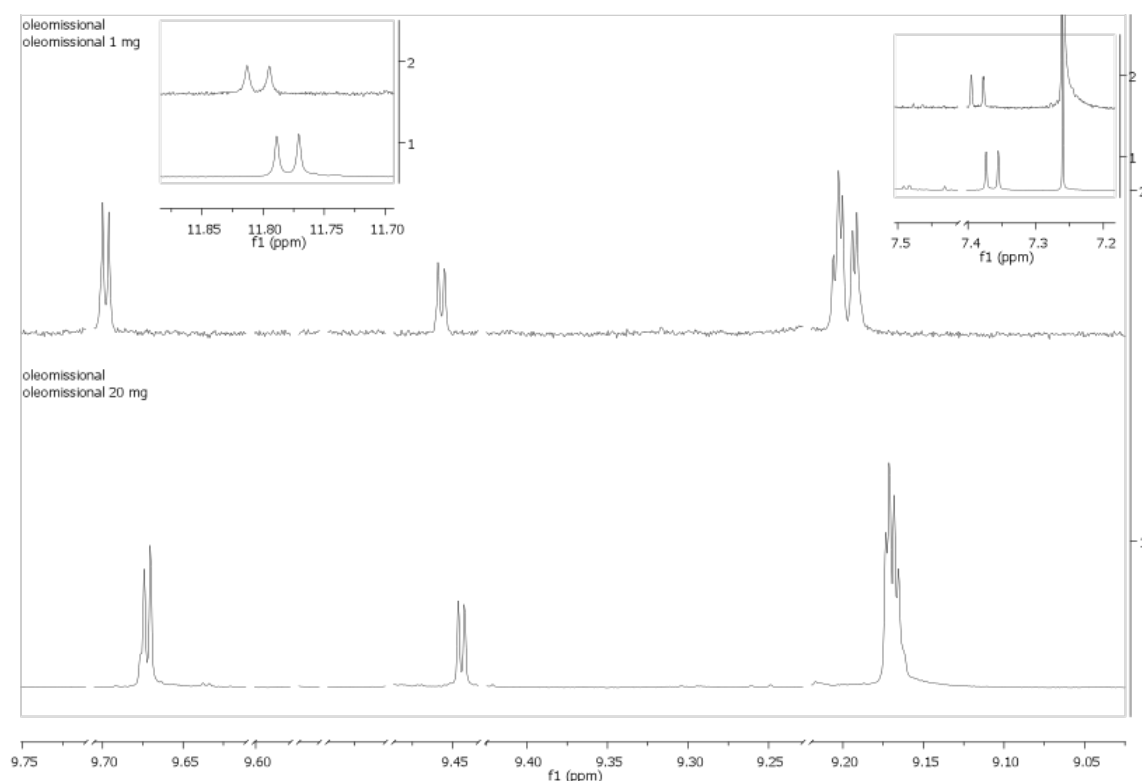


Figura 3: Spettro ¹H NMR della regione aldeidica e olefinica della miscela di oleomissional e 4S/4R-oleuropeindiale (in alto: 1 mg/0,6 ml, in basso: 20 mg/0,6 ml)

Lo stesso tipo di confusione viene fatta nel documento di Paiva-Martins & Gordon (2001), in cui vengono assegnati due picchi a 11.76 e 11.82 ppm ai gruppi carbossilici di due isomeri geometrici che originano dall'idrolisi dei gruppi carbometossilici di **13**. Anche in questo caso, la causa non è l'idrolisi o l'ossidazione bensì l'equilibrio tra l'aldeide e la forma enolica. La struttura proposta deve essere pertanto considerata discutibile. Gli stessi autori, nello stesso lavoro, descrivono anche le forme dialdeidiche ad anello aperto **11a,b** isolate dalle foglie di olivo ma mancano i dati NMR completi per diverse costanti di accoppiamento. Inoltre, in diversi casi, viene fatta confusione nei dati ¹³C tra i picchi assegnati a ciascuno dei due diastereoisomeri.

De Nino *et al* (2000) hanno suggerito la presenza dei composti **11a,b** nell'olio di oliva, fornendo tuttavia una descrizione NMR fuorviante con diverse incoerenze di assegnazione che vanno riviste. La descrizione di Bianco *et al* (1999a) nell'idrolisi dell'oleuropeina è più precisa ma anche in essa diversi picchi risultano assenti (ad esempio, a 56 ppm) o sono stati osservati con un "chemical shift" abbastanza diverso (>5 ppm di differenza per il carbonio contenente il gruppo carbometossilico) o presentano una descrizione incompleta del pattern di divisione e delle relative costanti di accoppiamento. La descrizione più precisa è stata fornita da Christophoridou & Dais (2009) nella sezione di un documento relativo allo studio dell'idrolisi enzimatica dell'oleuropeina,

ma anche in questo caso sono presenti incongruenze e non sono stati forniti dati NMR sul carbonio.

Per evitare qualsiasi confusione e semplificare la nomenclatura della forma enolica **13**, proponiamo di utilizzare il nome "oleomissional" anziché l'enololeuropeindiale erroneamente descritto (Bianco *et al* 1999a). Per le forme dialdeidiche ad anello aperto dell'oleuropeina aglicone, il nome più appropriato sarebbe 4S/4R-oleuropeindiale come precedentemente riportato (Bianco *et al* 1999).

Per confermare che l'oleocoronale è un componente effettivo dell'olio di oliva e non un artefatto prodotto durante l'estrazione o la diluizione dell'olio di oliva con il solvente per NMR (CDCl₃), abbiamo sottoposto un campione di olio di oliva senza alcun solvente a un esperimento a impulso di eccitazione selettiva come descritto nella parte sperimentale e lo abbiamo confrontato con l'estratto dello stesso olio di oliva diluito in CDCl₃. L'impulso di eccitazione selettiva consente l'osservazione dei picchi di bassa concentrazione in presenza di altri componenti a una concentrazione molto alta (ad esempio i lipidi). La metodologia applicata è stata descritta dettagliatamente in precedenza (Melliou *et al* 2015). Attraverso questo esperimento abbiamo potuto osservare l'idrossile deschermato a 11.78 ppm della forma enolica **14** del ligstroside aglicone nell'olio di oliva puro e nella sua forma estratta

(Figura 4), dimostrando che si tratta di un componente effettivo dell'olio di oliva. La deriva osservata

degli spostamenti chimici nello spettro dell'olio puro è causata dall'elevata presenza di lipidi.

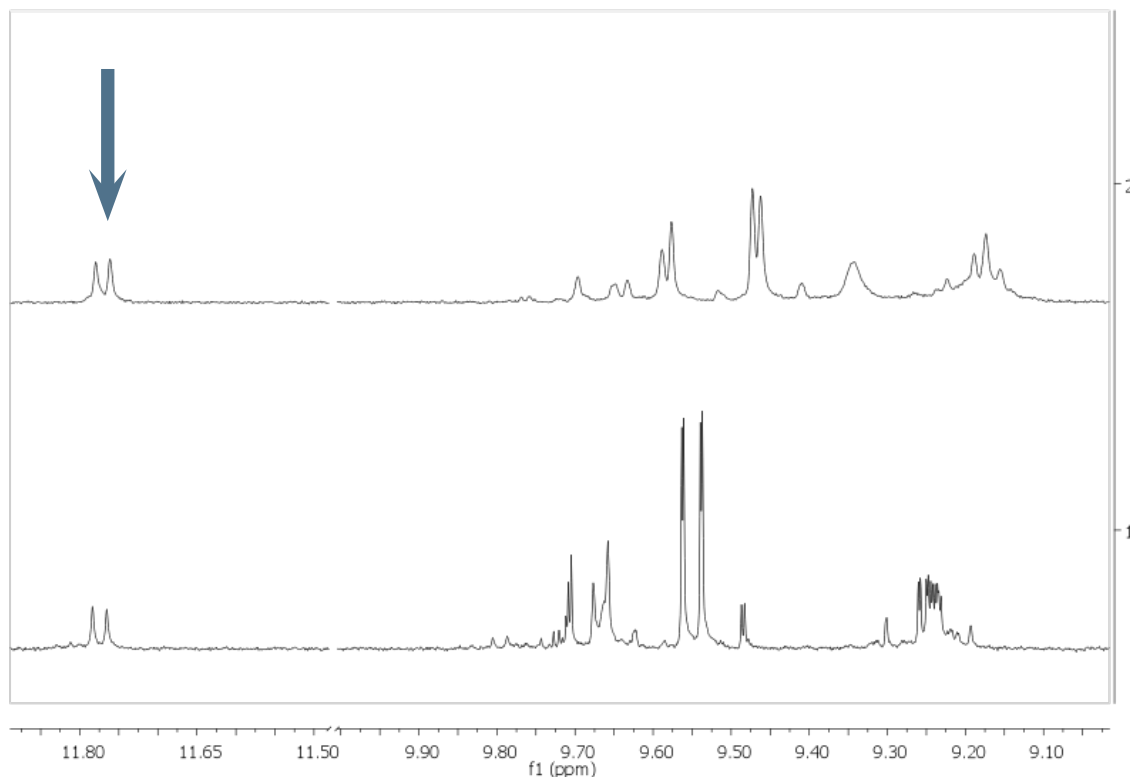


Figura 4: Spettro ^1H NMR a impulso di eccitazione selettivo dell'olio di oliva puro (in alto) o dell'estratto di olio di oliva diluito in CDCl_3 (in basso). Il picco dell'oleocoronale a 11.78 ppm può essere osservato in entrambi i casi, a dimostrazione del fatto che l'oleocoronale è un componente effettivo dell'olio di oliva

Per confermare ulteriormente le strutture proposte, abbiamo eseguito la trasformazione enzimatica dell'oleuropeina nelle forme ad anello aperto. Riproducendo le adeguate condizioni di pH, è stato possibile minimizzare la trasformazione dell'oleuropeina nella forma ad anello chiuso **5a** e indirizzarla solamente verso le forme ad anello aperto. La miscela risultante dei composti ha mostrato esattamente gli stessi picchi della miscela isolata dall'olio di oliva e anche in questo caso il derivato principale è risultato essere la forma enolica **13** seguita dai due stereoisomeri **11a** e **11b**.

Per quanto riguarda la misurazione quantitativa dell'oleuropeina aglicone e del ligstroside aglicone, in uno studio precedente abbiamo presentato un metodo convalidato per misurare le forme monoaldeidiche ad anello chiuso **5** e **6** (Karkoula *et al.* 2014). Utilizzando la stessa metodologia e le rispettive curve di calibrazione siamo stati in grado di ottenere i dati quantitativi di ciascuna forma dialdeidica ed enolica. Per ottenere la completa distinzione dei vari picchi, è

assolutamente necessario utilizzare sistemi NMR ad alto campo magnetico (>600 MHz); tuttavia, già a 400 MHz, l'integrazione NMR dell'intera regione dei protoni aldeidici è in grado di fornire i dati quantitativi di tutte le forme di agliconi ad anello aperto sotto forma di numero totale.

Relativamente all'oleocoronale e all'oleomissionale, va detto che la loro presenza è stata rilevata per la prima volta nell'olio di oliva delle varietà Koroneiki (**Figura 5**) e Mission (**Figura 6a**). Va sottolineato il fatto che la concentrazione di oleocoronale e oleomissionale e delle relative forme dialdeidiche è risultata inferiore rispetto a quella dell'oleocantale e dell'oleaceina e che in diversi casi essi erano completamente assenti (**Figura 6b**). Tuttavia, sembra che in determinate varietà, anche secondo i parametri di produzione dell'olio, l'oleocoronale e l'oleomissionale possano essere i principali fenoli nell'olio di oliva. Un approfondimento su questo argomento, corredato di maggiori dati quantitativi, è oggetto di un documento separato.

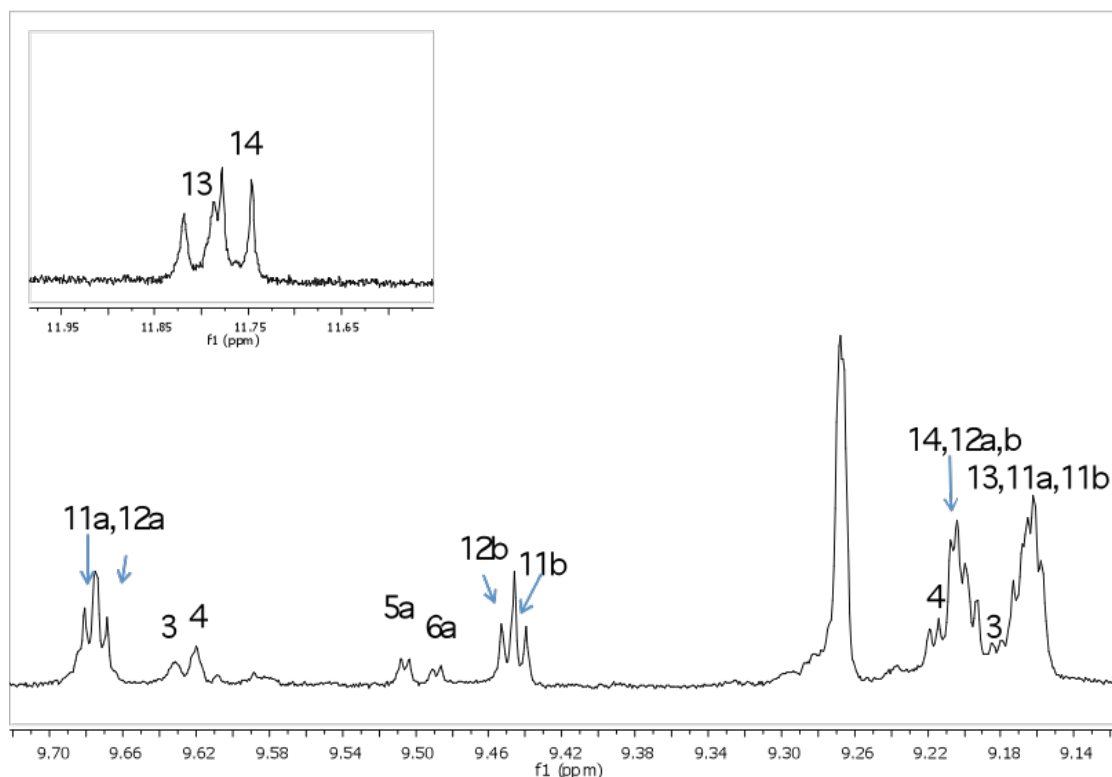


Figura 5: Spettro ^1H NMR della regione aldeidica dell'olio di oliva varietà Koroneiki prodotto a bassa temperatura e con un tempo di gramolatura ridotto (registrato a 400 MHz)

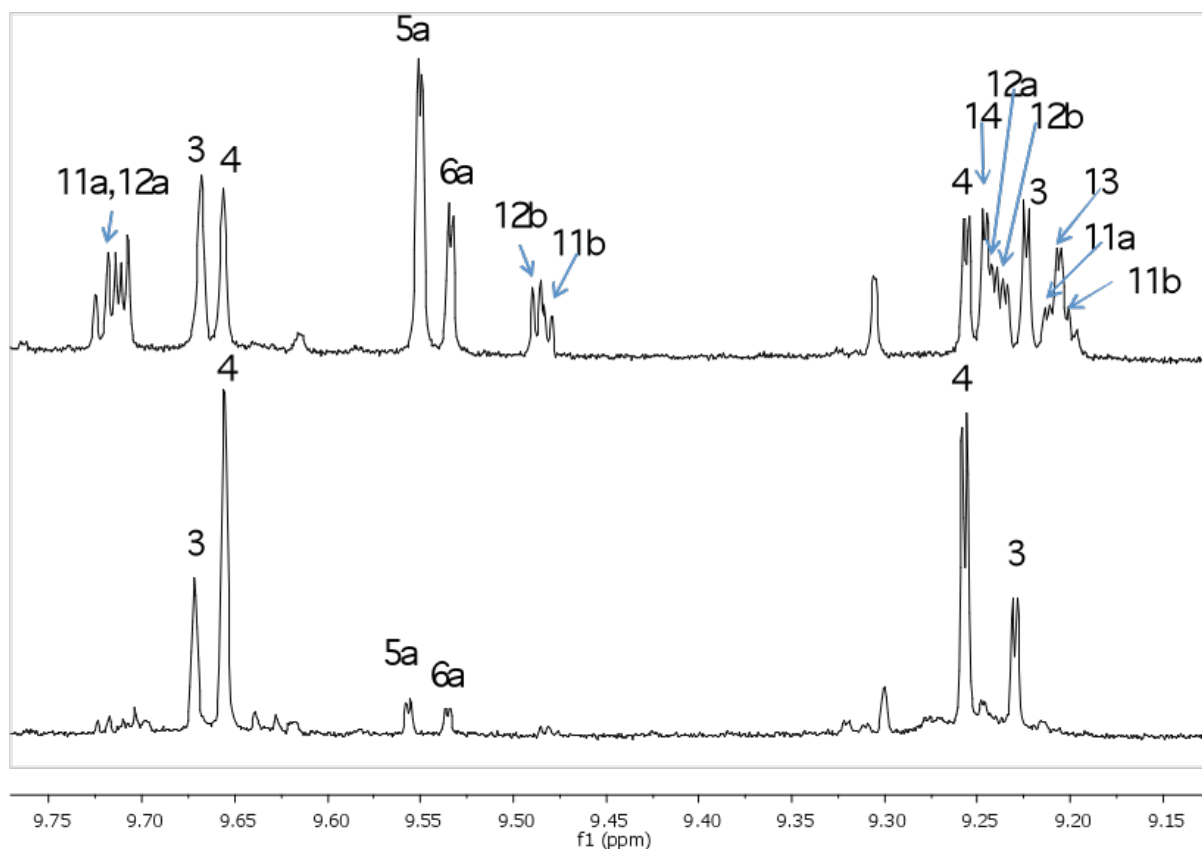


Figura 6: Spettro ^1H NMR della regione aldeidica del campione di estratto di olio di oliva varietà Mission (a: in alto) e della varietà Koroneiki (b: in basso) che mostra i picchi corrispondenti ai composti 3, 4, 5a, 6a, 11a,b, 12a,b, 13, 14. Lo spostamento chimico dei picchi osservati nell'estratto di olio di oliva è leggermente diverso da quello dei composti puri a causa della presenza di lipidi nell'estratto (non rappresentati).

Conclusione

Nel presente lavoro abbiamo isolato e descritto con sistema NMR una serie di composti appartenenti alla famiglia dell'oleuropeina aglicone e del ligstroside aglicone, alcuni dei quali sono stati identificati per la prima volta come componente dell'olio di oliva. Sono stati proposti nomi nuovi, quali oleocoronale, oleomissionale e ligstrodiiale, per evitare la confusione che si crea utilizzando nomi complicati o abbreviati. Uno studio diretto tramite NMR dell'olio di oliva puro ha dimostrato che le forme enoliche degli agliconi sono i principali ingredienti fenolici, almeno in determinati oli di oliva. La caratterizzazione completa dei nuovi composti e la semplicità dell'analisi NMR quantitativa offrono una nuova prospettiva per il controllo qualitativo delle proprietà salutistiche dell'olio di oliva.

Ringraziamenti

Desideriamo ringraziare la Cooperativa di Paleopagnia in Laconia e l'oliveto Berkeley in California per i campioni di olio di oliva, la Sig.ra Marcomichelaki di Volvi Estate per le foglie di ulivo, Venia Smyrli e Stella Konstantopoulou per l'isolamento dell'oleuropeina e il Prof. Diomedes Logothetis per aver offerto le strutture di NMR presso la VCU. A.V. e T.G. ringraziano per i fondi stanziati dal PROGRAMMA SYNERGASIA 2011, un programma cofondato con le risorse nazionali e del Fondo Europeo Sviluppo Regionale (cod. progetto: 11SYN_2_1613). P.D., E.M. e P.M. ringraziano la fondazione Latsis per il sostegno economico.

Bibliografia

Andreadou, I., Iliodromitis, E., Mikros, E., Constantinou, M., Agalias, A., Magiatis, P., Skaltsounis, A.L., Kamber, E., Tsantili-Kakoulidou, A., and Kremastinos, D. 2006. *The olive constituent oleuropein exhibits anti-ischemic, antioxidative, and hypolipidemic effects in anesthetized rabbits*. J. Nutrition 136: 2213-2219.

Angerosa, F., d'Alessandro N., Corana, F., and Mellerio, G. 1996. *Characterization of phenolic and secoiridoid aglycons present in virgin olive oil by gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry*. J. Chromatogr. A, 736: 195-203.

Bianco, A. D. and Uccella, N. 2000. *Biophenolic components of olives*. Food Res. Intl. 33: 475-485

Bianco, A. D., Muzzalupo, I., Piperno, A., Romeo, G. and Uccella, N. 1999. *Bioactive Derivatives of Oleuropein from Olive Fruits*. J. Agric. Food Chem. 47: 3531-3534.

Bianco, A. D., Piperno, A., Romeo, G. and Uccella, N. 1999. *NMR Experiments of Oleuropein Biomimetic Hydrolysis*. J. Agric. Food Chem. 47: 3665-3668.

Caliş, I., Hosny, M., Khalifa, T., and Nishibe, S. 1993. *Secoiridoids from Fraxinus angustifolia*. Phytochem. 33: 1453-1456.

Christophoridou S. and Dais, P. 2009. *Detection and quantification of phenolic compounds in olive oil by high resolution 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy*. Anal. Chim. Acta 633: 283-292.

De Nino, A., Mazzotti, F., Perri, E., Procopio, A., Raffaelli, A., and Sindona, G. 2000. *Virtual freezing of the hemiacetal-aldehyde equilibrium of the aglycones of oleuropein and ligstroside present in olive oils from Carolea and Coratina cultivars by ionspray ionization tandem mass spectrometry*. J. Mass Spec. 35: 461-467

Gomez-del-Campo, M. and Garcia, J. M. 2012. *Canopy Fruit Location Can Affect Olive Oil Quality in 'Arbequina' Hedgerow Orchards*. J. Am. Oil Chem. Soc. 89: 123-133.

Karkoula, E., Skantzari, A., Melliou, E. and Magiatis, P. 2012. *Direct measurement of oleocanthal and oleacein levels in olive oil by quantitative 1H NMR. Establishment of a new index for the characterization of extra virgin olive oils*. J. Agric. Food Chem. 60: 11696-11703.

Karkoula, E., Skantzari, A., Melliou, E., and Magiatis, P. 2014. *Quantitative Measurement of Major Secoiridoid Derivatives in Olive Oil Using qNMR. Proof of the Artificial Formation of Aldehydic Oleuropein and Ligstroside Aglycon Isomers*. J. Agric. Food Chem. 62: 600-607.

Koudounas, K., Banilas, G., Michaelidis, C., Demoliou, C., Rigas, S., and Hatzopoulos, P. 2015. *A defence-related Olea europaea β -glucosidase hydrolyses and activates oleuropein into a potent protein cross-linking agent*. J. Exp. Bot. doi:10.1093/jxb/erv002

Limiroli, R., Consonni, R., Ottolina, G., Marsilio, V., Bianchi, G., and Zetta, L. 1995. *1H and 13C NMR characterisation of new oleuropein aglycone*. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1519-1523.

Melliou, E., Killday, K.B. and Magiatis, P. 2015. *A New Ultra Rapid Screening Method for Olive Oil Health Claim Evaluation Using Selective Pulse NMR Spectroscopy* From the book: Magnetic Resonance in Food Science: Defining Food by Magnetic Resonance. Royal Society of Chemistry

Paiva-Martins, F., Gordon, M. H. 2001. *Isolation and Characterization of the Antioxidant Component 3,4-Dihydroxyphenylethyl 4-formyl-3-formylmethyl-4-hexenoate from Olive (Olea europaea) Leaves*. J. Agric. Food Chem. 49: 4214-4219.

Pérez-Trujillo, M., Gómez-Caravaca, A.M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., and Parella;

T. 2010. *Separation and identification of phenolic compounds of extra virgin olive oil from Olea europaea L. by HPLC-DAD-SPE-NMR/MS. Identification of a new diastereoisomer of the aldehydic form of oleuropein aglycon.* J. Agric. Food Chem. 58: 9129-9136.

Sanchez de Medina, V., Priego-Capote, F., Jimenez-Ot, C. and Luque de Castro, M. D. 2011. *Quality and stability of edible oils enriched with hydrophilic antioxidants from the olive tree: The role of enrichment extracts and lipid composition.* J. Agric. Food Chem. 59: 11432-11441.

Problematiche fitopatologiche e aspetti fitosanitari dell'olivo nell'Italia centro-meridionale tra avversità note e nuove emergenze

V.Vizzarri¹, L.Tosi²

¹ Centro di Ricerca per l'Olivicoltura e l'Industria Olearia (CRA-OLI), C.da Li Rocchi-Vermicelli, 87036 Rende (CS), Italia (autore per la corrispondenza), e-mail: veronica.vizzarri@entecra.it

² Dipartimento di Scienze Agrarie, Ambientali ed Alimentari, Università degli Studi di Perugia, Borgo XX Giugno, 74, 06121 Perugia, Italia; e-mail: laura.tosi@unipg.it

Riassunto

La rilevanza economica, sociale, culturale ed eco-ambientale che l'olivo riveste in Italia ed in altri Paesi mediterranei, il mantenimento degli oliveti esistenti, la coltivazione in nuove aree o addirittura la sua introduzione in aree extra-europee richiedono una grande attenzione per le problematiche fitopatologiche della coltura ed un continuo aggiornamento sugli aspetti agro-culturali ed epidemiologici di fitopatie e fitofagi. La presente nota illustra, pertanto, l'attuale situazione delle problematiche fitopatologiche dell'olivo anche alla luce dei cambiamenti climatici, evidenziando come questi possano incidere sulla recrudescenza di malattie già note, focalizzando l'attenzione sulle nuove emergenze e fornendo indicazioni sulle più moderne strategie di difesa integrata ecosostenibile.

Abstract

The economic, social, cultural and eco-environmental importance of olive growing in Italy and the other Mediterranean countries, coupled with the maintenance of existing olive orchards and the spread of olive cultivation to new areas or its introduction in areas outside Europe, makes it necessary to pay close attention to crop phytopathological problems and to update the cultural and epidemiological aspects of plant pests and diseases on a continuing basis. This paper describes the current phytopathological problems in olive, including in the light of climate change. It shows how these problems can affect the re-emergence of diseases that are already known and focuses attention on newly emerging threats, besides informing on the latest eco-sustainable integrated protection strategies.

Introduzione

Il settore olivicolo italiano mostra, lungo tutto il territorio, situazioni molto diversificate che possono spiegare la perdita di competitività del Paese. Infatti, a differenza della Spagna, l'olivicoltura in Italia è ancora praticata in terreni marginali anche se, come accade nelle regioni meridionali, essa rappresenta l'unica scelta per lo sfruttamento di certi territori. A fronte di alcuni punti di debolezza come la ridotta superficie media nazionale—il 70% delle aziende olivicole ha una superficie di poco al di sotto di due ettari—vi sono alcuni punti di forza, rappresentati dall'ampiezza del patrimonio varietale anche se solo una decina sono le varietà più diffuse a livello nazionale, occupando una superficie pari a 475.000 ha, circa il 42% del totale (Madau, 2009). Tra queste varietà spiccano Coratina, Ogliarola Salentina e Cellina di Nardò, diffuse in Puglia, ed altre coltivate in gran parte del territorio italiano (Carolea, Frantoio, Leccino). Almeno altre cento varietà, a diffusione molto limitata (tra 1.000 e 10.000 mq) rappresentano però, per le caratteristiche delle drupe, destinate al consumo diretto, o per la qualità dell'olio, una grande risorsa specialmente per la ricerca di nuove fonti di resistenza alle avversità biotiche che maggiormente penalizzano la produzione olivicola, oltre che per indirizzarne la coltivazione in zone più vocate perché più facilmente adattabili alle differenti condizioni pedoclimatiche del territorio italiano.

La presente nota, a distanza di un decennio da una precedente pubblicazione (Tosi e Zazzerini, 2005), si propone di aggiornare la situazione fitosanitaria dell'olivo dando risalto, tra le fitopatie già note, alla verticilliosi, malattia vascolare tuttora difficile da contrastare, all'antracnosi, avversità considerata minore, che sta mostrando negli ultimi anni una maggiore intensità degli attacchi in alcuni ambienti olivicoli, ed infine focalizza l'attenzione su due avversità emergenti. L'obiettivo della rassegna è, quindi, quello di evidenziare come lo sviluppo e l'adozione dei mezzi di lotta non possono prescindere da una profonda ed aggiornata conoscenza delle tecniche agro-colturali che, modificandosi, influenzano l'agrosistema olivo determinando ripercussioni sull'incidenza e sulla gravità di avversità come quelle sopra citate. La moderna difesa fitosanitaria, come impone la direttiva 128/2009 CE, recepita in Italia con D.L. n° 150/2012, affronta in modo ampio ed organico gli aspetti relativi all'impatto ambientale e alla salubrità degli alimenti conseguenti all'uso degli agrofarmaci. A partire dal 01.01.2014, mediante il Piano d'Azione Nazionale (PAN) che individua due livelli di applicazione (difesa integrata e agricoltura biologica), vengono forniti i principi generali della difesa integrata, che diventa obbligatoria. In sintesi, la nuova normativa basa la difesa sulla prevenzione, sfruttando in modo sinergico le potenzialità e le peculiarità che i vari mezzi di lotta offro-

no per consentire una completa protezione della coltura, non limitandosi al contenimento di una singola fitopatia, e per intervenire tempestivamente quando insorgono nuove emergenze (ad es. disseccamento rapido dell'olivo). La realizzazione di una razionale difesa delle colture impone, quindi, un continuo e costante aggiornamento delle conoscenze, delle tecnologie e delle tecniche ed una sempre maggiore integrazione fra competenze diverse.

Aspetti epidemiologici della verticilliosi ed influenza delle pratiche fitosanitarie

Questa avversità crittogamica, diffusa da molti anni in oliveti dell'Italia centro-meridionale e anche in diversi Paesi dell'Area Mediterranea (Spagna, Grecia, Tunisia, Marocco, Siria, ecc.), sta causando problemi sia in vecchi impianti sia in oliveti giovani e spesso irrigui. Ricerche condotte in oliveti del centro Italia (Umbria, Toscana) e del Sud (Calabria, Sicilia, Puglia), a partire dagli anni '90 (Tosi e Zazzerini, 1998; 2000; Ciccacese 2003; Vizzarri, 2005) hanno evidenziato che fattori climatici, agro-colturali e geno-fenotipici, legati all'incremento dell'incidenza ed intensità della malattia e al fenomeno, non infrequente, del risanamento naturale di soggetti infetti, possono influire in modo diverso sullo sviluppo della verticilliosi (Fig. 1) e di conseguenza vanificare gli interventi fitosanitari.



Figura 1A: Verticilliosi dell'olivo. Manifestazione caratteristica del decorso cronico o lento declino



Figura 1B: Verticilliosi dell'olivo.

La certificazione dello stato fitosanitario delle piante è un aspetto molto rilevante non solo nella costituzione di nuovi impianti ma anche nella ristrutturazione di vecchi oliveti con aumento della densità d'impianto, come accaduto durante gli ultimi due decenni in Grecia, Spagna ed anche Italia, sia in coltura asciutta sia irrigua (Navarro e Parra, 2008). A questo proposito, ricerche condotte in Puglia (Nigro *et al.*, 2005) hanno consentito di rilevare la presenza di *Verticillium dahliae* nel 50% dei vivai analizzati ed anche in Umbria sono stati osservati e sono noti casi di verticilliosi in giovani impianti come pure in oliveti ristrutturati, riconducibili a materiale propagativo infetto (Tosi, com.pers.).

In entrambe le situazioni sopra descritte (impianti nuovi e sostituzione di piante morte in conseguenza della malattia), l'uso di materiale propagativo sano deve essere associato alla scelta di cultivar resistenti o all'uso di varietà innestate su portinnesti resistenti alla verticilliosi. Questo mezzo di lotta è, comunque, fortemente condizionato da alcune caratteristiche biologiche del patogeno (densità d'inoculo nel terreno, virulenza degli isolati), dalle condizioni ambientali, dai risultati degli screening di resistenza, non sempre concordanti in conseguenza dell'impiego di differenti isolati di *V.dahliae*, di diverse metodiche d'inoculazione e condizioni sperimentali utilizzate per valutare la resistenza. Per quest'ultimo aspetto si avverte, pertanto,

l'esigenza di adottare protocolli sperimentali standardizzati e riconosciuti a livello internazionale.

In base alla virulenza su olivo gli isolati di *V.dahliae* vengono tradizionalmente classificati come patotipi defoglianti (D) e non defoglianti (ND) in funzione della capacità di determinare rispettivamente la completa caduta delle foglie ancora verdi (Rodríguez-Jurado *et al.*, 1993). In particolare i patotipi D, isolati da olivo e cotone sono in grado di manifestare virulenza su entrambi gli ospiti con sintomi che riguardano avvizzimento, clorosi, defogliazione e morte della pianta, mentre i patotipi ND determinano sintomi simili la cui gravità è però lieve o moderata.

In generale le differenze nella virulenza sono evidenti anche tra le diverse cultivar di olivo e le infezioni causate dai patotipi D iniziano prima e progrediscono velocemente e con maggiore intensità (Rodríguez-Jurado *et al.*, 1993; Lopez-Escudero *et al.*, 2004; Martos-Moreno *et al.*, 2006; Dervis *et al.*, 2010).

E' noto, inoltre, che, essendo la riproduzione del patogeno esclusivamente di natura agamica, le uniche possibilità che possono assicurare scambio di materiale genetico sono rappresentate dalle anastomosi ifali (fusione di ife tra isolati vegetativamente compatibili) e dalla successiva eterocariosi (fusione di nuclei). Sebbene molte ricerche abbiano evidenziato un'associazione tra gruppi di compatibilità vegetativa (VCG) e diversità genetica (molecolare), la correlazione tra specificità dell'ospite, virulenza del patogeno e distribuzione geografica appare più complessa, e di difficile interpretazione. Infatti, sebbene in tutti i Paesi in cui il patotipo defoliante è stato segnalato (Pérez-Artés *et al.*, 2000; Collado-Romero *et al.*, 2006; Dervis *et al.*, 2010) e classificato come appartenente al gruppo VCG 1A, e il patotipo ND sia stato assegnato agli altri gruppi (VCG 2, VCG 4), alcune ricerche hanno evidenziato come non vi sia correlazione tra patogenicità degli isolati da olivo e gruppi VCG (Tanatoui *et al.*, 2002) e come, entro il gruppo/patotipo VCG 1A/D, alcuni isolati D mostrino una virulenza (gravità dei sintomi), in inoculazioni artificiali, simile a quella dei patotipi ND (Dervis *et al.*, 2010).

La caratterizzazione e la differenziazione genetica di isolati di *V. dahliae* da olivo, studiate impiegando tecniche molecolari (RAPD, AFLP e PCR con specifici marcatori), sembrano evidenziare che entro un dato gruppo di VCG vi sia similarità a livello molecolare. Questi gruppi di isolati riguardano la specificità dell'ospite e l'origine geografica (Collado-Romero *et al.*, 2006; 2008) anche se va rilevato che patotipi VCG 1A/D, isolati da olivo in Turchia, molecularmente differenti da quelli

spagnoli, non hanno mostrato differenze significative nella virulenza, in saggi di patogenicità (Dervis *et al.*, 2010). Ricerche condotte in zone olivicole del bacino del Mediterraneo hanno evidenziato che i patotipi D si sono diffusi rapidamente in Spagna (Mercado-Blanco *et al.*, 2003; Navas-Cortés *et al.*, 2008). In Turchia è stata riportata una maggiore virulenza di isolati appartenenti al gruppo/patotipo VCG 1A/D (Dervis *et al.*, 2010), mentre in Italia sembrano prevalere i patotipi ND (Nigro *et al.*, 2005; Vizzarri, 2005). Non sorprende, quindi, che esistano discordanze tra i risultati di saggi di resistenza in condizioni artificiali e quelli relativi ad osservazioni in campo in merito al comportamento varietale che può essere largamente influenzato dalle condizioni ambientali, dalla quantità d'inoculo del patogeno nel terreno, dalla sua virulenza e anche dalle pratiche agro-colturali adottate. Dalle ricerche condotte in vari Paesi per oltre quarant'anni in ambienti naturali e in condizioni sperimentali, emerge che le varietà agronomicamente migliori sono quelle più suscettibili al patotipo D, come ad es. Picual, Hojiblanca, Arbequina, Manzanilla de Sevilla (cv spagnole), Kalamon, Amfissis, Konservolia (cv greche), Ascolana, Leccino (cv italiane); livelli più elevati di resistenza sono stati evidenziati nelle cultivar Oblonga, Changlot Real, Empeltre, Frantoio (López-Escudero e Mercado-Blanco, 2011).

Un'altra alternativa è rappresentata dai portinnesti resistenti: le cv Sevillano (Hartman *et al.*, 1971) e la cv Conservolia (Tjamos *et al.*, 1985), innestate su Oblonga hanno evidenziato resistenza nei confronti di *V.dahliae*, anche se l'innesto di altre cultivar di *Olea europea* o su specie differenti del genere *Olea* hanno mostrato risultati variabili. La reazione di un determinato genotipo in condizioni sperimentali può, infatti, modificarsi in pieno campo come conseguenza dei fattori ambientali, biologici e agro-colturali già ricordati (Blanco-Lopez *et al.*, 1998). La resistenza in condizioni naturali può essere modificata dal fenomeno del risanamento (*natural recovery*) di piante infette in cui si osserva la temporanea remissione dei sintomi (anche oltre 2-3 anni) con l'emissione di nuova vegetazione al di sotto dei rami disseccati (Tosi e Zizzerini, 1998; 2000; Trapero e Blanco, 2001; Ciccicarese, 2003). Per determinare una ripresa della malattia sono quindi necessarie nuove infezioni. Si ritiene che il fenomeno sia imputabile all'attivazione di risposte difensive dell'ospite con produzione di composti fenolici, all'occlusione dei vasi xilematici infetti con conseguente inattivazione di *V.dahliae*. Il fenomeno del risanamento, dipendente dalla virulenza del patogeno e dalla resistenza delle varietà, è stato più frequentemente osservato in oliveti in presenza di patotipi ND e cultivar resistenti (Tosi e Zizzerini, 1998; 2000; Vizzarri, 2005; Lopez-Escudero *et al.*, 2004; Martos-Moreno *et al.*, 2001). Questa situa-

zione può essere favorita dall'adozione di pratiche agro-colturali appropriate — concimazioni azotate equilibrate, eliminazione di erbe infestanti tramite falciatura onde evitare lavorazioni del terreno che possono determinare ferite e favorire nuove infezioni, uso della solarizzazione nel terreno attorno alle piante — per ridurre la quantità d'inoculo di *V.dahliae* (Tosi e Zizzerini, 1998; 2000; Ciccicarese, 2003; Trapero e Blanco, 2001). Di contro, in un recente studio, condotto in Puglia (Sud Italia), in presenza di olivi giovani (5-12 anni) della cultivar altamente suscettibile Bella di Cerignola ed in presenza nel terreno di una moderata densità di inoculo di *V.dahliae* (patotipo ND), è stato evidenziato come il risanamento delle piante, indotto artificialmente impiegando singolarmente e in combinazione solarizzazione, calcio cianamide e spollonatura, sia risultato piuttosto basso e limitato ad un solo anno (Bubici e Cirulli, 2014).

In definitiva nelle zone olivicole italiane, per la natura polietica di *V.dahliae*, la maggior diffusione di patotipi ND e l'impossibilità di eradicare la malattia, le strategie di lotta devono basarsi sull'applicazione di pratiche agro-colturali che interagendo con alcune caratteristiche biologiche del patogeno e con le condizioni ambientali possono garantire effetti benefici, se non sinergici, nel contenimento di questa avversità.

Aspetti epidemiologici dell'antracnosi ed influenza delle pratiche fitosanitarie

L'antracnosi o lebbra, oggi presente in molte zone olivicole del mondo, è da tempo diffusa in alcuni Paesi del bacino del Mediterraneo se pur con differente intensità in conseguenza di autunni miti e piovosi. In Italia la malattia, più frequente e grave in alcune regioni meridionali (Puglia, Calabria), è stata osservata anche in Sardegna, Sicilia ed occasionalmente in Umbria e Toscana. Dalla prima segnalazione in Puglia (Ciccarone, 1950), le infezioni hanno manifestato andamenti epidemici nelle regioni del Sud Italia per almeno vent'anni per poi presentare una regressione (Puglia, Sardegna, Sicilia). Il fenomeno, dapprima attribuito a perdita di virulenza dell'agente causale, in seguito, è stato imputato ad andamenti stagionali più asciutti in conseguenza dei mutamenti climatici degli ultimi due decenni. Costituiscono una eccezione la Piana di Gioia Tauro (Calabria) e il Salento (Puglia) dove le condizioni ambientali favoriscono, tuttora, il manifestarsi di gravi epidemie (Cacciola *et al.*, 2012).

Differenti specie di *Colletotrichum* sono state indicate quali responsabili dell'antracnosi nei vari Paesi dove la malattia è presente; recenti studi morfologici e molecolari (Faedda *et al.*, 2011) hanno evidenziato che *C. clavatum* (in precedenza indicato come *C. acutatum* gruppo molecolare A4) ha causato gravi epidemie in Grecia, Montenegro, in alcune ristrette aree portoghesi e spagnole ed in Italia. In particolare, nelle regioni meridionali italiane, mediante prove di compatibilità vegetativa, (Agosteo *et al.*, 2002), per correlare l'origine geografica ed i profili molecolari (tramite RAPD), sono stati individuati due gruppi VCG nella popolazione di *Colletotrichum*: uno comprendente gli isolati di provenienza pugliese, l'altro che raggruppa gli isolati originari di Calabria, Sardegna e Umbria e l'isolato greco di riferimento (CBS 193.32) depositato da Petri nel 1930. La presenza di due distinti gruppi VCG in Puglia e Calabria fa ipotizzare che *C. clavatum* sia stato introdotto dai Balcani in Italia in tempi diversi, probabilmente durante gli anni 1930-40 (Agosteo, 2010) e poi, attraverso la diffusione di materiale infetto si sia diffuso dalla Calabria ad altre regioni (Sardegna, Umbria). Non si può, tuttavia, escludere che vi sia stata un'unica introduzione del patogeno e che differenti gruppi VCG in vari Paesi si siano originati a seguito di un processo di diversificazione indotto dall'isolamento geografico. Così, *C. simmondsii* (inizialmente identificato come gruppo A2 di *C. acutatum sensu lato*, specie responsabile delle epidemie di antracnosi in Portogallo (Talhinhas *et al.*, 2011), non è stato isolato da olivo in Italia, pur essendo noto quale agente causale di antracnosi della fragola in varie regioni tra cui Puglia e Calabria. Analogamente *C. acutatum sensu stricto* (inizialmente gruppo A5) non è stato isolato su olivo in Italia mentre è la specie prevalente nelle aree olivicole dell'emisfero australe (Faedda *et al.*, 2011). In sostanza, diverse specie di *Colletotrichum* sono responsabili dell'antracnosi dell'olivo e dalle ricerche condotte emerge, salvo poche eccezioni, che una data specie risulta prevalente in una determinata zona olivicola evidenziando un potenziale adattamento in funzione delle condizioni ambientali e delle caratteristiche genetiche dell'ospite.

Da quanto sinteticamente illustrato, emerge che virulenza del patogeno, suscettibilità delle cultivar e condizioni ambientali sono i fattori predisponenti le infezioni di *Colletotrichum* spp. Le più recenti acquisizioni dal punto di vista epidemiologico indicano che in condizioni naturali, le infezioni a carico dei fiori e dei giovani frutticini hanno luogo in primavera quando le condizioni termo-igrometriche sono più favorevoli; durante l'accrescimento delle drupe nei mesi estivi, caratterizzati da periodi caldi e asciutti, le infezioni divengono latenti costituendo comunque la principale fonte d'inoculo per le epidemie autunnali. Il patogeno può penetrare diret-

tamente, perforando l'epicarpo delle drupe grazie alla produzione di cutinasi extracellulari, ma la gravità delle infezioni e il tasso di colonizzazione aumentano significativamente in presenza di microlesioni causate dalle punture di ovideposizione o dai fori di sfarfallamento della mosca delle olive (*Bactrocera oleae* Gmelin). L'attività trofica delle larve favorisce la colonizzazione del patogeno e anticipa la maturazione delle drupe; l'insetto può inoltre contribuire alla dispersione dei conidi.

La suscettibilità delle drupe aumenta man mano che queste maturano e in condizioni favorevoli esse sono soggette a marciumi (Fig. 2) e mummificazione, determinando gravi perdite quanti-qualitative, specialmente per la scadente qualità dell'olio. Inoltre, il patogeno sporula sulla superficie dei frutti infetti dando luogo, se perdurano favorevoli condizioni ambientali, a cicli infettivi secondari; i frutti mummificati che restano attaccati ai rametti, consentono la sopravvivenza del patogeno in inverno e rappresentano la fonte d'inoculo per la stagione successiva.



Figura 2: Lebbra dell'olivo. Sintomatologia tipica a "muso di scimmia" su drupe attaccate da *Colletotrichum gloeosporioides* con evidenti acervuli del fungo.

Le informazioni in merito alla suscettibilità/resistenza delle diverse cultivar non sono avulse da contraddittorietà, a seguito di una non sempre chiara identificazione delle cultivar, e a discrepanze tra i risultati ottenuti in saggi di laboratorio rispetto alle osservazioni in campo. A questo proposito c'è una maggiore concordanza dei dati se le infezioni artificiali, in condizioni controllate, vengono eseguite su drupe immature e verdi rispetto a quelle mature, poiché la suscettibilità dei frutti aumenta con la maturazione. Ottobratica, Corniola, Strana, Carolea, Picudo, Morona Manzanilla de Seviglia sono alcune tra le cultivar più suscettibili mentre risultano resistenti Frantoio, Leccino, Santomauro, Picual, Blanqueta, Koroneiki e Razzola (Cacciola *et al.*, 2012). L'uso di cultivar meno suscettibili o resistenti è, quindi, un valido mezzo di contenimento della malattia al momento della costituzione di nuovi impianti.

Di contro, negli oliveti esistenti, dove sono presenti cultivar suscettibili o condizioni ambientali favorevoli allo sviluppo dell'antracnosi è consigliabile effettuare potature per allontanare rami e rametti infetti e frutti mummificati allo scopo di ridurre la quantità d'inoculo e favorire un maggiore arieggiamento della chioma così da ridurre l'umidità all'interno della vegetazione e anticipare la raccolta delle drupe. Questi mezzi di difesa devono, comunque, essere integrati con trattamenti chimici, non risolutivi ma necessari per scongiurare gravi epidemie. E' consigliabile intervenire con prodotti rameici, privilegiando i formulati a basso dosaggio in ioni cuprici e dotati di maggiore adesività e persistenza, che applicati in pre-fioritura e post-allegagione contro l'occhio di pavone, consentono di sfruttare l'attività collaterale nei confronti dell'antracnosi. I trattamenti rameici sono da ripetersi durante l'accrescimento delle drupe e in pre-invaiaura; purtroppo in annate piovose e in presenza di olivi secolari, è ancora più opportuno controllare la corretta e uniforme distribuzione dei prodotti fitosanitari nella chioma delle piante. Di recente sono state condotte prove sperimentali in oliveti pugliesi per confrontare l'efficacia di alcune strategie di difesa che prevedono l'uso di prodotti rameici, pyraclostrobin e la miscela tryfloxystrobin + tebuconazolo. La sperimentazione ha evidenziato che pyraclostrobin associato al rame e la miscela tryfloxystrobin + tebuconazolo manifestano un'elevata attività nei confronti del patogeno e nel limitare le infezioni delle drupe. Fondamentale è intervenire in pre-fioritura per contenere le infezioni latenti, e applicare prodotti rameici in post-invaiaura per ridurre quelle secondarie (Nigro *et al.*, 2011; Cacciola *et al.*, 2012). In Italia, il Ministero della Salute ha autorizzato temporaneamente, sin dal 2011, l'uso di pyraclostrobin in singola applicazione, tra luglio e agosto, su oliveti calabresi con alta pressione della malattia ma questo trattamento si è rivelato scarsamente efficace (Cacciola *et al.*, 2012).

Nuove emergenze fitosanitarie: complesso del disseccamento rapido dell'olivo

La prima segnalazione del Complesso del Disseccamento Rapido dell'Olivo, **CoDiRO**, (in inglese **Olive Quick Decline Syndrome, OQDS**), in alcuni oliveti del Salento (Puglia, Sud Italia) risale al 2010 (Saponari *et al.*, 2013) e, da qui, la fitopatia si è estesa rapidamente interessando, nel 2013, un'area di circa 10.000 ha. I sintomi della malattia sono caratterizzati da disseccamenti

improvvisi di rametti e branche che si estendono nella chioma portando a morte la pianta; gli apici e i margini fogliari appaiono ingialliti e successivamente le foglie imbruniscono fino a disseccare. Sezioni trasversali di tronco, branche e rametti evidenziano imbrunimenti, più o meno estesi, degli elementi vascolari. Le piante secolari sono quelle più gravemente danneggiate e, quando non muoiono, appaiono disseccate con un'abbondante emissione di polloni a livello del colletto, conseguenza delle drastiche potature effettuate dagli agricoltori nella speranza di far emettere nuova vegetazione (Fig. 3).

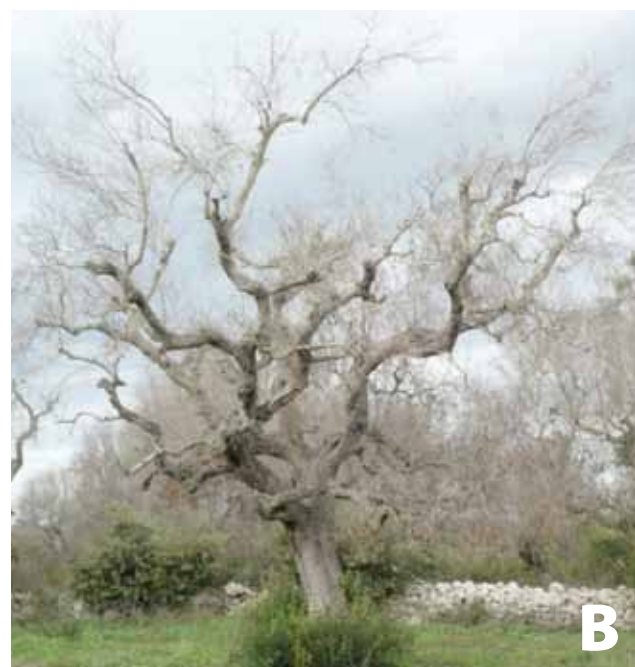


Figura 3: Complesso del disseccamento rapido dell'olivo (CoDiRO). Tipico disseccamento della chioma definito a 'pelle di leopardo' della chioma (A) e disseccamento totale della pianta per occlusione dei vasi linfatici (B).

Lunghi e complessi gli studi eziologici, non ancora conclusivi ed esaustivi, hanno consentito di: i) identificare, mediante saggi sierologici e molecolari, negli olivi sintomatici, ma anche in oleandri e mandorli con bruscature fogliari, ed altre specie arboree ed erbacee, il batterio Gram-negativo *Xylella fastidiosa* (Well e Raju) subsp. *paucum* (Cariddi *et al.*, 2014; Loconsole *et al.*, 2014); ii) isolare il batterio in coltura pura (Elbeaino *et al.*, 2014a); iii) sequenziare il genoma del batterio (Giampetruzzi *et al.*, 2015); iv) provare che *Philaenus spumarius* L., noto come sputacchina media per l'emissione di una bianca secrezione ghiandolare addominale che avvolge, come una schiuma, le forme giovanili (ninfe) proteggendole dal disseccamento e dai nemici naturali, è l'unica specie in grado di trasmettere il batterio (Saponari *et al.*, 2014). Nel Salento, questo insetto, polifago e dalla buona adattabilità ecologica non causa danni diretti significativi alle colture agrarie, ma dal punto di vista epidemiologico, è molto più rilevante la sua capacità a trasmettere batteri, come *X. fastidiosa*. Infatti, essendo quest'ultimo un batterio xilematico e asporigeno, può essere trasmesso solo da insetti dotati di apparato boccale pungente-succhiante (denominati xilemomizi). Acquisito il batterio, gli insetti vettori alimentandosi possono inocularlo in specie spontanee e coltivate ma solo negli ospiti suscettibili esso potrà moltiplicarsi dando luogo ad infezioni latenti o a piante sintomatiche. Le indagini in campo hanno evidenziato altri potenziali insetti vettori (Elbeaino *et al.*, 2014b) anche se finora non ne è stata dimostrata l'infettività.

X. fastidiosa è un patogeno da quarantena, inserito nella lista A1, All. I, Parte A, Sez. I Dir. 2000/29CE, ed endemico nelle Americhe, dove causa la clorosi variegata degli agrumi (Costa Rica, Brasile) e la malattia di Pierce sulla vite (California). Il suo ingresso, in un'area precedentemente indenne, è stato attribuito al commercio di materiale vegetale infetto, ipotesi poi confermata, nell'ottobre 2014, dall'intercettazione del Servizio Fitosanitario Olandese di una partita di piante ornamentali di caffè infette da *Xylella*, importate dal Costa Rica; è, quindi, molto plausibile che il ceppo CoDiRO sia di origine costaricana, come anche le analisi molecolari sembrano confermare (Giampetruzzi *et al.*, 2015).

Il quadro normativo aggiornato all'attualità può essere così sintetizzato: il 19 giugno 2015, è stato approvato il Decreto Ministeriale "Misure di emergenza per la prevenzione, il controllo e il contenimento di *Xylella fastidiosa* (Well e Raju) nel territorio della Repubblica

italiana" (G.U. n. 148 del 29 giugno 2015), in applicazione della Decisione (2015/789) della Commissione Europea del 18 maggio 2015, mirante a rafforzare le misure di protezione per impedire l'introduzione e la diffusione nell'Unione del batterio. Il decreto, in vigore dal 30 giugno 2015, abroga i precedenti del 26 settembre 2014 e 17 marzo 2015, attuativi della precedente Decisione UE n. 2014/497. Tra gli aspetti più importanti del decreto: rafforzamento dell'attività di monitoraggio su tutto il territorio nazionale, definizione delle zone delimitate, costituite da zona infetta (area di insediamento) e zona cuscinetto (area finalizzata a limitare l'espansione del fronte epidemico), divieto di introduzione sul territorio dell'Unione di vegetali provenienti da Costa Rica e Honduras ad eccezione delle sementi di caffè, individuazione delle misure di eradicazione e di contenimento. Tenuto conto delle esperienze finora maturate, le misure più razionali da intraprendere si basano su: interventi agronomici (in primavera sfalcio delle erbe infestanti e lavorazioni del terreno per eliminare gli stadi giovanili del vettore e ridurre il numero di insetti adulti in grado di diffondere il batterio), trattamenti contro gli adulti dell'insetto vettore, eventualmente sfuggiti agli interventi precedenti, con insetticidi registrati e autorizzati su olivo, ed estirpazione e distruzione delle piante infette.

Disseccamenti causati da fleotribo o punteruolo dell'olivo [*Phloeotribus scarabaeoides* (Bernard)]

Il fleotribo è un coleottero scolitide di colore scuro, ricoperto da una peluria nerastra, di piccole dimensioni (2-2,4 mm di lunghezza) ma robusto, diffuso in tutte le regioni olivicole mediterranee ed in Marocco (Lozano *et al.*, 1999), che attacca l'olivo ed altre Oleacee. Questo insetto è xilofago, sia negli stadi larvali che come adulto, e dispone di 1-3 generazioni all'anno a seconda della suscettibilità di alberi indeboliti o altro materiale vegetativo (Russo, 1938 a;b). Gli adulti scavano erosioni di alimentazioni (Fig. 4) in primavera, all'ascella delle mignole e dei germogli in accrescimento. Successivamente le femmine, seguite dai maschi, scavano gallerie di ovideposizione nei rami deperienti o tagliati con la potatura dove si notano moltissimi piccoli ammassi di rosura biancastra.



Figura 4: Fleotribo dell'olivo. La rosura evidenzia la presenza dello scolitide nella zona subcorticale (A) e gallerie di alimentazione (B)

I danni maggiori sono provocati dagli adulti, che con le numerose escavazioni provocano la morte dei rametti fruttiferi di un anno con conseguenti perdite di produzione, fino ad eliminare il 73% del potenziale raccolto (González e Campos, 1994). Sulle piante fortemente deperite o su quelle appena trapiantate in campo, l'attacco può provocare la morte dei soggetti infestati (Benazoun, 1992). Il coleottero scolitide causa inoltre un danno indiretto in quanto il tripide dell'olivo (*Liothrips oleae*) trova riparo per l'ibernamento e per la deposizione delle uova nei suoi covacci di alimentazione.

Il fleotribo attacca di preferenza il legno debilitato e con il flusso linfatico ridotto. I tronchi, le branche e i rami fruttiferi indeboliti, o che hanno subito danni a seguito di eventi climatici avversi (gelo, siccità prolungata, ecc.) rappresentano gli organi della pianta più appetiti dal parassita. Le parti attaccate vengono ulteriormente indebolite per l'attività trofica delle numerose larve che si sviluppano sotto la corteccia. Il fleotribo può provocare danni anche su olivi che si trovano ubicati nelle immediate vicinanze di cataste di legna di olivo o di residui della potatura, che fungono da focolai

di infestazione. In questo caso le larve si sviluppano sul legno morto o indebolito (scarti di potatura, branche secche, ecc.), e i nuovi adulti portandosi su olivi sani, durante la fase di alimentazione, scavano dei cunicoli di nutrizione anche sui rami in buono stato vegetativo provocando la morte dei piccoli rametti, delle infiorescenze (mignole) e persino dei giovani frutticini, riducendo sensibilmente la produzione dell'anno.

Le estati calde e siccitose degli ultimi anni, come riportano diverse segnalazioni, hanno favorito lo sviluppo del fleotribo in oliveti della Piana di Sibari (Calabria) causando la morte di giovani piante di olivo e il fallimento di nuovi impianti della cultivar Carolea. Il fleotribo trascorre l'inverno come larva e/o adulto e, poiché gli ultimi inverni sono stati particolarmente miti e senza prolungate gelate, questa specie non ha risentito del danno da freddo, moltiplicandosi a dismisura. Inoltre non si conoscono antagonisti naturali efficaci e capaci di mantenere la popolazione dello scolitide entro i limiti della soglia economica d'intervento.

Essenziale è, quindi, la prevenzione nella difesa dagli attacchi di questo coleottero mantenendo le piante

in un buon stato vegetativo con adeguate cure colturali: lavorazioni del terreno, concimazioni equilibrate, irrigazione (dove possibile), esecuzione di trattamenti fitosanitari, necessari contro altre avversità, eliminazione, con la potatura annuale, di parti di pianta indebolite o in via di esaurimento (Furlong *et al.*, 2004). I residui della potatura invernale rappresentano un potenziale focolaio di sviluppo dell'insetto e vanno allontanati al più presto, come pure si deve evitare di accatastare legna di olivo (per camini o forni) in prossimità delle piante coltivate. Un efficace mezzo di lotta consiste nel sistemare, nel mese di marzo, i cumuli di ramaglie di risulta della potatura (rami esca), localizzati nelle zone più ombrose all'interno dell'oliveto infestato, in modo da attirarvi gli adulti proliferanti. Queste esche vanno rimosse e bruciate entro il mese di aprile, non appena cominciano a comparire le rosure, prima che sfarfallino gli adulti della prima generazione e si portino sulle piante per riprodursi. Poiché questo piccolo coleottero si sviluppa in profondità nel legno di olivo, risulta quanto mai difficile raggiungerlo dall'esterno con trattamenti chimici. Buoni risultati si sono ottenuti utilizzando la deltametrina, che come altri piretroidi (Loch, 2005) è un insetticida che riduce la presenza del fleotribo con una sola applicazione. Nonostante ciò, la deltametrina è un principio attivo ad ampio spettro di azione e quindi causa una elevata mortalità di artropodi non bersaglio (Ruano *et al.*, 2008). Il contenimento di *P. scarabaeoides* con deltametrina sui tronchi già colonizzati dall'insetto è una buona strategia per diversi motivi: *i*) evita la dispersione del fleotribo dovuta all'effetto repellente indotto dall'insetticida; *ii*) l'applicazione del principio attivo sui tronchi, non utilizzati per il consumo umano, non determina effetti tossici per l'uomo; *iii*) la popolazione del coleottero viene ridotta prima che gli olivi siano attaccati.

Considerazioni conclusive e prospettive future

Le problematiche fitopatologiche dell'olivo, sinteticamente illustrate in questa rassegna, evidenziano come una corretta difesa debba basarsi su precise conoscenze eziologiche, oggi sempre più determinanti nel garantire il successo delle misure fitosanitarie intraprese. Solo una difesa integrata può rappresentare la strategia più efficace per contrastare le vecchie e le nuove avversità che affliggono il patosistema olivo e costituire anche un esempio da adottare per altre colture legnose. La scarsa efficacia dei fungicidi e la maggiore attenzione verso aspetti tossicologici ed ambientali, imposta dalle

normative europee e nazionali, richiede un approccio integrato che sfrutti le potenzialità e le peculiarità di differenti mezzi di lotta, agendo preventivamente sia per quanto riguarda i vecchi oliveti sia per i nuovi impianti. La prevenzione gioca un ruolo sostanziale nel comparto vivaistico dove la certificazione garantisce non solo la conformità varietale ma anche lo stato fitosanitario delle piante. A questo proposito, i mezzi diagnostici, in particolare quelli molecolari come la PCR quantitativa in tempo reale (qRT-PCR), sono essenziali nel caso della verticilliosi per verificare l'assenza del patogeno in parti di pianta asintomatiche ed anche nel terreno (Ceccherini *et al.*, 2014). L'accertamento dell'esistenza di infezioni latenti e/o la presenza di propagoli di *V.dahliae* nel suolo permetterebbe di monitorare la situazione esistente negli oliveti e di valutare l'efficacia delle misure fitosanitarie applicate; nei vivai l'utilizzo di tale metodica consentirebbe di ottenere piantine sane ed evitare di introdurre, anche tramite terreno contaminato, il patogeno in nuove aree di coltivazione.

Allo stato attuale, quanto verificatosi con il disseccamento rapido dell'olivo impone una maggiore sorveglianza a livello comunitario e nazionale riguardo ad introduzione e circolazione di materiale vegetale per garantirne la sanità dal punto di vista fitosanitario; un continuo e costante monitoraggio negli oliveti e nei vivai e l'adozione di sistematici accertamenti diagnostici tramite specifici protocolli, sono i pre-requisiti che possono garantire il maggior successo nel contenimento di vecchie e nuove avversità.

BIBLIOGRAFIA

- AGOSTEO G.E. (2010) – Avversità dell'olivo ed evoluzione dei relativi sistemi di difesa in Calabria fra XVIII e XX secolo. *Petria* 20 (Suppl.1), 41-70.
- AGOSTEO G.E., MAGNANO DI SAN LIO G., CACCIOLA S.O., FRISULLO S. (2002) – Characterisation of the casual agent of olive anthracnose in Southern Italy. *Acta Horticulturae* 586, 713-716.
- BENAZOUN A. (1992) - Contribución al estudio bioecológico del barrenillo *Phloeotribus scarabaeoides* Bern. (Col., Escolítidos) en el olivo en la región de Taroudant, Marruecos. *Olivae* 40, 26-35.
- BLANCO- LÓPEZ M.A., HIEMSTRA J., HARRIS D., LÓPEZ-ESCUADERO F.J., ANTONIOU P. (1998) – Selection and screening for host resistance. In: Himenstra J., Harris D. (eds.) *Compendium of Verticillium wilt in tree species*. Ponsen & Loonijen, Wageningen, 51-54.
- BUBICI G., CIRULLI M. (2014) – Natural recovery

from *Verticillium* wilt in olive: can it be exploited in a control strategy? Plant and Soil 381, 85-94.

CACCIOLA S.O., FAEDDA R., SINATRA F., AGOSTEO G.E., SCHENA L., FRISULLO S., MAGNANO DI SAN LIO (2012) – Olive anthracnose. Journal of Plant Pathology 94, (1), 29-44.

CARIDDI C., SAPONARI M., BOSCIA D., DE STRADIS A., LOCONSOLE G., NIGRO F., PORCELLI F., POTERE O., MARTELLI G.P. (2014) – Isolation of a *Xylella fastidiosa* strain infecting olive and oleander in Apulia, Italy. Journal of Plant Pathology 96, (2), 425-429.

CECCHERINI M.T., LUCHI N., PANTANI O.-L., ASCHER J., CAPRETTI P., PIETRAMELLARA G. (2014) – Upward movement of *Verticillium dahliae* from soil to olive plants detected by qPCR. World J. Microbiol. Biotechnol. 29, 1961-1967.

CICCARESE F. (2003) – Grave minaccia all'olivo: la verticilliosi. Informatore fitopatologico 53, (12), 17-21.

CICCARONE A. (1950) – Considerazioni biologiche e sistematiche sull'agente della "lebbra" delle olive, recentemente osservate nel Leccese. Bollettino della Regia Stazione di Patologia Vegetale di Roma S.III, 5, 143-165.

COLLADO-ROMERO M., MERCADO-BLANCO J., OLIVARES-GARCÍA C., JIMÉNEZ-DÍAZ R.M. (2008) – Phylogenetic analysis of *Verticillium dahliae* vegetative compatibility groups. Phytopathology 98, 1019-1028.

COLLADO-ROMERO M., MERCADO-BLANCO J., OLIVARES-GARCÍA C., VALVERDE-CORREDOR A., JIMÉNEZ-DÍAZ R.M. (2006) – Molecular variability within and among *Verticillium dahliae* vegetative compatibility groups determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism and polymerase chain reaction markers. Phytopathology 96, 485-495.

DERVIS S., MERCADO-BLANCO J., ERTEN L., VALVERDE-CORREDOR A., PÉREZ-ARTÉS E. (2010) – *Verticillium* wilt of olive in Turkey: a survey on disease importance, pathogen diversity and susceptibility of relevant olive cultivars. Eur. J. Plant Pathol. 127, 287-301.

ELBEAINO T., VALENTINI F., KUBBA R.A., MUBARAK P., YASEEN T., DI GIARO M. (2014a) – Multilocus sequences typing of *Xylella fastidiosa* isolated from olive affected by "olive quick decline syndrome" in Italy. Phytopathologia Mediterranea 53, 3, 533-542.

ELBEAINO T., YASSEN T., VALENTINI F., BEN MOUSSA I.E., MAZZONI V., D'ONGHIA A.M. (2014b) – Identification of three potential vectors of *Xylella fastidiosa* in southern Italy. Phytopathologia Mediterranea 53, 126-130

FAEDDA R., AGOSTEO G.E., SCHENA L., MOSCA S., FRISULLO S. MAGNANO DI SAN LIO G., CACCIOLA S.O. (2011) – *Colletotrichum clavatum* sp. nov.

identified as the casual agent of olive anthracnose in Italy. Phytopathologia Mediterranea 50, 283-302.

FURLONG M.J., ZU-HUA S., YIN-QUAN L., SIU-JIAN G., YAO-BIN L., SHU-SHENG L., ZALUCKI M.P. (2004) – Experimental analysis of the influence of pest management practice on the efficacy of an endemic arthropod natural enemy complex of the diamondback moth. J. Econ. Entomol. 97, 1814-1827.

GIAMPETRUZZI A., CHIUMENTI M., SAPONARI M., DONVITO G., ITALIANO A., LOCONSOLE G., BOSCIA D., CARIDDI C., MARTELLI G.P., SALDARELLI P. (2015) – Draft Genome Sequence of the *Xylella fastidiosa* CoDiRO Strain. Genome Announcements 3, 1, 1-2.

GONZÁLEZ R., CAMPOS M. (1994) – A preliminary study of the effect of attack by *Phloeotribus scarabaeoides* (Bern.) (Col., Scolytidae) on the productivity of the olive tree (*Olea europea*). Bull. Soc. Entomol. Suisse 67, 67-75.

HARTMAN H., SCHNATHORST W.C., WHISLER J. (1971) – Oblonga, clonal olive rootstock resistant to *Verticillium* wilt. Calif. Agric. 25, 12-15.

LOCH A.D. (2005) – Mortality and recovery of eucalypt beetle pest and beneficial arthropod populations after commercial application of the insecticide alpha-cypermethrin. Forest Ecol. Manage. 217, 255-265.

LOCONSOLE G., POTERE O., BOSCIA D., ALTAMURA G., DIELOUAH K., ELBEAINO T., FRASHERI D., LORUSSO D., PALMISANO F., SILLETTI M.R., TRISCIUZZI N., VALENTINI F., SAVINO V., SAPONARI M. (2014) – Detection of *Xylella fastidiosa* in olive trees by molecular and serological methods. Journal of Plant Pathology 96, (1), 7-14.

LÓPEZ-ESCUADERO F.J., DEL RIO C., CABALLERI J.M., BLANCO-LÓPEZ M.A., (2004) – Evaluation of olive cultivars for resistance to *Verticillium dahliae*. Eur. J. Plant Pathol. 100, 79-85.

LÓPEZ-ESCUADERO F.J., MERCADO-BLANCO J. (2011) – *Verticillium* wilt of olive: a case study to implement a integrated strategy to control a soil-borne pathogen. Plant Soil 344, 1-50.

LOZANO C., BENAZOUN A., KIDD N., CAMPOS M. (1999) – Population dynamics of the bark beetle *Phloeotribus scarabaeoides* Bernard (Coleoptera: Scolytidae), a pest of African olive orchards in Morocco. African Entomology 7, (2), 271-275.

MADAU F.A. (2009) – Evoluzione del mercato internazionale e nazionale del comparto olivicolo. Convegno di studi "Un piano strategico per lo sviluppo dell'olivicoltura del Medio Campidano" Gonnosfandiga (VS) 7 novembre 2009, 1-21.

MARTOS-MORENO C., CABALLERO J.M., DEL RÍO C., BLANCO-LÓPEZ M.A. (2001) – Epidemiological behaviour of olive cultivars in orchard infested with

- mixtures of defoliating and non-defoliating isolates of *Verticillium dahliae*. 8th Int. *Verticillium* Symposium, Book of abstracts, Córdoba, Spain, 67.
- MARTOS-MORENO C., LÓPEZ-ESCUADERO F.J., BLANCO-LÓPEZ M.A. (2006) – Resistance of olive cultivars to the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae*. *HortScience* 41, 1313-1316.
- MERCADO-BLANCO J., RODRÍGUEZ-JURADO D., PARRILLA-ARAUJO S., JIMÉNEZ-DÍAZ R.M. (2003) – Simultaneous detection of the defoliating and non-defoliating *Verticillium dahliae* pathotypes in infected olive plants by duplex, nested polymerase chain reaction. *Plant Dis.* 87, 1487-1494.
- NAVARRO C., PARRA MA. (2008) – Plantación. In: Barranco D., Fernández-Escobar R., Rallo L., (eds) *El cultivo del olivo*, 6th ed. Junta de Andalucía and Ediciones Mundi-prensa, Madrid, 189-238.
- NAVAS-CORTÉS J.A., LANDA B.B., MERCADO-BLANCO J., TRAPERO-CASA J.L., RODRÍGUEZ-JURADO D., JIMÉNEZ-DÍAZ R.M. (2008) – Spatiotemporal analysis of spreads of infections by *Verticillium dahliae* pathotypes within a high tree-density olive orchard in Southern Spain. *Phytopathology* 98, 167-180.
- NIGRO F., GALLONE P., ROMANAZZI G., SCHENA L., IPPOLITO A., SALERNO M.G. (2005) – Incidence of *Verticillium* wilt on olive in Apulia and genetic diversity of *Verticillium dahliae* isolates from infected trees. *J. Plant Pathol.* 87, 13-23.
- NIGRO F., GUARIO A., LACCONE G. (2011) – Ultime acquisizioni sull'epidemiologia e sulla protezione della lebbra dell'olivo. 23° Forum Medicina vegetale, Bari 15 Dicembre 2011.
- PÉREZ-ARTÉS E., GARCIA-PEDRAJAS M.D., BEJARANO-ALCÁZAR J., JIMÉNEZ-DÍAZ R.M. (2000) – Differentiation of cotton-defoliating and nondefoliating pathotypes of *Verticillium dahliae* by RAPD and specific PCR analyses. *Eur. J. Plant Pathol.* 106, 507-517.
- PETRI L. (1930) – Azione tossica dell'arseniato sodico sopra le spore del *Gloeosporium olivarum* Alm. *Bollettino della Regia Stazione di Patologia Vegetale di Roma* 10, 359-361.
- RODRÍGUEZ-JURADO D., BLANCO-LÓPEZ M.A., RAPOPORT H., JIMÉNEZ-DÍAZ R.M. (1993) – Present status of *Verticillium* wilt of olive in Andalusia (southern Spain) *Bull OEPP/EPPPO Bull* 23, 513-516.
- RUANO F., CAMPOS M., SÁNCHEZ - RAYA A.J., PEÑA A. (2008) - Deltamethrin application on colonized olive logs: effect on the emergence of the olive bark beetle *Phloeotribus scarabaeoides* Bernard 1788 (Coleoptera: Scolytidae) and its associated parasitoids. *Crop Protection* 27, 614 – 621.
- RUSSO G., (1938a) - V. Contributo alla conoscenza dei coleoteri scolitidi, fleotribo: *Phloeotribus scarabaeoides* (Bern.). *Fauv. Parte prima: Morfologia, anatomia e istologia*. *Boll. R. Lab. Ent. Agr. Portici* 1, 1–260.
- RUSSO G., (1938b) - VI. Contributo alla conoscenza dei coleoteri scolitidi, fleotribo: *Phloeotribus scarabaeoides* (Bern.). *Fauv. Parte seconda: Biografia, simbiotici, danni e lotta*. *Boll. R. Lab. Ent. Agr. Portici* 2, 1–419.
- SAPONARI M., BOSCIA D., NIGRO F., MARTELLI G.P. (2013) – Identification of DNA sequenze related to *Xylella fastidiosa* in oleander, almond and olive tree exhibiting leaf scorch symptoms in Apulia (southern Italy). *Journal of Plant Pathology* 95, 668.
- SAPONARI M., LOCONSOLE G., CORNARA D., YOKOMI R. K., DE STRADIS A., BOSCIA D., BOSCO D., MARTELLI G.P., KRUGNER R., PORCELLI F. (2014) – Infectivity and trasmission of *Xylella fastidiosa* by *Philaenus spumarius* L. (Hemiptera: Aphrophoridae) in Apulia, Italy. *Journal of Economic Entomology* 107, (4), 1316-1319.
- TALHINHAS P., MOTA-CAPITÃO, MARTINS S., RAMOS A.P., NEVES-MARTINS J., GUERRA_GUIMARÃES L., VÁRZEA V., SILVA M.C., SREENIVASA-PRASAD S., OLIVEIRA H. (2011) – Epidemiology, histopathology, and etiology of olive anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in Portugal. *Plant Pathology* 60, 483-495.
- TANATOUI A., LACHQER K., SEDRA M.H. (2002) – Vegetative compatibility and pathogenicity of *Verticillium dahliae* isolates from olive (*Olea europea*). *Phytopathologia Mediterranea* 41, 19-27.
- TJAMOS E.C., THANASSOULOPOULOS C.C., BIRIS D.A. (1985) – Resistance evaluation to *Verticillium dahliae* olive rootstocks. *Proc. 3rd Nat. Phytopathol. Conf. Hellenic Phytopathol. Soc.*, 18-19.
- TOSI L., ZAZZERINI A. (1998) – Indagini epidemiologiche sulla verticilliosi dell'olivo nell'Italia centrale. *Olivae* 71, 50-55.
- TOSI L., ZAZZERINI A. (2000) – Ulteriori indagini su alcuni aspetti epidemiologici della verticilliosi dell'olivo in Umbria. *Atti Giornate Fitopatologiche* 2, 81-86.
- TOSI L., ZAZZERINI A. (2005) – La difesa integrata dell'olivo dai patogeni vegetali. *Informatore fitopatologico LV*, 11, 12-18.
- TRAPERO A., BLANCO M.A. (2001) – Enfermedades. In: Barranco D., Fernández-Escobar R., Rallo L., (eds) *El cultivo del olivo*, 4th ed. Junta de Andalucía and Ediciones Mundi-prensa, Madrid, 495-550.
- VIZZARRI V. (2005) – Aspetti epidemiologici di *Verticillium dahliae* Kleb. in oliveti umbri, *screening* per la resistenza e caratterizzazione molecolare degli isolati. Selezione di microrganismi fungini, isolati dal filloplano, per possibili applicazioni in lotta biologica. Tesi di Dottorato, XIX Ciclo, Università degli Studi di Perugia, A.A. 2005/2006, 122 pp.



Príncipe de Vergara, 154.
28002 Madrid, España

Tel.: 34-915 903 638

Fax: 34-915 631 263

E-mail: iooc@internationaloliveoil.org

www.internationaloliveoil.org