



رقم 122  
النسخة العربية  
نوفمبر 2015

# LIVAE

المجلة الرسمية للمجلس الدولي للزيتون

## ملخص

اتجاهات في توصيف الخواص الكيميائية  
للمركبات الفينولية لزيت الزيتون البكر:  
نظرة عامة وتحديات جديدة

تباين المؤهلات الزراعية في مجمع زيتون  
(Olea europaea L) لصنف زيتون الزينال  
محلي "شمالي صفاقس"

مركبا oleokoronal و  
oleomissional: مكونات فينولية رئيسية  
جديدة في زيت الزيتون البكر الممتاز

مظاهر الصحة النباتية للزيتون في وسط  
جنوب إيطاليا بين الشدائد والملاحظات  
وحالات الطوارئ الجديدة





# ملخص

OLIVAE | رقم 122

## اتجاهات في توصيف الخواص الكيميائية للمركبات الفينولية لزيت الزيتون البكر: نظرة عامة وتحديات جديدة

# 3

عبد الحكيم بخوش، خيسوس لوزانو-سانشيز، ج، ألبرتو فرنانديز-غوتيريز، أنطونيو سيغورا-كارينيرو.

## تباين المؤهلات الزراعية في مجمع جنزيتون (Olea europaea L) لصنف زيتوننا المحلي "شملا ليفاقس"

# 17

بنعمارف، مز غنيغياشيم، يانقيج، بلغيثج، هرابس، هير قليم ك.

## مركبا oleokoronal و oleomissional: مكونات فينولية رئيسية جديدة في زيت الزيتون البكر الممتاز

# 23

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

## مظاهر الصحة النباتية للزيتون في وسط جنوب إيطاليا بين الشدائد والملاحظات وحالات الطوارئ الجديدة

# 35

ف. فيزاري، ل. توزي

## OLIVAE

الجريدة الرسمية للمجلس الدولي للزيتون

اللغات: العربية، الإنجليزية، الفرنسية، الإيطالية، الأسبانية

Peer Reviewed Journal

Príncipe de Vergara, 154

أسبانيا، 20082 Madrid

هاتف: 34-915 903 638

فاكس: 34-915 631 263

البريد: ioc@internationaloliveoil.org

الإلكتروني

Web: www.internationaloliveoil.org

التسجيل: 0255-996X

إن التسميات الواردة وعروض المادة في هذه المطبوعة لا تمثل تصريحاً لأي وجهة نظر من جانب المجلس الدولي للزيتون بشأن الموقف القانوني لأي دولة أو بلد أو بشأن ترسيم الحدود أو مدينة أو منطقة

أو السلطات الخاصة بها إن محتوى المقالات التي تظهر في هذه المطبوعة لا يعبر بالضرورة عن وجهة نظر OLIVAE. الأمانة التنفيذية لمجلس الزيتون

يُمكن إعادة نشر المقالات التي تظهر بالكامل أو جزء منها شريطة ذكر المصدر

## اتجاهات في توصيف الخواص الكيميائية للمركبات الفينولية لزيت الزيتون البكر: نظرة عامة وتحديات جديدة

عبد الحكيم بخوش<sup>أ،ب</sup>، خيسوس لوزانو-سانشيز<sup>ب،ج\*</sup>، ألبرتو فرنانديز-غوتيريز<sup>أ،ب</sup>  
وأنطونيو سيغورا-كاريتيرو<sup>أ،ب</sup>

<sup>أ</sup> قسم الكيمياء التحليلية في كلية العلوم، جامعة غرناطة، Fuentenueva رقم تسلسلي E-18071 غرناطة، إسبانيا.  
<sup>ب</sup> مركز بحوث وتطوير الغذاء الوظيفي FFRDC، بمتنزه التكنولوجيا لعلوم الصحة HSTP - Avenida del Conoci- miento رقم تسلسلي E-18016 غرناطة، إسبانيا.  
<sup>ج</sup> قسم بحوث وتطوير زيت الزيتون الوظيفية FOORD، Aceites Maeva S. L. Avda. Incar، رقم تسلسلي 18130 Escúzar غرناطة (إسبانيا).

باحث تُجرى المراسلات معه

\*هاتف: +34 958249510

فاكس: +34958249510

عنوان البريد الإلكتروني: [jesusls@ugr.es](mailto:jesusls@ugr.es)

### ملخص

نظراً للدور البارز الذي تلعبه المركبات الفينولية في القيمة الغذائية لزيت الزيتون البكر، فمن الضروري تطوير طرائق تحليلية فعالة ودقيقة لتحليلها نوعياً وكمياً. ويقدم هذا الاستعراض لمحة عامة عن النهج التحليلية المختلفة لتحديد المركبات الفينولية في زيت الزيتون البكر. ومن حيث المبدأ، يتضمن الإجراء التحليلي الخاص بتحديد المركبات الفينولية الفردية في زيت الزيتون البكر ثلاث خطوات أساسية: الاستخراج من عينة الزيت، والفصل الكروماتوغرافي، والتوصيف. وترتكز نظم الاستخراج في استخدامها الشائع على تقنيتي استخراج سائل-سائل (LLE) واستخراج الطور الصلب (SPE). ومن بين تقنيات الفصل المبلغ عنها، كانت تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) هي التقنية الأكثر انتشاراً لتحليل المركبات الفينولية. ومع هذا، فقد ثبت أن الكروماتوغرافيا الغازية (GC) والرحلان الكهربائي الشعري (CE) تعتبر من التقنيات القادرة على تحقيق نفس الأهداف مثل تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء فضلاً عن توفير منهجيات بديلة لتوصيف المركبات الفينولية في زيت الزيتون البكر. وقد سُلط الضوء على المعايير المطورة على النحو الأمثل، وكذا مزايا كل تقنية وعيوبها في هذا الاستعراض. وإضافة إلى ذلك، يتم دراسة الكواشف المختلفة بجانب تقنيات الفصل. وأخيراً، يتناول هذا الاستعراض أيضاً المشاكل التحليلية الحالية في تحديد المركبات الفينولية في زيت الزيتون البكر. وللتغلب على هذه المشاكل، يتعين على الباحثين أخذ عيوب الطرائق السابقة بعين الاعتبار. ويتمثل التحدي مستقبلاً في وضع طريقة واحدة محل التطبيق على جميع دراسات زيت الزيتون البكر المتعلقة بالمركبات الفينولية.

### كلمات مفتاحية

زيت الزيتون البكر، المركبات الفينولية، استخراج، تقنيات الفصل، المشاكل التحليلية.

### 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

وأظهرت الدراسات الإنسانية أن زيت الزيتون الغني بالمركبات الفينولية يعمل على تحسين التأثيرات المضادة للأوكسدة والمضادة للالتهابات، كما يحد من انتشار جزيئات التصاق الخلية مقارنة بزيت الزيتون التي تحتوي على نسبة منخفضة من المركبات الفينولية (Covas 2007; Fitó and de la Torre et al., 2007). وفي عام 2011، أقرت الهيئة الأوروبية لسلامة الأغذية (EFSA) إحدى المطالبات بشأن فعالية المركبات الفينولية لزيت الزيتون (5 ملغ/يوم) في حماية دهون الدم من الضرر التأكسدي (Franco and Galeano-Díaz et al., 2014).

وقد تم تحديد ما لا يقل عن ستة وثلاثين من المركبات الفينولية المتميزة بنائياً في زيت الزيتون البكر. وتعتبر الفينولات المسترطبة، مثل الكحوليات الفينولية والأحماض الفينولية واللجنينات والفلافونيدات والسيكوريدويد، أهم فئة من مضادات الأوكسدة الطبيعية الموجودة في زيت الزيتون البكر. ولسوء الحظ، فإن تركيزها ليس ثابتاً في زيت الزيتون البكر لكنه يختلف تبعاً لعدة عوامل منها صنف الزيتون، مرحلة نضج الثمار، إدارة الري والظروف المناخية للتربة في منطقة الزراعة (Bajoub and Carrasco-Pancorbo et al., 2015; Bakhouché and Lozano-Sánchez et al., 2015; Dabbou and Chehab et al., 2010). وبالإضافة إلى ذلك، ذكرت العديد من الدراسات تأثير المراحل المختلفة لتجهيز زيت الزيتون البكر، مثل السحق والعجن والطررد المركزي والتخزين والترشيح، على تكوين الفينول في زيت الزيتون البكر (Bakhouché and Lozano-Sánchez, et al., 2014a; Frankel and Bakhouché et al., 2013).

إلى التمييز السليم بين زيوت الزيتون البكر الغنية وبين تلك الفقيرة من حيث محتوى المركبات الفينولية، تم اقتراح العديد من الطرائق التحليلية لتحديد المركبات الفينولية باستخدام التقنيات المختلفة للاستخراج والفصل والتوصيف النوعي والكمي. واستخدمت طريقتين رئيسيتين لاسترداد المركبات الفينولية: استخراج سائل-سائل (LLE) واستخراج الطور الصلب (SPE). وتم اختبار مخاليط من المذيبات المختلفة في الطريقة الأولى وأنواع مختلفة من المواد الماصة في الثانية لتحقيق أقصى قدر من استرداد المركبات الفينولية من زيت الزيتون البكر (Bendini and Bonoli et al., 2003). وبالنسبة لتوصيف الخواص الفينولية، تعتبر الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) هي التقنية الرئيسية المستخدمة لفصل المركبات الفينولية (Bayram and Esatbeyoglu et al., 2012). كما تم الإبلاغ عن تقنيات أخرى مثل الكروماتوغرافيا الغازية

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.

## Keywords

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

## مقدمة

يحظى زيت الزيتون البكر بشعبية متنامية في جميع أنحاء العالم، ليس فقط بسبب خواصه الحسية الفريدة من نوعها ولكن أيضاً بسبب التأثيرات الصحية المفيدة المرتبطة باستخدامه، خاصة كجزء من حمية البحر الأبيض المتوسط. وتُعزى تأثيرات زيت الزيتون المعززة للصحة إلى الأحماض الدهنية به، فضلاً عن وجود العديد من المكونات النشطة بيولوجياً مثل التوكوفيرول، والدهون الفوسفورية، والمركبات الفينولية. وترجع في الواقع العديد من الوظائف والخواص البيولوجية إلى المركبات الفينولية.

هذه الأنظمة ليس فقط في المذيبات و/أو المواد الماصة في الطور الصلب المستخدمة ولكن أيضاً في كميات العينة اللازمة للتحليل وكميات المذيبات.

### تقنية استخراج سائل-سائل

يتم غالباً فصل المركبات الفينولية في زيت الزيتون عن طريق استخراج محلول زيت مع الميثانول أو مزيج من الميثانول/المياه. وقبل إجراء الاستخراج، تتضمن تقنية سائل-سائل خطوة تمهيدية يتم فيها حل زيت الزيتون البكر باستخدام مذيب لا قطبي لإزالة أجزاء المادة الدهنية وتسهيل استخراج المركبات الفينولية باستخدام المذيب القطبي. ويُستخدم الهكسان وإثير البترول والكلوروفورم لهذا الغرض، غير أن الهكسان هو الأكثر شيوعاً (Lerma-García and Lantano et al., 2009; Montedoro and Servili et al., 1992). وفيما يتعلق بمذيبات الاستخراج، ذُكرت بيانات مثيرة للجدل في المؤلفات المتاحة في هذا الصدد وذلك بخصوص أفضل مذيب مستخدم للاسترداد التام للمركبات الفينولية من زيت الزيتون البكر. وفي البداية، بدأ أن إجراء الاستخراج باستخدام مزيج الميثانول/الماء بنسبة 20:80 يعطي نتائج أفضل من الميثانول المطلق أو مزيج الميثانول/الماء بنسبة 60:40 (Montedoro and Servili et al., 1992). لكن بعد مضي خمس سنوات، وقع الاختيار على الميثانول المطلق لاستخراج المركبات الفينولية من زيت الزيتون البكر بدلاً من مزيج الميثانول/الماء نظراً للاستخراج غير المكتمل لبعض المركبات الفينولية عند استخدام المزيج الأخير كمذيب استخراج. ويمكن عزو هذه الفرضية إلى التكون الملحوظ لمستحلب من الماء والزيت (Angerosa and D'Alessandro et al., 1995). وأظهرت دراسات أخرى أن خفض نسبة الميثانول إلى 60% أدت إلى زيادة كفاءة استرداد المركبات الفينولية (Ballus and Meinhart et al., 2014; Pirisi and Cabras et al., 2000). كما تم الإبلاغ عن استخدام مذيبات عضوية أخرى غير الميثانول في تقنية استخراج سائل-سائل. ومن أمثلة ذلك: الإيثانول، الأسيتونتريل وثنائي ميثيل الفورماميد، وأظهر هذا الأخير نتائج مثيرة للاهتمام من حيث كفاءة الاسترداد (Brenes and Garci et al., 2000).

يمكن تقسيم نظام استخراج سائل-سائل إلى فئات مختلفة تبعاً لكمية العينة والمذيب المستخدم في استخراج المركبات الفينولية من زيت الزيتون البكر. واتسم النظام التقليدي باستخدام كميات كبيرة من العينة والمذيبات العضوية، مما جعله شاقاً ومكلفاً ويستغرق وقتاً طويلاً (Gómez-Caravaca and Carrasco and Pancorbo et al., 2005). وبسبب هذه العيوب، تم تطوير نظام استخراج سائل-سائل جديد يسمى الاستخراج المصغر سائل-

والرحلان الكهربائي الشعري (Ballus and Meinhart et al., 2011; García-Villalba and Pacchiarotta et al., 2011). وتفتقر تقنيات الفصل المذكورة بكواشف مختلفة. وتعتبر طريقة كشف الصمام الثنائي (DAD) للأشعة فوق البنفسجية المرئية هي الأسلوب القياسي المستخدم مع المركبات الفينولية والتي تمثل، جنباً إلى جنب مع قياس الطيف الكتلي، النظام السائد في الوقت الحاضر (Bakhouche and Lozano-Sánchez et al., 2013). كما تم استخدام التحليل الطيفي بالرنين المغناطيسي النووي (NMR) ككشف في توصيف المركبات الفينولية في زيت الزيتون البكر؛ غير أنه نظراً لارتفاع تكلفته فهو لا يتوفر سوى في عدد محدود من المؤسسات (Etrakis and Giomyrganaki et al., 2008).

ورغم تطوير عدة طرائق لتحديد تركيز المركبات الفينولية في زيت الزيتون البكر، ما يزال من الصعب إجراء مقارنة مباشرة للبيانات المتاحة في مجموعة المؤلفات في هذا السياق نظراً لأن التركيزات المبلغ عنها تختلف بشكل كبير في كثير من الأحيان. وربما تفسر الإيضاحات المطروحة، مثل أن العوامل الزراعية والتكنولوجية المختلفة قد تؤثر على تركيز المركبات الفينولية في زيت الزيتون البكر، مثل هذه التباينات ولكن بشكل جزئي فقط. بيد أن بعض الباحثين أشاروا إلى أن التباينات التي لوحظت في تركيزات زيت الزيتون البكر قد تكون ناجمة عن الطرائق التحليلية المستخدمة (Bakhouche and Lozano-Sánchez et al., 2014b; Karkoula and Skantzari et al., 2012). ونتيجة لذلك، تمثلت أهداف هذا الاستعراض في: أولاً، تقديم لمحة عامة عن طرائق الاستخراج والفصل الرئيسية المستخدمة في تحليل المركبات الفينولية في زيت الزيتون البكر. وثانياً، تسليط الضوء على عيوب الطرائق الأكثر شيوعاً لأخذها بعين الاعتبار في الدراسات المستقبلية المتعلقة بالمركبات الفينولية في زيت الزيتون البكر.

## طرائق استخراج المركبات الفينولية من زيت الزيتون البكر

يعتبر الفصل عن مكونات العينة شرطاً أساسياً لأي نظام تحليل شامل. ويتمثل هدفه الرئيسي في إعداد مستخلص العينة الغنية بشكل متنسق بجميع المركبات المذكورة والخالية من عنصر المصفوفة المتداخل. ومن الملاحظ أن تقنيتي استخراج سائل-سائل واستخراج الطور الصلب هما الأكثر شيوعاً فيما يتعلق باستخراج المركبات الفينولية من زيت الزيتون البكر. وتختلف

البكر. وقد أجريت دراسة مقارنة لكلا النوعين من الخراطيش. وجاءت الدراسة بنتائج غير مرضية فيما يتعلق بنسب الاسترداد مع استخدام النوع  $C_{18EC}$  في حين جاءت خراطيش  $C_{18}$  بنتائج استرداد كمي كامل عملياً لجميع المركبات التي جرى فحصها. وقد عزي الباحثون السلوك المتباين لخراطيش  $C_{18}$  وخراطيش  $C_{18EC}$  إلى التفاعل بين المواد الماصة والحليلة (المادة المراد تحليلها). ويحتمل أن الآلية وراء الإطلاق المحفز بالوسط الحامل للحليلة تعتمد على التفاعل بين مجموعات السيلانول Si-OH المتبقية على سطح السيليكا والمركبات الممتصة. وبالنسبة لـ  $C_{18EC}$  فإنه يتم كبت المجموعات القطبية المتبقية، وعلى ما يبدو أن هذه الخاصية تضر بآلية إطلاق الحليلة (Liberatore and Procida et al., 2001). وفي دراسة أخرى مثيرة للاهتمام، جرت مقارنة جميع الخراطيش المذكورة أعلاه ( $C_{18}$  و  $C_8$  و ديول) من حيث كفاءة كل منهم في استرداد المركبات الفينولية من زيت الزيتون البكر. وأظهرت النتائج أن عملية الاستخراج باستخدام خراطيش ديول أعطت نسب استرداد أعلى لمجموع الفينولات، الفينولات الثنائية، التايروسول، الهيدروكسي تايروسول والسيكوريدويد مقارنة بتقنيات الاستخراج الأخرى (Bendini and Bonoli et al., 2003). وفي دراسة حديثة، وقع الاختيار أيضاً على تقنية استخراج الطور الصلب-خرطوشة ديول بوصفها الخرطوشة الأكثر كفاءة مقارنة بتقنية استخراج الطور الصلب-خرطوشة  $C_{18}$  وتقنية استخراج الطور الصلب-خرطوشة ساكس (Gómez-Caravaca and Carrasco and Pancorbo et al., 2005).

وثمة جانب مهم آخر يتعين أخذه في الاعتبار أثناء الاستخراج باستخدام تقنية الطور الصلب ألا وهو التوازن بين كمية زيت الزيتون البكر وحجم المواد الماصة المستخدمة. وفي هذا الصدد، جرى في البداية مزج 30 غرام من زيت الزيتون البكر مع الحلائل، ونُفذت تقنية استخراج الطور الصلب باستخدام خراطيش ديول ذات سعات مختلفة (500 ملغ و 1 غرام). وأظهرت النتائج أنه عند استخدام خراطيش سعة 500 ملغ، كانت قيم الاسترداد منخفضة. غير أنها سجلت زيادة كبيرة مع استخدام الخراطيش سعة 1 غرام. ولاحقاً، في نفس الدراسة، استُخدمت خرطوشة ديول سعة 1 غرام لاستخراج المركبات الفينولية من 10 غرام و 20 غرام و 30 غرام من زيت الزيتون البكر، وكان الهدف من ذلك هو الكشف عن نقطة تشبع خرطوشة ديول المستخدمة. وأظهرت النتائج أن معظم المركبات سجلت زيادة خطية في منطقة القمة مع زيادة كمية زيت الزيتون؛ بيد أنه مع كمية الـ 20 غرام من زيت الزيتون البكر، لوحظت انحناء للإشارة، ربما ترجع لتشبع الخرطوشة، بالنسبة للتايروسول وحمض الفانيليك وحمض السيرينجيك (Godoy-Caballero and Acedo-

et al., 2013). وفي دراسة حديثة، جرى تحسين نفس طريقة الاستخراج المصغر سائل-سائل عن طريق تقليل حجم المستخلص من 1 مل إلى 0.5 مل من أجل توصيف المركبات الفينولية في زيت الزيتون البكر باستخدام تقنية الكروماتوغرافيا السائلة فائقة الأداء - مقياس الطيف الكتلي رباعي الأقطاب الثلاثي (Becerra-Herrera and Sánchez-Astudillo et al., 2014). كما جرى أيضاً تطوير تقنيات استخراج سائل-سائل أخرى وتطبيقها لاستخراج المركبات الفينولية من زيت الزيتون البكر، مثل الاستخراج المصغر سائل-سائل المشتت DLLME، والاستخراج المصغر سائل-سائل المشتت عكسي الطور (RP-DLLME Godoy-Caballero and Acedo-Valenzuela et al., 2013).

#### تقنية استخراج الطور الصلب

أصبحت تقنية استخراج الطور الصلب أكثر شيوعاً في العقد الماضي كخطوة لفصل المركبات الفينولية من زيت الزيتون البكر. وجرى تطبيقها باستخدام عدة أنواع من المواد الماصة. وعلى سبيل المثال، استخدمت خراطيش  $C_8$  (قياس 500 ملغ، 3.5 مللي، Alltech) لفصل المركبات الفينولية من زيت الزيتون البكر، وتبين سرعتها وبساطتها (Pirisi and Cabras et al., 2000). وبعد ذلك بعام، جرت مقارنة بين خراطيش الطور ذي الارتباط ثنائي الهيدروكسيل (ديول) وخراطيش الطور الأميني لتحديد أي نوع كان أفضل لاستخراج هذه الحلائل (المواد المراد تحليلها). واستبعد الباحثون خرطوشة المرحلة الأمينية نظراً لظهور بعض المركبات في المادة المستخرجة نتيجة لشائبة نشأت أثناء عملية الاستخراج من خلال التفاعل بين المذيب والطور الأميني (Mateos and Espartero et al., 2001). كما جرى استخدام نوعين آخرين من الخراطيش التجارية: أوكتاديسيل  $C_{18}$  (سعة: 2 غرام، 6 مللي) وأوكتاديسيل  $C_{18EC}$  (مغطاة الأطراف: 2 غرام، 6 مللي) لاستخراج المركبات الفينولية من زيت الزيتون

في العمود إلى جانب مذيب لا قطبي كوسط حامل، بينما تستخدم الثانية طورًا ساكنًا مرتبط بأوكتاديسايلين لا قطبي (C18) ومذيب قطبي كطور متحرك. وورد أن الكروماتوغرافيا السائلة في الطور العكسي هي التقنية الأكثر استخدامًا نظرًا لأنها تتسم بتناجبية وفصل للمركبات القطبية بشكل أفضل (Carrasco-Pancorbo and Cerretani et al., 2005; Laura Capriotti and Cavaliere et al., 2014). وتستخدم مجموعة كبيرة من الأعمدة في هذه التقنية. والأعمدة المفضلة هي: بطول 100-250 مم، وقطر داخلي 2 - 4.6 مم، وحجم جسيمات 1.8-5 ميكرومتر (Selvaggi et al., 2013; Taamalli and Abaza et al., 2006). وجرى تطوير طريقة الاستخلاص (الإمرار) المتمثل لفصل المركبات الفينولية وتم التوصل إلى عملية فصل ملائمة باستخدام تركيبة مناسبة من الطور المتحرك (Akasbi and Shoeman et al., 1993). ومع ذلك، فإن الدراسات الحديثة تستخدم حصرًا أسلوب الاستخلاص (الإمرار) المتدرج. ويؤكد هذا الواقع على تعقيد المركبات الفينولية التي لا يمكن فصلها بشكل صحيح بطريقة الاستخلاص المتماثل. وقد استخدمت أطوار متحركة عديدة، ولكن الأنظمة الثنائية المؤلفة من الماء ومذيب عضوي أقل قطبية، مثل الأسيتونتريل أو الميثانول، ما تزال شائعة (Bakhouché and Lozano-Sánchez et al., 2015; De la Torre-Carbot and Jauregui et al., 2005). وعادة ما يتم إضافة أحماض مثل حمض الخليك والفورميك وحمض البيركلوريك إلى الماء للحفاظ على تركيز حمضي ثابت أثناء عمليات التحليل المتدرج (Bayram and Esatbeyoglu et al., 2012; De la Torre-Carbot and Jauregui et al., 2005; Taamalli and Abaza et al., 2013). وقد ساعد خفض درجة الحموضة إلى تحسين عملية الفصل جزئيًا. ومع هذا ما يزال عدم الفصل بين القمم ووقت التحليل الطويل من العيوب الرئيسية لتقنية الكروماتوغرافيا السائلة. وفي الواقع، تطلب فصل المركبات الفينولية المعقدة في زيت الزيتون البكر أوقات تحليل أطول باستخدام الطرائق التقليدية للكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء. هذا غير أن تطوير أعمدة بأحجام جسيمات صغيرة في الطور الساكن أدى إلى تعزيز عملية الفصل وتقليل وقت التحليل. والضغط العالية الناتجة عن استخدام أحجام جسيمات صغيرة جعلت من الضروري تطوير معدات جديدة مثل الكروماتوغرافيا السائلة سريعة الانحلال (RRLC) والكروماتوغرافيا السائلة فائقة الأداء (UPLC) لدعم الضغوط العالية. وتم الإبلاغ عن استخدام العمود الجديد لفصل المركبات الفينولية في زيت الزيتون البكر، جنبًا إلى جنب مع تحسين التدرج ودرجة الحرارة ومعدل التدفق في المؤلفات

(Valenzuela et al., 2012). وورد أنه يجري عادة استخدام 500 ملغ مع تقنية استخراج الطور الصلب على النطاق الصغير و1 غرام على النطاق الكبير (Laura Capriotti and Cavaliere et al., 2014).

وأجريت أيضًا مقارنات بين كل من تقنيتي الاستخراج - استخراج الطور الصلب واستخراج سائل-سائل - وأدت إلى نشر بيانات مثيرة للجدل. ففي حين أظهرت العديد من الدراسات المقارنة أن تقنية استخراج سائل-سائل تحقق نسبة استرداد أعلى من تقنية استخراج الطور الصلب (Bendini and Bonoli et al., 2004; Hrnčirik and Fritsche, 2004)، رأى باحثون آخرون أن تقنية استخراج الطور الصلب تعتبر طريقة مرجعية لاستخراج المركبات الفينولية من زيت الزيتون البكر بدلاً من تقنية استخراج سائل-سائل بسبب سهولة استخدامها واستغراقها لوقت قصير في عملية الاستخراج (Gómez-Caravaca and Carrasco Pancorbo et al., 2000; Pirisi and Cabras et al., 2005). ومع هذا، فقد أفاد بحث آخر أن طريقة استخراج الطور الصلب تنطوي على مشكلة بسبب أسلوبها الانتقائي تجاه الفينولات الفردية، ولا سيما فينولات الأجليكون (Hrnčirik and Fritsche, 2004). وعلاوة على ذلك، فعند دراسة آثار الاحتفاظ للمركبات الفينولية المؤكسدة أثناء الاستخراج التحليلي للمركبات الفينولية في زيت الزيتون البكر، توصل الباحثون إلى استنتاج مفاده أن تقنية استخراج الطور الصلب تبدو فعالة فقط مع زيت الزيتون البكر الطازج لأنه في حالة زيت الزيتون البكر المؤكسد، فإن الطور/الوسيط الساكن لأعمدة استخراج الطور الصلب يتفاعل مع الفينولات المؤكسدة. وهذا التفاعل من شأنه أن يؤدي إلى مزيد من الاحتفاظ غير الانتقائي بالمركبات الفينولية غير المؤكسدة، وبالتالي تقليل الاسترداد التام لهذه الحلائل (Armaforte and Mancebo-Campos et al., 2007).

## تقنيات الفصل لتحليل المركبات الفينولية في زيت الزيتون البكر

الكروماتوغرافيا السائلة

تعتبر الكروماتوغرافيا السائلة (LC) الأسلوب الأكثر شيوعًا وموثوقية لفصل المركبات الفينولية. وجاء ذكر الكروماتوغرافيا السائلة في الطور العادي والطور العكسي في المؤلفات الواردة في هذا المجال. وتستخدم التقنية الأولى جل السيليكات كطور ساكن

تحمل اسم "الاشتقاق" يتم فيها تحويل المركبات الفينولية إلى مركبات أكثر تطايراً باستخدام كواشف مختلفة. وثمة العديد من طرائق الاشتقاق، على الرغم من أن أسلوب الاشتقاق باستخدام ثلاثي ميثيل سيليل هو الأكثر شيوعاً (Angerosa and D'Alessandro et al., 1996; Zafra-Gómez and Luzón-Toro et al., 2010).

وفي دراسة حديثة، جرى تحسين خطوة الاشتقاق بعناية من خلال مقارنة الكواشف المختلفة واختبار كفاءتها في كل من المحاليل القياسية والعينات الحقيقية. وتم في البداية تحسين خطوة الاشتقاق في خليط من محلول قياسي من التايروسول والهيدروكسي تايروسول، وذلك باستخدام ن،-أمكر (ثلاثي ميثيل سيليل) ثلاثي فلورو أسيتاميد (BSTFA)، ون،-أمكر (ثلاثي ميثيل سيليل) ثلاثي فلورو أسيتاميد + ثلاثي ميثيل كلوروسيلان (TMCS + BSTFA)، ون،-أمكر (ثلاثي ميثيل سيليل) ثلاثي ميثيل كلوروسيلان (TMCS + BSA)، وثلاثي بوتيل داي ميثيل سيلان (TBDMSCI) ككواشف اشتقاق. وتمت مقارنة البيريدين والأسيتونتريل كمذيبات تفاعل. وعلى الرغم من النتائج الجيدة التي تحققت باستخدام ن،-أمكر (ثلاثي ميثيل سيليل) ثلاثي فلورو أسيتاميد (BSTFA)، ون،-أمكر (ثلاثي ميثيل سيليل) ثلاثي فلورو أسيتاميد + ثلاثي ميثيل كلوروسيلان (TMCS + BSTFA)، إلا أن خليط ن،-أمكر (ثلاثي ميثيل سيليل) ثلاثي ميثيل كلوروسيلان (TMCS + BSA) أظهر أفضل كفاءة. ومع ذلك، وقع الاختيار على ن،-أمكر (ثلاثي ميثيل سيليل) ثلاثي فلورو أسيتاميد BSTFA لتحليل المركبات الفينولية في عينات زيت الزيتون البكر لتجنب حقن ثلاثي ميثيل كلوروسيلان TMCS، والذي يمكن أن يقلل من فترة حياة العمود (Purcaro and Codony et al., 2014).

وأشارت المؤلفات في هذا المجال إلى وجود عدة محاولات لتحسين الفصل الجيد باستخدام الكروماتوغرافيا الغازية في تحليل المركبات الفينولية. وتستخدم طرائق الكروماتوغرافيا الغازية أعمدة مختلفة، وبرامج تنظيم درجة حرارة الفرن، ودرجات حرارة الحقن، وأوضاع الحقن، وكميات حقن المستخرج (Angerosa and D'Alessandro et al., 1996; García-Villalba and Pacchiarotta et al., 2011; Ríos and Gil et al., 2005). وفي جميع الطرائق المذكورة تقريباً، استخدم الهيليوم كغاز حامل بسرعة خطية. وبجانب جودة الفصل، تم التوصل إلى أوقات تحليل أقصر أو أطول في الطرائق المنشورة اعتماداً على معايير التحليل المذكورة أعلاه. غير أن الحاجة إلى إجراء عملية الاشتقاق تجعل من هذه التقنية أكثر إجهاداً.

الواردة في هذا المجال. وفي دراسة حديثة، جرى تحسين طريقة جديدة للكروماتوغرافيا السائلة سريعة الانحلال (عمود Zorbax C18: 4.6 مم × 150 مم و1.8 ميكرومتر حجم الجسيمات) على أساس الظروف الكروماتوغرافية لأسلوب الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (عمود Gemini C18: 3 مم × 250 مم، و5 ميكرومتر حجم الجسيمات). أولاً، تم تحسين طريقة الاستخلاص المتدرج باستخدام الماء + 0.5% من حمض الخليك كطور متحرك "أ"، والأسيتونتريل كطور متحرك "ب". وفي الخطوة التالية، جرى اختبار معدل التدفق وقيم درجة الحرارة التي تراوحت بين 0.5 و2 مل/دقيقة و25 درجة مئوية إلى 40 درجة مئوية، على التوالي. أظهرت النتائج أن زيادة التدفق ودرجة الحرارة أدى إلى تقصير وقت التحليل دون التأثير بشكل مفرط على عملية الفصل، ولكن درجات الحرارة الأعلى من 40 درجة مئوية أدت إلى تداخل بعض القمم وفقدان المركبات. وأخيراً، تم اختيار تدفقاً أمثل بمقدار 1.5 مل/دقيقة ودرجة حرارة 30 درجة مئوية للتحليل. ومع الطريقة المحسنة، أمكن تقليل وقت التحليل من 60 دقيقة (الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء) إلى 20 دقيقة (الكروماتوغرافيا السائلة سريعة الانحلال)، وتم الحصول على فصل جيد باستخدام عمود بحجم جسيمات صغيرة (García-Villalba and Carrasco-Pancorbo et al., 2010). وفي دراسة أكثر حداثة، تم الحصول على فصل كروماتوغرافي أمثل مع نفس المعدات (الكروماتوغرافيا السائلة سريعة الانحلال) باستخدام الماء + 0.25% حامض الخليك كطور متحرك "أ" والميثانول كطور متحرك "ب". وكانت درجة الحرارة ومعدل التدفق بالاختبار 25 درجة مئوية و0.8 مل/دقيقة، على التوالي. وبتطبيق كل هذه الشروط، تم فصل المركبات الفينولية بشكل صحيح في 27 دقيقة فقط (Lozano-Sánchez and Segura-Carretero et al., 2010).

#### الكروماتوغرافيا الغازية

منذ اختراع تقنية الكروماتوغرافيا الغازية، وخاصة عندما تم إدخال العمود الشعري المزود بسيليكا منصهرة فيها، أصبحت واحدة من التقنيات الأكثر فعالية في الكيمياء التحليلية نظراً للتحسن الملحوظ في جودة الفصل (Carrasco-Pancorbo and Nevedomskaya et al., 2009). وقد استُخدمت تقنية الكروماتوغرافيا الغازية لإجراء عمليات التحديد الكمية والنوعية للمركبات الفينولية في زيت الزيتون البكر (García-Villalba and Pacchiarotta et al., 2011; Saitta and Curto et al., 2002). بيد أن استخدامها قد شهد انحصاراً نظراً للتطبيقات المحدود للعديد من المركبات الفينولية. وللتغلب على هذه المشكلة، يتطلب التحليل إجراء خطوة تمهيدية

وعلاوة على ذلك، فإن عملية الاشتقاق غير المكتملة قد يصحبها تكون العديد من الأنواع الكيميائية من نفس المركب، مما يعطي نتائجاً مربكة. وثمة عيب آخر لهذه التقنية يتمثل في استخدام درجات حرارة عالية مما يمكن أن يُتلف الحلائل (Carrasco-Pancorbo and Cerretani et al., 2005).

الرحلان الكهربائي الشعري  
في السنوات الأخيرة، أثبتت تقنية الرحلان الكهربائي الشعري (CE) أنها تقنية سريعة تجمع بين أوقات التحليل القصيرة وكفاءة الفصل العالية لتحليل مكونات الغذاء. وقد جرى استخدامها على وجه الخصوص لتحليل المركبات الفينولية في زيت الزيتون البكر طرائق رحلان كهربائي مختلفة بهدف التوصل لأفضل ظروف الفصل لإجراء التحليل في أقصر وقت بجودة فصل كافية. وتمثلت معايير التحسين النموذجية في العنصر المنظم (النوع والتركيز ودرجة الحموضة)، ودرجة الحرارة الشعيرية، والفلطية، والقطر الشعري الفعال، ونوع حقن العينة. وكانت الطرائق المحسنة الأولى مجهدة بسبب الحاجة لإجراء تحسين فردي لجميع المعايير المذكورة أعلاه (Bonoli and Montanucci et al., 2003; Carrasco-Pancorbo and Gómez-Caravaca et al., 2006a; Gómez-Caravaca and Carrasco et al., 2005). لكن في الآونة الأخيرة أدى استخدام طرائق متعددة المعايير، والتي تأخذ في الاعتبار جميع عمليات الفصل الحرجة في وقت واحد، إلى جعل تطوير طرائق رحلان كهربائي جديدة أمراً سهلاً وسريعاً (Ballus and Meinhart et al., 2011; Ballus and Meinhart et al., 2014). وإضافة إلى ذلك، فمن أجل تقليل عدد الخطوات المتبعة في تحليل المركبات الفينولية باستخدام الرحلان الكهربائي الشعري، فقد تم الإبلاغ عن استخدام تقنية جديدة تسمى الرحلان الكهربائي الشعري اللا مائي (NACE). وتتمثل ميزته الرئيسية بالمقارنة مع التقنية التقليدية في قدرتها على العمل مع مجموعة كبيرة ومتنوعة من المذيبات العضوية (الميثانول والإيثانول و-1 بروبانول، و-2 بروبانول، والأسيتونتريل، وغيرها). وكما هو معلوم، غالباً ما تكون هناك حاجة لتقنية استخراج سائل-سائل أو استخراج الطور الصلب للتوصل إلى التركيز القلبي للمذيبات العضوية قبل تحليل مجموعات المواد المعقدة. وبعد التوصل للتركيز القلبي، تخفف الحلائل المعنية عادة في مذيب عضوي. وفي تقنية الرحلان الكهربائي الشعري المائي، عادة ما يجري تبخير المستخلص وحل الحلائل في وسائط مائية. ومع ذلك، يمكن تجاوز هذه الخطوة عند استخدام تقنية الرحلان الكهربائي الشعري اللا مائي (Godoy-Caballero and Acedo-

## الكواشف

يتم تحديد المركبات الفينولية عادة باستخدام كواشف الأشعة المرئية وفوق البنفسجية UV/VIS وكواشف الصمام الثنائي DAD، خاصة المقرونة بتقنية الكروماتوغرافيا السائلة والرحلان الكهربائي الشعري. وفي الدراسات الفينولية في تقنية الكروماتوغرافيا السائلة، يفيد استخدام 280 نانومتر لإجراء تحليل روتيني نظراً لأن معظم المركبات الفينولية في زيت الزيتون البكر تمتص عند هذا الطول الموجي، في حين يُستخدم 240 نانومتر لبعض السيکوريدويد ومشتقاتها، و310-320 نانومتر لأحماض حمض هيدروكسي سيناميك، و350 نانومتر للفلافونات (Bakhouche and Lozano-Sánchez et al., 2013; Garcia and Coelho et al., 2013; Godoy-Caballero and Acedo-Valenzuela et al., 2012a). وفي طريقة تحليل المركبات الفينولية الرسمية الصادرة عن المجلس الدولي للزيتون، تُستخدم الأشعة المرئية وفوق البنفسجية للكشف. وتحدد الطريقة القيم الامتصاصية القصوى لعدد 27 من المركبات الفينولية المختلفة وتقدم إجراءً للتقدير الكمي لهذه الحلائل على أساس البيانات التي يقدمها كشاف الأشعة فوق البنفسجية (المجلس الدولي للزيتون 2009). كما تُستخدم كواشف الأشعة فوق البنفسجية لدراسة تباين المحتوى الفينولي في زيت الزيتون البكر تحت تأثير مختلف العوامل الزراعية والتكنولوجية (Gómez-Rico and Salvador et al., 2006; Parenti and Spugnoli et al., 2008). وفيما يتعلق بتحليل الرحلان الكهربائي الشعري، تذكر المؤلفات في هذا المجال أيضاً الأداء الخاص بكشف الأشعة فوق البنفسجية عند استخدام 200 و240 و280 و330 نانومتر

واقتران الكروماتوغرافيا السائلة أو الكروماتوغرافيا الغازية أو الرحلان الكهربائي الشعري بكشاف قياس الطيف الكتلي سمح بالتوصل لتوصيف مفصل للجزء الفينولي في الدراسات المختلفة التي أجريت على جودة زيت الزيتون البكر (Bengana and Bakhouché et al., 2013; Carrasco-Pancorbo and Arráez-Román et al., 2006b; Saitta and Curto et al., 2002). فضلاً عن ذلك، يتيح استخدام كشاف قياس الطيف الكتلي بفحص العلاقة بين الطبيعة الكيميائية أو تركيز المركبات الفينولية الفردية في زيت الزيتون البكر وقدرتها على الحد من بعض الأمراض المزمنة (García-Villalba and Carrasco-Pancorbo et al., 2010). كما تم الإبلاغ عن كواشف أخرى مثل الكواشف الفلورية وكواشف الرنين المغناطيسي النووي (Etrakis and Giomyrgianaki et al., 2008; Tena and García-González et al., 2009)؛ غير أنها ليست شائعة بنفس قدر كواشف الأشعة فوق البنفسجية وقياس الطيف الكتلي.

## المشاكل التحليلية لتوصيف المركبات الفينولية في زيت الزيتون البكر

في جميع الدراسات التي تهدف إلى التقدير الكمي للمركبات الفينولية في زيت الزيتون البكر، تركز اهتمام الباحثين على التوصل إلى الاسترداد التام لهذه الحلائل من المصفوفة. وفي البداية، تم استخدام مزيج من الأصناف العيارية التجارية المخلوطة في زيت الفول السوداني المكرر بهدف مقارنة كفاءة الاسترداد لتقنيات الفصل المختلفة. وجرى بعد ذلك إخضاع الزيت المخلوطة إلى نظم استخراج مختلفة (استخراج سائل-سائل واستخراج الطور الصلب). وتم تحليل المستخلصات الناتجة بواسطة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء، وتمت مقارنة مقدار كل صنف عياري مع ذلك الخاص بالخليط العياري الذي لم يخضع لأي إجراء استخراج (Bendini and Bonoli et al., 2003). إلا أنه عند النظر في النتائج التي تم التوصل إليها، ينبغي الأخذ في الاعتبار أن معظم المركبات الفينولية التي تحدث بشكل طبيعي في زيت الزيتون ليست متاحة تجارياً. ونتيجة لذلك، استمر البحث على أساس المركبات الأخرى التي لديها بنى مماثلة. ويمكن أن تختلف استجابة الأصناف العيارية عن استجابة الحلائل الموجودة في عينات الزيوت؛ ومن هنا، يمكن أن تكون نتائج الاسترداد عبارة عن تقديرات فحسب. وللتغلب على هذه المشكلة، اقترح باحثون آخرون طريقة استخراج تعتمد على مزج زيت عباد الشمس المكرر (الخالي من المركبات الفينولية) مع جرة

لتوصيف المجموعات الفينولية المختلفة في زيت الزيتون البكر، وذلك على الرغم من أن كشف الصمام الثنائي كان يُستخدم في نطاق يتراوح من 600-190 نانومتر للوصول إلى البيانات الطيفية (Carrasco-Pancorbo and Gómez-Caravaca et al., 2006a). وفي دراسات أكثر حداثة، تم استخدام الرحلان الكهربائي الشعري مقروناً مع كشاف الأشعة فوق البنفسجية لتطوير طريقة رحلان كهربائي جديدة لفصل المركبات الفينولية من زيت الزيتون البكر، وذلك لمقارنة نظم الاستخراج المختلفة من حيث استرداد المركبات الفينولية ودراسة التركيب الفينولي لزيت الزيتون البكر الذي تم الحصول عليه من أصناف الزيتون المختلفة (Ballus and Meinhart et al., 2014; Godoy-Caballero and Galeano-Díaz et al., 2012c; Gómez-Caravaca and Carrasco-Pancorbo et al., 2005).

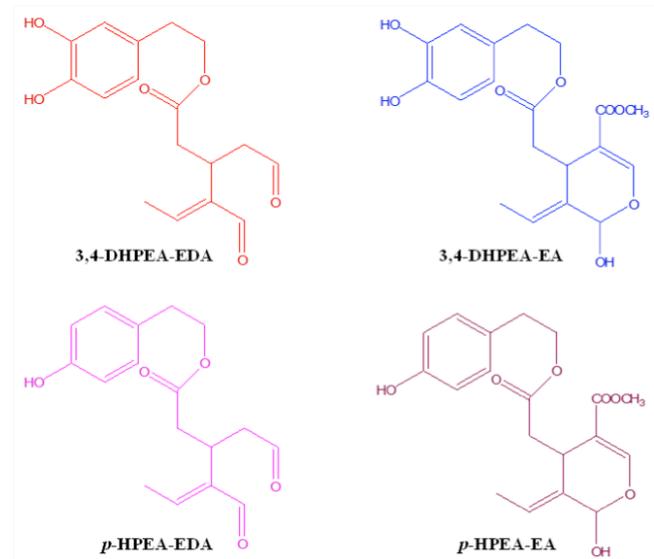
في الكروماتوغرافيا الغازية، يعتبر كشاف تأين اللهب (FID) الأكثر شيوعاً مع تقنية الفصل هذه. وفي الواقع، جرى استخدام كشاف تأين اللهب في الكروماتوغرافيا الغازية لتحليل المكونات الفينولية للزيوت المختلفة، بما في ذلك زيت الزيتون البكر. والطريقة المقترحة لهذا الغرض جعلت بالإمكان تقدير المحتوى الفينولي لزيت دوار الشمس، زيت الشلجم، وزيت الزيتون البكر (Farajzadeh and Yadeghari et al., 2014). وقد استخدم الباحثون الآخرون كشاف تأين اللهب في الكروماتوغرافيا الغازية لتحليل المحتوى الكلي للهيدروكسيتايروسول والتايروسول لزيت الزيتون البكر الممتاز بعد التحلل المائي للأشكال المرتبطة (Purcaro and Codony et al., 2014).

استخدمت مؤخراً كواشف قياس الطيف الكتلي مقترنة بتقنيات فصل مختلفة للتوصل لمزيد من التوصيف للمركبات الفينولية في زيت الزيتون البكر. وتعتبر كواشف القياس الطيفي لزمن الطيران (TOF-MS)، وزمن الطيران رباعي الأقطاب (QTOF-MS)، ومصيدة الأيونات (IT-MS) هي الأنواع الأكثر شيوعاً في المؤلفات الواردة في هذا المجال (Bakhouché and Lozano-Sánchez et al., 2014b; Fu and Segura-Carretero et al., 2009; Laura Capriotti and Cavaliere et al., 2014). وبصرف النظر عن الحصول على البيانات بسرعة والنطاق الواسع للكشف الكتلي، ثمة سمة هامة أخرى لكشاف قياس الطيف الكتلي تتمثل في دقته الكبيرة في قياسات الكتلة. ويوفر انتقائية عالية في تحديد المركبات الفينولية باستخدام وضع المخطط الكروماتوغرافي للأيونات المستخلصة (EIC) عندما تكون هناك قمم متداخلة، كما يسمح بالتأكيد السريع والفعال للتركيب العنصري للأيونات عند إجراء التجزئة.

الزيتون البكر (Gómez-Caravaca and Cerretani et al., 2007). وفي هذا البحث، استخدمت تقنية استخراج سائل-سائل لاستخراج المركبات الفينولية. وأظهرت النتائج التي توصل إليها الباحثون أن المركبات التي تنتمي لمجموعة السيكوريدويد، مثل ليجستروسيد أجليكون *ligstroside aglycone* وأوليوروبين أجليكون *oleuropein aglycone*، قد زادت بشكل ملحوظ بعد خفض المحتوى المائي عن طريق الترشيح باستخدام القطن مقارنة بزيت الزيتون البكر غير المرشح. وفي واقع الأمر، تستقر المركبات الفينولية في مستحلب "الماء في الزيت" حول قطرات الماء، وينخفض اتحاد المركبات الفينولية المراد استخراجها باستخدام المذيبات في مصفوفة أكثر قطبية (زيت الزيتون ذو المحتوى العالي من الماء)، مما يجعل عملية استردادها أكثر صعوبة. ومع ذلك، فإن التخلص الجزئي من المياه أثناء عملية الترشيح يتيح استخراج المزيد من المركبات الفينولية مع خليط المذيبات اللا قطبي، مما يؤدي إلى الزيادة الواضحة في تركيزها في زيت الزيتون البكر المرشح. وبعد خمس سنوات، تم التأكيد على تأثير محتوى الماء على استخراج المركبات الفينولية من عينات زيت الزيتون البكر باستخدام استخراج الطور الصلب (Lozano-Sánchez and Cerretani et al., 2012). ومن خلال العمل على نطاق وحدة صناعية تجريبية باستخدام أكياس الترشيح، اكتشف الباحثون أن السيكوريدويد في زيت الزيتون البكر المرشح كانت مسؤولة عن الزيادة الواضحة في المحتوى الفينولي الكلي. وأخيراً، تم التأكيد في دراسة أكثر حداثة على الزيادة الواضحة في مركبات مختلفة من مجموعة السيكوريدويد بسبب الاختلاف في محتوى الماء في زيت الزيتون البكر (Bakhouche and Lozano-Sánchez et al., 2014a). وتظهر في الشكل 1 البنى الكيميائية للمركبات الأساسية التي تآثر معدل استردادها نتيجة الاختلاف في محتوى الماء لزيت الزيتون البكر.

وأكدت هذه الدراسات على تأثير الاختلاف الناتج عن الترشيح في المحتوى المائي لزيت الزيتون البكر على استخراج المركبات الفينولية. إلا أنه من المعروف أن المحتوى المائي في زيت الزيتون البكر يختلف أيضاً وفقاً لمرحلة نضج الثمار، وأنواع الزيتون، والمنطقة الجغرافية (Motilva and Tovar et al., 2000; Taamalli and Gómez-Caravaca et al., 2010). وقد استخدمت العديد من الدراسات المركبات الفينولية كبصمة للتمييز بين أصناف الزيتون وكذلك لتصنيف زيوت الزيتون البكر وفقاً للمنشأ الجغرافي (اسم المنشأ)، ولتحديد أفضل فترة حصاد للحصول على زيت زيتون بكر ذي محتوى فينولي عالي، في حين أجريت دراسات أخرى على النشاط

مماثلة من مستخلص فينولي من زيت الزيتون البكر مجهز بتقنية استخراج سائل-سائل. وتم استخراج الزيت المخلوط باستخدام تقنية استخراج الطور الصلب، وتم حساب كفاءة الاسترداد به (Gómez-Caravaca and Carrasco Pancorbo et al., 2005). وقدم هذا النهج حلاً جزئياً لتقدير معدل الاسترداد للمركبات الفينولية من زيت الزيتون البكر. والمحاولات السابقة التي جرى فيها مقارنة نظم الاستخراج المختلفة من حيث كفاءة الاسترداد لم تنظر في التفاعلات بين كل من المصفوفة والمركبات المستهدفة. وفي الواقع، ينبغي الأخذ في الاعتبار تأثير المحتوى



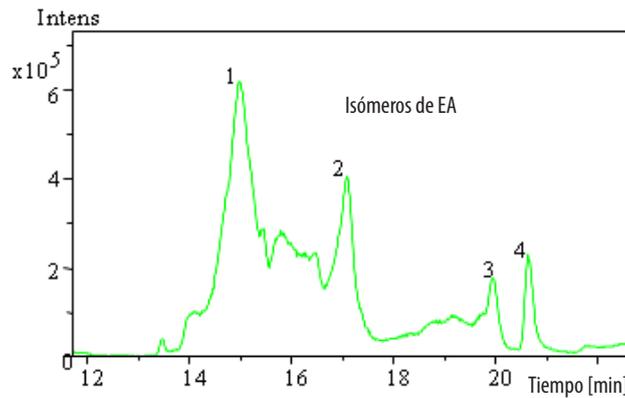
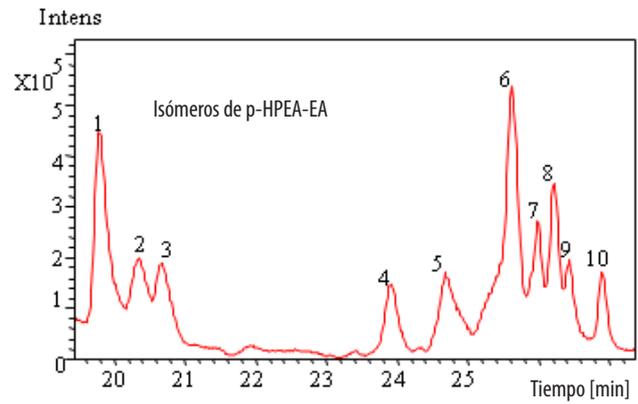
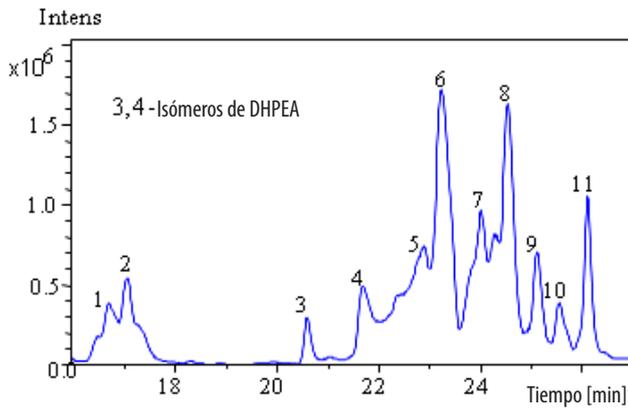
الشكل رقم 1. بنية بعض المركبات الفينولية التي تآثرت بالاختلاف في المحتوى المائي في زيت الزيتون البكر خلال عملية الاستخراج: 3,4-DHPEA-EDA, decarboxymethyl oleuropein aglycone; 3,4-DHPEA-EA, oleuropein aglycone; p-HPEA-EDA, decarboxymethyl ligstroside aglycone; p-HPEA-EA, ligstroside aglycone

المائي في زيت الزيتون البكر على استخراج المركبات الفينولية في كلا النظامين (استخراج سائل-سائل واستخراج الطور الصلب). وقد كشفت العديد من الدراسات العلاقة بين المحتوى المائي والمركبات الفينولية. ومن المعروف أن زيت الزيتون يحتوي على كمية صغيرة من المياه؛ ولهذا السبب يمكن اعتباره مستحلب ماء في زيت. وتقع المركبات الفينولية في السطح البيني للماء/الزيت (Ambrosone and Cinelli et al., 2006; Frankel and Huang et al., 1994).

لوحظ تأثير محتوى الماء على استخراج المركبات الفينولية من زيت الزيتون البكر لأول مرة على نطاق المختبر من خلال دراسة تأثير نظام الترشيح على المحتوى الفينولي في زيت

نسبة استرداد المركبات الفينولية باستخدام معيار داخلي أثناء عملية الاستخراج. ونتيجة لذلك، تم تصحيح زيادة السيكوريدويد الواضحة كما تم تقدير كمية المركبات الفينولية بشكل صحيح في زيت الزيتون البكر المرشح (Bakhouche and Lozano-Sánchez et al., 2014b). بيد أن تحسين الطريقة المقترحة استند فقط على تغير محتوى الرطوبة في زيت الزيتون البكر بعد الترشيح. وتبعاً لذلك، تسعى البحوث المستقبلية إلى تطوير طريقة استخراج جديدة يمكن تطبيقها على جميع أنواع دراسات زيت الزيتون البكر المتعلقة بالجزء الفينولي والمحتوى المائي. وحتى ذلك الحين، فإن استخراج المركبات الفينولية من زيت الزيتون البكر سيظل يمثل مشكلة. وكما هو معلوم جيداً، فبعد فصل المركبات الفينولية من زيت

الحيوي للمركبات الفينولية في زيت الزيتون البكر (García-Villalba and Carrasco-Pancorbo et al., 2010; Karkoula and Skantzari et al., 2012; Ouni and Taamalli et al., 2011; Rotondi and Bendini et al., 2004; Taamalli and Gómez-Caravaca et al., 2010). ولسوء الحظ، ففي جميع هذه الدراسات، لم يتم الأخذ في الاعتبار التباين في المحتوى المائي في زيت الزيتون البكر أثناء عملية استخراج المحتوى الفينولي. ويمكن لهذا الأمر أن يؤثر على دقة البيانات الواردة في المنشورات المتعلقة بتركيز هذه الحلائل في زيت الزيتون البكر. ومؤخراً، في محاولة لحل هذه المشكلة، تم تطوير نهج جديد لتصحيح التأثير الذي يمارسه انخفاض الرطوبة بعد ترشيح زيت الزيتون البكر على



**الشكل 2.** أيزومرات أوليوروبين أجليكون (3,4-DHPEA-EA)، وليجستروسيد أجليكون (p-HPEA-EA) وحمض إينوليك (EA) التي تم الحصول عليها باستخدام HPLC-ESI-TOF/MS

العلمي. وحددت البحوث الأولى أحد عشر أيزومراً في مركب أوليوروبين أجليكون oleuropein aglycone في زيت الزيتون البكر الإسباني (Fu and Segura-Carretero et al., 2009). باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة سريعة الانحلال (RRLC) بجانب قياس الطيف الكتلي الترادفي الكهرومغناطيسي لوقت الطيران ومصيدة الأيونات. وفي دراسة أكثر حداثة، تم الكشف عن 17 و 9 أيزومر في أوليوروبين أجليكون وليجستروسيد أجليكون وحمض إينوليك، على التوالي، وذلك باستخدام الكروماتوغرافيا في الطور العكسي منصهرة

الزيتون البكر، يتمثل التحدي التالي في وضع طريقة يمكن التحويل عليها لتحليل المستخلصات الناتجة. ورغم أنه قد جرى تطوير طرائق ومعدات تحليلية قوية، فإن التوصيف البنوي الكلي للجزء الفينولي ما يزال مستحيلاً في بعض الأحيان بسبب تعقيد المجموعة الكبيرة من السيكوريدويد. وتتضمن المركبات الرئيسية التي تم تحديدها في هذه المجموعة: أوليوروبين أجليكون وليجستروسيد أجليكون ومشتقاتهما مثل الأشكال الهيدروكسيلية، والديكاربوكسيميثيلية، والمجففة، والممثلة. وحالياً، تعتبر الأيزومرات في هذه المركبات موضوع البحث

في زيت الزيتون البكر على فصل المركبات الفينولية، والتشكيل الاصطناعي لبعض الأيزومرات خلال الفصل الكروماتوغرافي بسبب الطور المتحرك المستخدم.

## شكر وتقدير

نشعر بالامتنان تجاه وزارة الاقتصاد والقدرة التنافسية الإسبانية (مشروع BFU2014-52433-C3-2-R)، ومجلس الحكومة الأندلسية الإقليمي للابتكار والعلوم (P11-CTS-7625)، وجامعة غرناطة، ومركز بحوث وتطوير الغذاء الوظيفي FFRDC، والمجلس الدولي للزيتون لتقديم منحة دراسية لطالب الدكتوراه.

## المراجع

- Akasbi, M., Shoeman, D. M. y 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.
- Bakhouche, 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.
- Bakhouche, A., Lozano-Sánchez, J., Ballus, C. A., Martínez-García, M., Velasco, G. M., Govantes, Á. O., Ga-

النواة جنبًا إلى جنب مع إلى ارتفاع الفرار الطيف الكتلي (HRMS) وعالية الدقة جنبًا إلى جنب قياس الطيف الكتلي عالي الانحلال (HRMS) وقياس الطيف الكتلي التراذي عالي الانحلال (HRMS/MS) في أوضاع التأين الكهرومرذاذي الموجبة والسالبة (Vichi and Cortés-Francisco et al., 2013). واعتبرت هذه الأيزومرات أنها نتيجة تزامر الأوليوروبايين oleuropein وليجستروسيد ligstroside بعد التحلل المائي أثناء نضج الزيتون وتصنيع زيت الزيتون. بيد أن، دراسة باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء بالأشعة فوق البنفسجية مع أعمدة الطور المعكوس أظهرت أن أيزومرات الديكاربوكسيميثيل ليجستروسيد أجليكون decarboxymethyl الديكاربوكسيميثيل أجليكون ligstroside aglycone والديكاربوكسيميثيل أوليوروبايين أجليكون decarboxymethyl oleuropein aglycone تشكلت من خلال تفاعل هذين المركبين مع الماء أو الميثانول المستخدم كطور متحرك (Karkoula and Skantzari et al., 2012). وإضافة إلى ذلك، ففي دراسة حديثة، أثبت نفس الباحثون التكوين الاصطناعي لأيزومرات أوليوروبايين وليجستروسيد أجليكون (Karkoula and Skantzari et al., 2014). ولذلك، يمكن أيضًا تكوين الأيزومرات خلال التحليل الكروماتوغرافي اعتمادًا على الطور المتحرك المستخدم. وأكدت هذه النتيجة أن القياس الكروماتوغرافي الكلاسيكي لهذه المركبات يمثل مشكلة، خاصة في الوسائط المائية، وأن العديد من القياسات السابقة المذكورة في المؤلفات الواردة في هذا المجال تعتبر محل شك. وينبغي الأخذ في الاعتبار أن الطرائق المثبتة والرسمية المقترحة من قبل العديد من الباحثين واللجان الدولية تستخدم المياه كوسيط حامل في الطور المتحرك. ويمكن لهذا الأمر أن يؤثر على النتائج بسبب التفاعل بين الماء وبعض المركبات الفينولية، الأمر الذي يلقي بظلال الشك على تقدير هذا الجزء، كما هو مبين، على سبيل المثال، في الشكل 2 المتعلق بالأيزومرات الرئيسية المكتشفة في زيت الزيتون البكر.

## الاستنتاجات

قدمت الطرائق المختلفة لعزل المركبات الفينولية وفصلها حلولاً للعديد من المشاكل المتعلقة بتقدير هذا الجزء في زيت الزيتون البكر. وبعد إتمام ذلك، تم إثبات القيمة الغذائية والخصائص الصحية لزيت الزيتون البكر بسهولة. هذا بيد أن بعض جوانب الطرائق المذكورة تحتاج إلى تحسين. على سبيل المثال، تجعل البيانات المثيرة للجدل الواردة في المؤلفات من الصعب مقارنة زيوت الزيتون البكر المنتجة في بقاع مختلفة من العالم من حيث المحتوى الفينولي بها. وبالتالي هناك ما يبرر إجراء بحوث جديدة لايتكار طرائق دقيقة ومتسقة تهدف إلى تجنب الارتباك عند مقارنة البيانات المنشورة المختلفة. وتحتاج التحسينات المطلوبة إلى أن تضع في الاعتبار المشاكل الحالية، وخاصة تأثير محتوى الماء

- 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-Ravento, 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 <sup>1</sup>H and <sup>31</sup>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.
- llina-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.
- Bakhouché, 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.
- Bakhouché, 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., Meinhart, 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., Bakhouché, 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 Chemlall 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.

- 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 Lercer, 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.
- Hrnčirik, 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 chromatography-mass spectrometry for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* 49: 1114–1121.
- 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

- nol. 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 Monterdero, 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.
- matographic 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-Ferraro, 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., Rı, 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 resolutive 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. Tech-*

## تباين المؤهلات الزراعية في مجموعة زيتون (*Olea europaea* L) لصنف زيتون الزيت المحلي "شمال ليفافس"

• بنعمارف\*، مزغني عياشيم، يانقيع، بلغيثح، هرابس، هيرقليم، ك

معهد الزيتون، طريق المطار، الكيلو 1.5 - ص.ب. 1087 - 3000 صفاقس (تونس)

\* للمراسلة: iresa.agrinet.tnbenamarfathi@

### ملخص

أظهرت دراسة الثوابت الزراعية الخاصة بمجموع الهجائن من صنف الزيتون المحلي شمال ليفافس وجود تباين كبير بها. يضم المجمع 145 هجيناً من شمال ليفافس، مع أصول متعددة محلية وأجنبية، وبشكل خاص مع الصنف كوراتينا (90 هجينا) الإيطالي. تراوح الإنتاج السنوي للزيتون في هذا المجمع ما بين 1.9 كغ في 2010 إلى 9 كغ في 2005، مع وجود تباين كبير من سنة إلى الأخرى. يتراوح متوسط الإنتاج لكل هجين ما بين 3.35 كغ (شماليفافس/سيغواز) و 4.86 كغ (شماليفافس/سوري)، مع وجود تباين أقل أهمية من التباين السنوي. يرتفع مؤشر تعاقب الإنتاج حيث تراوح من 0.71 (شماليفافس/سوري) إلى 0.87 (أربيكينا/شماليفافس) وهذا المؤشر قليل لتقليد في كلا الهجينين. بالنسبة لشكل الشجرة، 97% من هجائن المجمع ذات شكل ممتد (55%) أو منتصب (35%)، أما الشكل الممتد ليفافس يتهدئ (10%). خصائص الهجائن الناتجة عن عمليات التهجين بين الأصناف شمال ليفافس وكوراتينا تتسم بارتفاع نسبة الشكل الممتد لبيصور (26%). تختلف حالة الشجرة (مثمرة أو خضرية) للهجائن من سنة إلى الأخرى، وتكون الشجرة في حال ثمرة علمدار سنين متتالية (17.5%) أو علمدار سنين متتالية (58%) بنسبة تفوق بقية التشكيلات (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

نسوالمغرب(طريقومسلم،2002). فيالمغرب،ساعدتدراسةالهج  
اثنالنتيجةعلنانتخاب5أصنافعاليةالأداء(وزارةالزراعة،2013).

فيتونس،من1993إلى1996،استهدفهذاالبرنامجالأصنافالأكثر  
زراعاً،وهيشمالليصفاقس،شتويومسكي. الصنفشمالليصفاقس،و  
هونأصنافالزيت،يتميزباننتشاره،وتكيفهمعالبيئاتالمختلفةوإنتاجيت  
ه(طريقي،1996). ولكنهيغانيمبعضالمشكلاتعلمستوبالتركيبه  
لحمضيةللزيت،والتيتمثلفي: انخفاضمعدلحمضالأوليك،وارتفاع  
معدلحمضالبالميتيك(قراطي-كمونوخليف،2001). عملياتالهج  
ينفبهذاالصنفتههدفبالحصولعلنمادجوراثيةعاليةالأداءعلمستوبالت  
ركيبةالحمضيةمعالمحافظةعلسماتهاالجيدة.

يتمزراعةالهجانالنتيجةفيصورةمجمعاتمنذ1997فياقلصفاق  
سفيموقعينهما: مقرمعهدالزيتونومحطةالمعهد"الطاس". تماج  
راءعمليةانتخابأوليةلمائةهجينعلناسنسباحتوائهعليحمضالأولي  
يك(65%>) (معهدالزيتونة،2005). بدأتعمليةتوصيفهذالهج  
ائمنأجلالانتخابالنهائي.

فيهذاالمنشور،نعرضبعضمظاهرالمؤهلاتالزراعيةلتشكيلةمناله  
جانن،فيمايتعلقبشكلالشجرةوحالتها،والإنتاجية.

## المواد والطرق

تتكونالموادالنباتيةفيهذالدراسةمن145هجينامتواجدينفيمقر  
معهدالزيتونففيصفاقس(تونس) وفقلاًلأحداثياتالجغرافيةالآتية:  
خطالعرض"02' 44' 34° شمال،خطالطول59' 43' 10°  
شرقاً؛الارتفاع6م. تمتهجينالصنفشمالليصفاقسمعأصنافمحليةمخت  
لفةوأصنافأخرتمإدخالها.

تمتنفيذالزراعةبكثافةتشجير1250شجرة/  
هكتار،أيعلممسافات2م. x 4م،بنظامالريبالتنقيط.

شملتمتابعةهذالتشكيلةالثوابتالآتية:

- تمتسجبلإنتاجالزيتونبالكيلوجراملكلهجينفينو فمبرخلالافت  
رة2005-2013. وبذلك،تمحسابمتوسطالإنتاجالسنوئيللتشكيلةبأ  
لكامل،وكلتهجينخلالفترةالمتابعةبأكملها.

- تمحسابمؤشرمعامومةالإنتاجلفترةالمتابعةبالكامليواسطةمعادلة  
هوبلينوأخرين. (1936) علمستوبكلتهجين.

- سجلشكلاالشجرةفينوفمبرحيثكانتتمتصبه،أومتدة،أومتدليوتوقال

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%).

## مقدمة

تعتبرعمليةالتهجينالموجهفياًشجارالزيتونعمليةحديثةنسبياً،حي  
تبدأتطبيقهامنذالنصفالثانيمالقرنالماضي. فقدتماعتمادالتهجينالم  
وجهفياًسرايلىلتطويربعضالأصنافحيثتكونقادرةعلماكتيفمعطر  
وفالزراعةالمرفحة،ومتطلبباتالصناعاتالكثيفةوالمربحة(ليفيوأخر  
ون،2003). ساعدتهذالأنشطةفيالحصولعلنعددمنالأصنافالجدي  
دة: قادش(ليفيو،1978)،برنيع(ليفيوأخرون،1986)،معالوت(ل  
يفيوأخرون،1999)،أسكال(ليفيوأخرون،2003)،وكادشون،س  
بيوكواماسييو(ليفيوأخرون،2004).

وفيأسبانيابدأاعتمادبرنامجلتهجينمنذ1991. وبذلكتم  
تنفيذعملياتتهجينمتبادلبينالأصنافبههدفتقليلمدةالفترة  
فيالنبات، وتحسينإنتاجيةالزيتونومردودزيتالزيتون. تم  
مؤخراًانتخابصنفجديد(شيكيتيتا) (رالووأخرون،2008).

قامتالصينأيضاًباستخدامهذالتقنيةفيمحاولهالانتخابأصنافتتوافقم  
عظروفالتربةوالمناخالخاصةفيالبلاد،بعدفشللتجربةالأصنافالتيأدخل  
تمنمناطقالبحرالأبيضالمتوسط(فونتانازاوبالدوني،1990). تمال  
حصولعلنأصنافجديدةمقاومةللبرد(جوينجوأخرون،1984).

فيإيطاليا،بدأفي1971العملعلىبرنامجالتحسينالوراثي  
منخلالعملياتتهجينخاضعةللمراقبة،مماأدىإلىالحصول  
على5000هجين(بيلينيوأخرون،2000أ). راعتعملية  
الانتخابالمعاييرالمعمولبها من حيثالإنتاجيةوجودةالثمرة،  
وقدساعدتعلىالحصولعلىأصنافجديدةثنائيةالغرض:  
أرنو، تيفير وباسنتو (بيلينيوأخرون،2000ب).

فيفرنسا،تماعتمادبرنامجلانتخابصنفناتج عنتهجين  
غيرموجه،مماساعدعلىتسجيلصنفمونسيثالجديد  
في1998 فيالكتيبالرسمي لأنواعوأصنافالفاكهة،  
(www.Olivettes.fr)،الذييتميزبفترةدخولفيالإنتاج  
قصيرةوزيتعاليالجودة.

فيدولجنوبالبحرالأبيضالمتوسط،تمفي1993البدءفيتنفيذ  
برنامجالتحسينالزيتونالتيعنظريقالتهجينالموجهمقبلاًلمجلساللد  
ولبلالزيتون،وقدشملهذالبرنامج5دولمتوسطية،منضمنهاوتو-

(بيشولينولوك)، لبنان (سوري)، الجزائر (سيغواز)، تونس (شمشاليو سيق 4)، أسبانيا (أربيكينا ومانز انيلا) وإيطاليا (كوراتينا).

نلاحظ أن 62% من الهجائن أنتجت تهجين صنف شمالا ليصفا سمكورات نيا، والعكس. يمثل هذا الرقم نقطة قوية في تمييز نامجال التهجين هذا، نظراً لامتداد صنف كوراتينا بقدر إزهار جيدة بالإضافة إلى قدرات تكنولوجية عالية. وبالفعل، سجلنا لكاساسيو آخرون، (2005) تميز هذا الصنف ببعض الخصائص القاحية والزهرية الجيدة، حيث أظهرت ارتفاع معدل التالزهور المثالي، و عدد حبوب القاح في كل زهرة، و عدد الزهور الخصبة لكل تلقح مختلط. من ناحية أخرى، أثبتت روقو آخرون، (2009) أن زيتا صنف كوراتينا ينجح في توعية كيميائية حمضية متوازنة، نظراً للاحتوائه على معدل مرتفع من حمض أوليك (70%) ومعدل منخفض للغاية من حمض البالاميتيك (9%). يجب أن نتوقع عملية انتخاب فعالة للهجائن من هذا التهجين.

معايير المجلس الدولي للزيتون (1997).  
- تم متابعة حالة الشجر خلال سنتين متتاليتين، ووضع توصيف للحالة سواء أثمرت أو خضرت.

تعرض البيانات المجموعة الخاصة بالتشكيلة بأكملها، وبكل عملية تهجين. يُعرض كل متوسط للانحراف المعياري، ويُقاس التقلب لكل متوسط بواسطة معامل التقلب ((الانحراف المعياري/المتوسط)\*100).

## النتائج النقاشات

### جرد التشكيلة

تضمنت تشكيلة معهد الزيتون إجمالي 145 صنف هجين يتم نالي 13 عملياً تهجين مختلف (الجدول 1). فيما عدا الصنفين الهجينين الناجمين عن التلقح الحار للصنف شمالا ليصفا، تم إدخال أصول مختلفة منذ ولابد البحر الأبي ضالم متوسط في التهجينات الأخرى. يتعلق الأمر بالأصول لقادمه من فرنسا

جدول 1: توزيع هجائن تشكيلة معهد الزيتون تبعا لعملية التهجين

التهجين	عدد الهجائن
أربيكينا/شماليا	6
شماليا/أربيكينا	2
شماليا/كوراتينا	84
كوراتينا/شماليا	6
شماليا/ليك	8
شماليا/سيغواز	13
شماليا/سوري	17
كورورنيكي/شماليا	3
شماليا/شماليا	2
شماليا/مانز انيلا	1
شماليا/بيشولين	1
شماليا/سيق 4	1
شماليا/شمشالي	1
الإجمالي	145

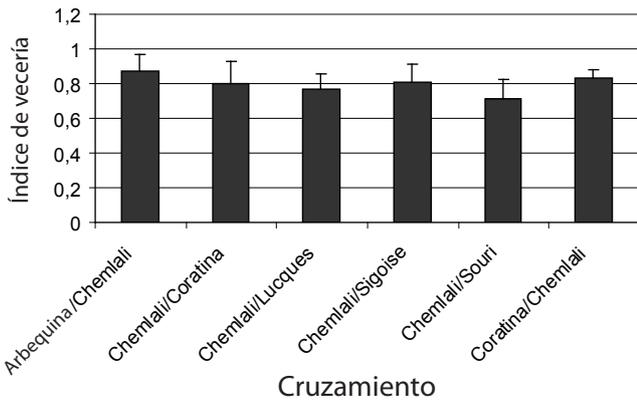
## الإنتاج السنوي من الزيتون

جائن، مما يساعد على انتاج الهجائن بمستويات إنتاجية بطرق فعالة في ظل المعاملات الزراعية لهذا الحقل. ومن ناحية أخرى، تكشف التقلبات من سنة إلى أخرى عن نتائجها لمعاملة الإنتاج. يجب الاهتمام بشكل خاص بهذا المعيار في عملية الانتخاب النهائية للهجائن.

يشهد الإنتاج السنوي من الزيتون تشكيلة الهجائن تقلبات كبيرة حيث تراوح من 1.9 كغ في 2010 إلى 9 كغ في 2005 (شكل 1). نلاحظ كل عام حاد وتقلبات كبيرة بين الهجائن نظراً لوصول معاملات لتقلبات أكثر من 200% في 2013. يشير التقلب من سنة إلى أخرى بالسلوك إنتاجي شديد التباين بينه

## معاومة الإنتاج

شمل مؤشر معاومة الهجانة الستة ذاتها (شكل 3). يقلتغير هذا المؤشر بين عمليات التهجين بشك كبير، إلا أنهمم تفاعل غاية، حيث تتركز أو حالقيم بين 0.71 (شمالي/سوري) إلى 0.87 (أربيكينا/شمالي). تقلنس بة التقلبات بين الهجانة لعمليات تهجين بشك كبير أيضاً، مع معامل تقلبات قصوى 16.2%. تشير هذه النتائج إلى أن تشكيل الهجانة التي تيمدر استهانت سمبظاهرة معاومة تصارمة فيظلم وفالدراسة. ويستلزم هذا الأمر أنت كون عملية انتخاب الهجانة المنتجة مصحوبة بة تفاعمستوى بالمعاومة. وفالظلم يقبومسلم (2002)، قدير جعأصلسمة المعاومة فيتشكيل الهجانة إلى الصنف شمالي ليعفاسالمعروف، وموضوعير نامجالتحسين، بسببمعاومة الإنتاج ليه.

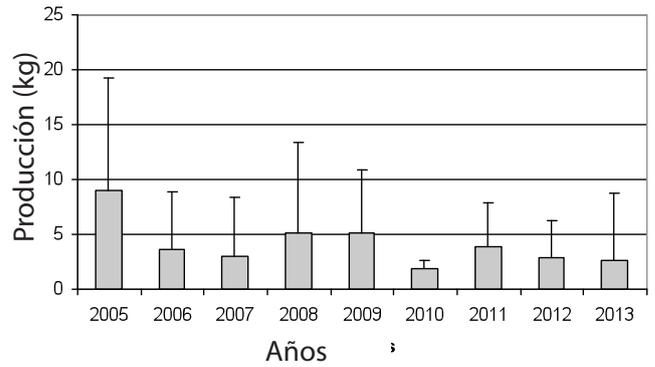


شكل 3. مؤشر تعاقب الهجانة وفقاً لعملية التهجين (الخط الأفقي = الانحراف المعياري)

## شكلا الشجرة

فيا لشكل 4، 90% من هجانة تشكيلها شكلها ممتد (55%) أو منصب (35%). الشكلا لمتد ليسبتهضئيلة 10%. الهجانة لنا تجة منالتهجين بشك ليعفاسالمعروف اتينا تظهر أعلنسبة للشكلا لمتد (45%)، وعلنار غممنذلك، فهيلاتز التمثالنسبة الأضعفيا لتشكي لةبأكملها (شكل 5). الشكلا لمتد صيفيهذالهجانة ممتد للشكلا لتشكي لة (29%). غير أننا قد لاحظنا أن معدلا لشكلا لمتد ليعفاسالمعروف هالمجموعه نالهجانة يربشكواضعفبئية التشكيل (26%).

هيمنة الأشجار ذات الشكلا لمتد فيالحياتين تذكرنا بشكلا لشجر في صنف شمالي ليعفاسالمعروف الذي ذكره المجلس الدولي للزيتون، (2000)

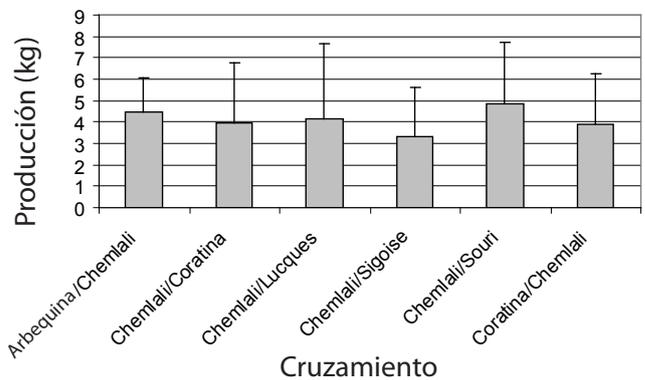


شكل 1. إنتاج الهجانة منالزيتون فيالسنة (الخط الأفقي = الانحراف المعياري)

## الإنتاج السنوي منالزيتون لعمليات تهجين

شملت متوسط الإنتاج لعمليات تهجين 6 عمليات تهجين شملت علنا أكثر من 3 هجانة لتشكيل (شكل 2). هذا المعيار أقلتقلبات منالإنتاج السنوي نظراً للتذبذب القيم بين 3.35 كغ (شمالي/سيفواز) إلى 4.86 كغ (شمالي/سوري). تقل أيضاً نسبة التقلبات بين الهجانة لعمليات تهجين عن التقلبات السنوية، حيث وصل معامل تقلبات القصب إلى 83.7%. ستسا عد التقلبات الملاحظة على إجراء عملية انتخاب فعالة للهجانة لنا تجة منمعظم عمليات تهجين.

نلاحظ أن أداء الإنتاج لكام هو منالناحية العملية بالنسبة للتهجين المتبادل بين شمالي ليعفاسالمعروف اتينا. قد تشير هذه الملاحظة إلى أن السيطرة الوراثية لسمة الإنتاجية تعتمد علنا لأصلالذي يتم إدخاله في عملية التهجين. ذلك، قد يكوننا لانتخاب منالزيتون نفعاً ليعفاسالمعروف لتهجين المتبادل.



شكل 2. إنتاج الهجانة منالزيتون وفقاً لعملية التهجين (الخط الأفقي = الانحراف المعياري)

هذا القيم تؤكد علو وجود ظاهر معاومة الإنتاج التي تمت ملاحظتها في هذه هالتشكيلية من الهجانن. ولكن هذا الظاهر موجود بنسبة أقل للدهاننال ناتجة من التهجين بين شمالا ليفاقسو كور اتينا. ستكون عملية الانتخاب اصبحت معاومة الإنتاج في الهجانن الناتجة من تهجين الصنفين شمالا ليفاقسو كور اتينا أكثر فعالية من الهجانن الخاصة بعملية التهجين الأخرى.

جدول 2: النسبة المئوية لحالة الشجر الهجين خلال سنتين متتاليتين

المواد النباتية	الحالة	سنة 1	سنة 2	سنتين
تشكيلية الهجانن	خضرية	72	48	
	منتجة	28	52	17.5
التهجين شمالا ليفاقسو وكور اتينا	خضرية	42	0	
	منتجة	58	100	58

## الخاتمة

من هذا الدراسة، يتضح أن عملية الانتخاب علمي ومستو ببعض الثوابت الزراعية يفتت تشكيلية الهجانن من الصنف شمالا ليفاقسو اعدة للغاية. علاوة على ذلك، توصلنا لأنشطة التبيد أتم منذ 2005 إجراء عملية انتخاب أو لية للهجانن التي خضعت للتقييم النهائي. نضع في المستقبل لقرى بالتسجيل بعض الأصناف نافال هجينة بشكل نهائي في الكتيبات الوطنية للأصناف.

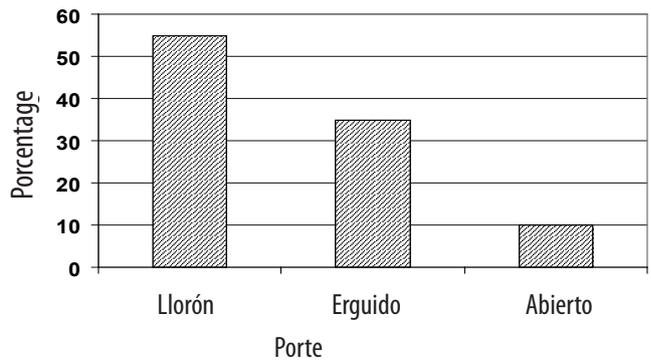
## المراجع

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 sciences 32 (2): 222-227.  
 Bellini E., Giordani E., Parlato M.V., Pandolfi S., 2000 a. Olive genetic improvement: Thirty years of research. Acta Horticulturae 586: 105-108.  
 Bellini E., Giordani E., Parlato 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.

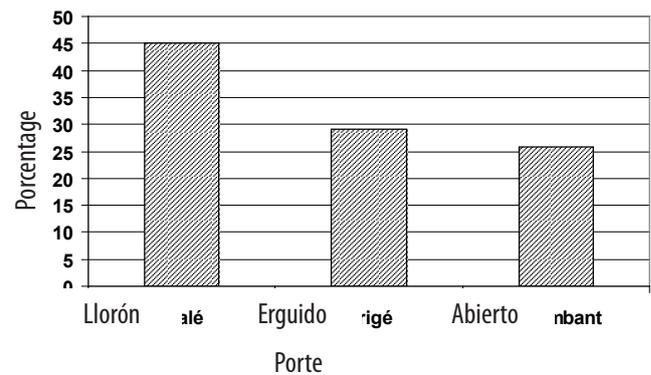
و طر يقيو مسلم (2002). قدينشأ الشكلالمنتصبالموجود في هجاننالتشكيلية منالأصولالمستخدمة، مثلصنفي سور يوليوكو فقا للمجلسالاوليلزي تون، (2000). ومناحيةأخرى، قديتشير الزيادةالكبيره فينسبة الشكل المتديليفيعملية التهجينبينشمالا ليفاقسو كور اتينا للسيطرة وراثية اصبةجداالدهينالصنفين. عندئذ، ينبغي إجراءدراسةجينية وجزئية علهذينالأصليوهجاننهما لإظهار هذا السيطرة الوراثية. نتاجهذهالدراسة ستكون مفيدة للغاية في مجال التحسين الوراثي لأشجار الزيتون لانتخاب الأصناف ذات الشكل المتديلي. هذا الأصناف مطلوبة بشدة هذا الأيام لمرعاة أشجار الزيتون فائقة الكثافة التي تنتشر بشكل كبير في مساتين الزيتون نعلم سنو بالعالم، و فقا لتومبيسي (2013). فيتشكيلتنا، يمكن إجراء عملية الانتخاب على أنماط المختلفة من شكل الشجر.

## حالة الشجر

يوضح الجدول 2 أن سلوك هجانن التشكيلية خلال السنة الأولى والغير منتجي معظمه بنسبة 72%. و علنا العكس، كانت الهجانن الناتجة من تهجين الصنف



شكل 4. التغييرات في شكل الأوصاف هجانن التشكيلية



شكل 5. تغيير شكل الأوصاف هجانن الناتجة من عملية التهجين بين شمالا ليفاقسو كور اتينا

بين شمالا ليفاقسو كور اتينا منتج بشكل عام بنسبة 58%. خلال السنة الثانية، كانت الصنف الهجانن التشكيلية فيمرحلة الإنتاج، بينما كانت جميع الهجانن من تهجين شمالا ليفاقسو كور اتينا فيمرحلة الإنتاج. وبالتالي، تمثاله جانن فيمرحلة الإنتاج خلال عامين 17.5% فقط من التشكيلية و 58% من المجموعه الناتجة من التهجين بين شمالا ليفاقسو كور اتينا.

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](http://www.olivettes.fr/fr/biodiversité/olives.pdf) (site consulté le 03/02/2015).
- Fontanazza G., Baldoni L., 1990. Proposition pour un programme d'amélioration génétique de l'olivier. Olivae 34 : 32-40.
- Grati-Kamoun N., Khlif 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., Ogradovich A., Avidan B., Wiesman Z., Avidan N., Trapero-Casus A. 1999. « Maalot », un nouveau cultivar résistant à l'œil de paon (*Spilotea 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.

## مركبا oleomissional و oleokoronal: مكونات فينولية رئيسية جديدة في زيت الزيتون البكر الممتاز

Panagiotis Diamantakos<sup>1</sup>, Angeliki Velkou<sup>2</sup>, K. Brian Killday<sup>3</sup>,  
Thanasis Gimisis<sup>2</sup>, Eleni Melliou<sup>1,4</sup> y Prokopios Magiatis<sup>1,4,\*</sup>

<sup>1</sup> قسم علم العقاقير وكيمياء المنتجات الطبيعية، كلية الصيدلة، جامعة أثينا، بانبيستيمبوليس-زوجرافو، أثينا، اليونان  
<sup>2</sup> مختبر الكيمياء العضوية، كلية الصيدلة، جامعة أثينا، بانبيستيمبوليس-زوجرافو، أثينا، اليونان  
<sup>3</sup> بروكر بيوسين، بيليريك، ولاية ماساتشوستس، الولايات المتحدة الأمريكية  
<sup>4</sup> قسم الفسيولوجيا والفيزياء الحيوية، جامعة كومنولث فيرجينيا، ريتشموند، ولاية فيرجينيا، الولايات المتحدة الأمريكية

\* باحث تُجرى المراسلات معه. هاتف: +30 210 7274052. البريد الإلكتروني: magiatis@pharm.uoa.gr

### ملخص

يحتوي زيت الزيتون البكر الممتاز على كميات كبيرة من المكونات الفينولية القطبية. وتتألف الغالبية العظمى من استيرات التايروسول أو الهيدروكسي تايروسول مع مشتقات السيكوريدويد من الأوليوروبين أو الليجستروسايد. نقدم في الدراسة الحالية وصفاً لعدد من الأشكال الجديدة أو التي لم يتم توصيفها بشكل كامل لأجليكونات الليجستروسايد والأوليوروبين. ويتم وصف شكلين منها، وهما من الأشكال الإينولية المستقرة، لأول مرة كمكونات حقيقية لزيت الزيتون على الرغم من افتراض وجودهما في زيت الزيتون من قبل. وللد من الالتباس مع الأسماء المعقدة لأيزومرات الأجليكونات، فإننا نقترح اسمي oleomissional و oleokoronal لهذين المكونين. وبعد فحص 2000 عينة من زيت الزيتون من معظم الأصناف الرئيسية تمكنا من تحديد عينات زيت الزيتون التي مثلت فيها مركبات oleomissional و oleokoronal المكونات الفينولية الرئيسية وأمكن استخدامها كمواد أولية من أجل عزلها. ومن المثير للاهتمام، أن كلا المركبين خلال الفصل الكروماتوجرافي ذي الطور العادي أو المعكوس قد تحولوا إلى الأشكال المعروفة من أجليكونات الحلقة المغلقة ذات الأدهايد الأحادي monoaldehydic closed ring aglycons، مما يقدم تفسيراً وراء عدم تحديد تلك المركبات حتى الآن. وتؤكد وجودها الحقيقي في زيت الزيتون عن طريق الملاحظة المباشرة بالرنين المغناطيسي النووي RMN دون استخدام أي مذيب.

### كلمات مفتاحية

مشتقات الفينول، السيكوريدويد، أجليكون الليجستروسايد، أجليكون الأوليوروبين، زيت الزيتون، الرنين المغناطيسي النووي

### 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.

Received: August 2015 / Accepted: October 2015 / Published: November 2015

الهيئة الأوروبية لسلامة الأغذية EFSA، بقبول دعاوى صحية محددة تتعلق بمستويات مركبات فينولية محددة موجودة في زيت الزيتون.

والمركبات الرئيسية المسؤولة عن الدعاوى الصحية المقررة "حماية نسبة الدهون في الدم من الإجهاد التأكسدي" هي: الهيدروكسي تيروسول hydroxytyrosol (1)، والتايروسول tyrosol (2) ومشتقاتهما. ولهذا السبب، فمن المهم للغاية الحصول على معلومات دقيقة عن الهوية الكيميائية لجميع هذه المكونات وقياسها كميًا في زيت الزيتون. وحتى الآن لا توجد طريقة معتمدة رسميًا لقياس المكونات ذات الصلة بالدعاوى الصحية بسبب وجود صعوبات فنية معروفة. ويوجد الهيدروكسي تيروسول (3,4-DH-) PEA والتايروسول (p-HPEA) في زيت الزيتون وبشكل رئيسي في الصور المؤسّرة من مركبات (3,4-DH-) oleacein (3) و (p-HPEA-EDA) oleocanthal (4) وكذا أجليكون الأوليوروبين (3,4-DH-) oleuropein aglycon (5a) PEA-EA وأجليكون الليجستروسايد (p-HPEA-EA) (6a)، والتي تمتلك جميعها أنشطة بيولوجية كبيرة.

بيد أنه لم يتم وضع تعريف دقيق للمسميات "أجليكون الأوليوروبين" oleuropein aglycon و"أجليكون الليجستروسايد" ligstroside aglycon، وغالبًا ما تستخدم بطريقة مضللة. وفي الواقع، هناك العديد من الأيزومرات المحتملة للأجليكونات والكثير منها لم يتم توصيفه على نحو جيد. وغالبًا ما تُذكر من خلال أسماء وصفية معقدة مثل: صورة هيدروكسيلية، أو ألدهايد أحادي، أو ألدهايد ثنائي، أو ممي، أو حلقة مفتوحة أو حلقة مغلقة، أو ديكاربوكسيلية، إلخ. وغياب التعريفات الرسمية والدقيقة للأسماء وبيانات الرنين المغناطيسي النووي المعتمدة يمثل مصدرًا للعديد من المشكلات في المؤلفات ذات الصلة. وناقش في هذه الورقة البحثية الحالية مسألة الفصل وتوضيح البنية التكوينية لسلسلة من الصور السابقة التي لم يتم وصفها من أجليكون الأوليوروبين وأجليكون الليجستروسايد، كما نوضح المسميات وتوصيف الرنين المغناطيسي النووي للأعضاء التي سبق وصفها من هذه العائلة من المركبات.

## المواد والأساليب

### نظرة عامة

تم شراء بيتا غلوكوزيداز اللوزي من شركة Sigma-AI-drich. وتم فصل الأوليوروبين من أوراق أشجار الزيتون البرية

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 oleokoronol 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.

## مقدمة

حماية البحر الأبيض المتوسط التقليدية، التي تحظى باهتمام المجتمع العلمي باستمرار نظرًا لما تتسم به من خصائص لحماية الصحة، تستند إلى الاستهلاك اليومي من زيت الزيتون كمصدر رئيسي للبيدات/الدهون. وتعتبر مشتقات السيكوريدويد الفينولية واحدة من أهم فئات المكونات في زيت الزيتون والتي توفر إمكانية متزايدة لحماية الصحة. وقد سمح مؤخرًا تشريع الاتحاد الأوروبي (UE 432/2012)، الذي يستند إلى الرأي العلمي

الرقيقة TLC على الألواح المكسوة بـ RP-18 Si gel 60  
F254 ميرك، 0.25 ملم.

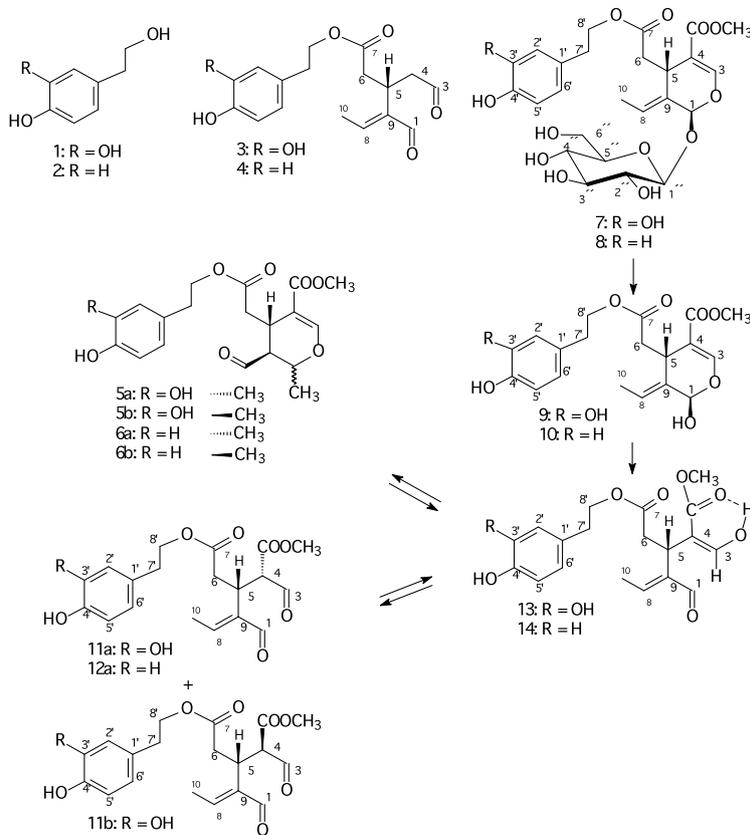
### زيت الزيتون

تم فصل المركبات التي خضعت للدراسة في نوعين من  
الزيت: قدمت تعاونية باليوباناجيا، بمدينة لاكونيا في اليونان،  
النوع الأول وهو من إنتاج نوفمبر 2013 من صنف كورونيكلي  
في عصارة ثلاثية المراحل تعمل عند درجة حرارة 25 درجة

ذات المحتوى العالي من الأوليوبروبين (15% من الوزن الجاف)  
كما هو موضح سابقاً (أندريدو وآخرون 2006). وجرى تسجيل  
أطياف الرنين المغناطيسي النووي على مطياف Avance 700؛  
وتم التعبير عن التحولات الكيميائية بأجزاء من المليون بينما تم  
معايرة المحاور على الإشارة المتبقية للكلوروفورم الديوتيريوم  
CDCl<sub>3</sub>. وتم تنفيذ الفصل الكروماتوجرافي للأنبوب على أنابيب  
تحتوي على RP-18 Si gel 60 (40-63 ميكرومتر)  
(ميرك، دارمشتات، ألمانيا). وتم تنفيذ كروماتوجرافي الطبقة

الجدول 1. بيانات الرنين المغناطيسي النووي RMN-H1 لمركب (14) oleokoronal و (12a,b) ligstrodials عند تركيز  
3 ملغ/0.6 مل. معايرة المحور استناداً إلى CDCl<sub>3</sub> = 7.26 جزء في المليون

	14	b (5S,4S)12 <sup>a</sup>	a (5S,4R)12 <sup>a</sup>	
	9.225, d, 1.7	9.218, d, 2.0	9,212; d; 2,0	1
	7.386, dd, 12.6, 0, 8	9.46, d, 2.7	9.68, d, 2.7	3
	-	4.11, dd, 10.5, 2.7	4.06, dd, 10.5, 2.7	4
	4.16 ddd, (تداخل)	3.83 m, (تداخل)	3.83, m, (تداخل)	5
	2.97, dd, 16.1, 9.6	2.82, (تداخل)	2.81, (تداخل)	6a
	2.78 dd, 16.1, 6.3	2.58, (تداخل)	2.62, (تداخل)	6b
	6.56, C, 7.1	6.72, c, 7.1	, c, 7.16.70	8
	2.062, d, 7.0	2.062, d, 7.1	2.055, d, 7.0	10
	11.75, d, 12.6	-	-	OH3-
	3.75, s	3.77, s	3.65, s	OCH3
	4.18, m	4.18, m	4.20, m	'1
	2.81, m	2.81, m	2.81, m	'2
	50.7 d, (تداخل)	7.05 d, (تداخل)	7.05, d, (تداخل)	4, 8
	6.76, d, (تداخل)	6.76, d, (تداخل)	6.76, d, (تداخل)	5 '7, '4



الشكل رقم 1. الهيكل البنوي للمركبات التي جرى فحصها

برنامج TopSpin (بروكر). وتم تنفيذ عملية تكامل دقيقة يدويًا للقمم ذات الأهمية.

### تحليل رنين مغناطيسي نووي بالنبض الحثي الانتقائي لزيت الزيتون دون استخراج

600 تم نقل 600 ميكرو لتر من زيت الزيتون إلى أنبوب رنين مغناطيسي نووي بقطر 5 مم دون أي مذيب معالج بالديوتيريوم. وقد تم الحصول على أطيف الرنين المغناطيسي النووي للعينات المجهزة وذلك بدون قفل الديوتيريوم، مع إعداد إزاحة الحقل على نفس القيمة التي تم الحصول عليها من العينة المستخرجة المحتجزة في كلوروفورم الديوتيريوم  $CDCl_3$ . وتم تنفيذ تسلسل DPGF-PE باستخدام نبض إعادة تركيز انتقائي REBURP 1.26 مللي ثانية 180 درجة، مما يوفر نافذة حث تبلغ 4900 هرتز من 14 إلى 7 جزء في المليون. وجرى تجميع البيانات من 16 فحص. وتم تصحيح مراحل الأطياف تلقائيًا باستخدام برنامج TopSpin (بروكر).

### تركيب أجليكون الأوليوروبين

تم حل أوليوروبين (100 ملغ) في قارورة 25 مل مستديرة القاع تحتوي محلول أسيتات منظم (درجة الحموضة = 5، 5 مل). وتمت إضافة الكلوروفورم (5 مل)، ثم تم تقليب النظام ثنائي الطور الناتج بلطف. وفي هذا النظام، أصيقت مادة بيتا غلوكوزيداز (3.4 وحدة/ملغ، 70 ملغ)، وتم تقليب خليط التفاعل الناتج بلطف عند 30 درجة مئوية لمدة 20 ساعة، أو حتى أظهر المخطاط الكروماتوجرافي للطبقة الرقيقة (12% في ثنائي كلوروميثان) استهلاك الأوليوروبين بالكامل. وتم فصل المرحلة العضوية واستخراج المرحلة المائية بواسطة الكلوروفورم (3x5 مل). وتم غسل الخلاصات العضوية جميعها بواسطة محلول ملحي (20 مل)، وتجفيفها بكمبريتات الصوديوم، ثم تصفيتها وتبخيرها تحت ضغط منخفض. وجرى تحليل المنتج الخام (66 ملغ، 94%) بواسطة الرنين المغناطيسي النووي للبروتون. RMN H1.

### النتائج والمناقشة

لا توجد تعريفات دقيقة للمسميات "أجليكون الأوليوروبين" oleuropein aglycon و"أجليكون الليجستروسايد" ligstroside aglycon، وغالبًا ما تستخدم بطريقة مضللة. ويتوافق كلا المسميان مع عدد كبير من الأيزومرات التي لا تتسم بتصنيف جيد في العديد من الحالات. وفي الواقع، تأتي معظم مشتقات السيکوريدويد الفينولية في زيت الزيتون من الأوليوروبين

مئوية مع فترة عجن 30 دقيقة. بينما جاء النوع الثاني من بستان زيتون بيركلي، بمدينة أوروفيل بولاية كاليفورنيا، وهو من إنتاج صنف ميشن (Mission) في نوفمبر 2013. وجاءت زيوت الزيتون الأخرى المستخدمة في عملية الفحص من قاعدة بيانات العينات كما هو موضح سابقًا (كاركولا وآخرون 2014).

### الاستخراج والفصل

تم مزج زيت الزيتون (100 غرام) مع السيكلوهيكسين (400 مل) والأسيتونتريل (500 مل) وجرت عمليات التجانس والطرده المركزي عند 4000 دورة في الدقيقة لمدة 5 دقائق. وتم جمع مرحلة الأسيتونتريل باستخدام قمع الفصل، وتم التبخير تحت ضغط منخفض باستخدام مبخر دوار. وخضعت البقايا إلى الفصل الكروماتوجرافي الأنوبي مع جل السيليكا للطور المعكوس مع الأسيتونتريل 100% لإزالة الدهون المتبقية. وتم تجميع جميع الأجزاء الخالية من الدهون، وتبخيرها وإعادة فصلها كروماتوجرافيًا عبر الفصل الكروماتوجرافي للطبقة الرقيقة الإعدادي ذي الطور المعكوس، (الماء  $H_2O$  / الأسيتونتريل 40:60)، مما أدى إلى فصل منطقتين: أ (2.3 ملغ / ترددات لاسلكية = 0.5)، ب (3.3 ملغ / ترددات لاسلكية = 0.7). وتمت دراسة الهيكل التكويني للمركبات المعزولة (الشكل 1) باستخدام مزيج من أطيف الرنين المغناطيسي النووي أحادية وثنائية الأبعاد، ووردت القمم المخصصة في الجداول 1-4.

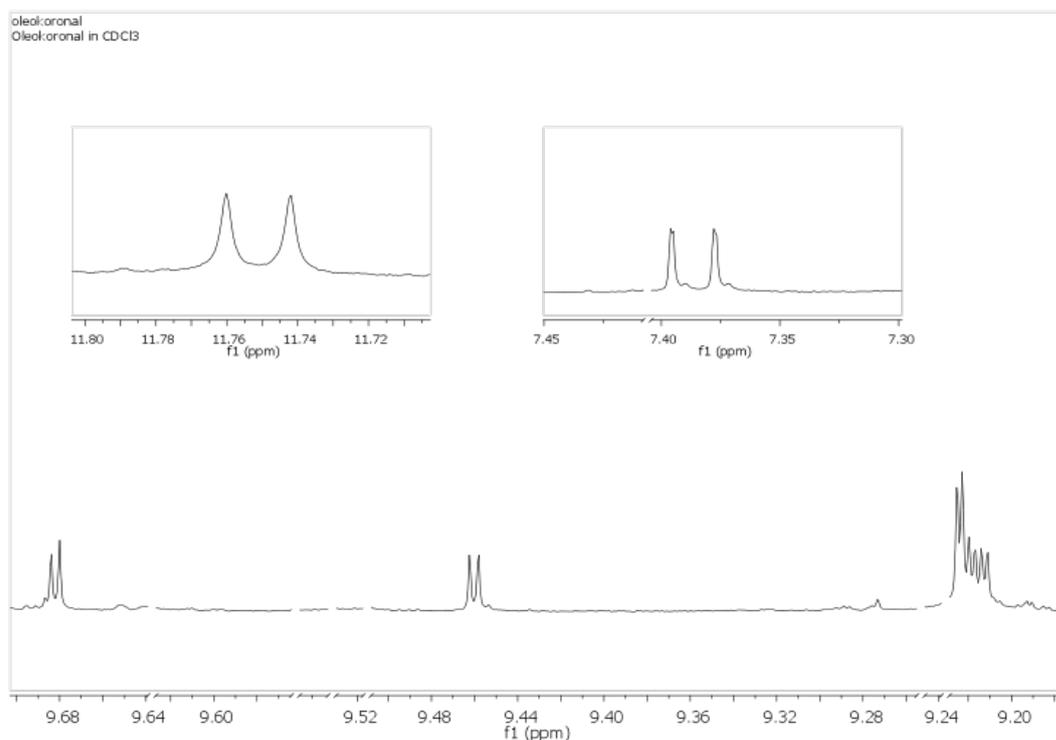
تحليل الرنين المغناطيسي النووي لزيت الزيتون مع الاستخراج جرى استخراج زيت الزيتون وتحليله كما هو مبين سابقًا (كاركولا وآخرون، 2014). وبلجاز، تم مزج زيت الزيتون (5.0 غرام) مع السيكلوهيكسين (20 مل) والأسيتونتريل (25 مل)، وجرت عملية التجانس باستخدام خلاطة دوامية لمدة 30 ثانية وطرده مركزيًا عند 4000 دورة في الدقيقة لمدة 5 دقائق. وتم جمع جزء من مرحلة الأسيتونتريل (25 مل) ومزجه مع 1.0 مل من محلول سيرينغ ألدهايد syringaldehyde (0.5 ملغ/مل) في الأسيتونتريل، وتبخيره تحت ضغط منخفض باستخدام مبخر دوار. وتم حل الرواسب في كلوروفورم الديوتيريوم  $CDCl_3$  (750 ميكرو لتر)، ثم نُقلت كمية مُقاسة بدقة من المحلول (550 ميكرو لتر) إلى أنبوب الرنين المغناطيسي النووي بقطر 5 مم. وعادة، تم جمع 50 فحص في نقاط بيانات 32K عبر عرض طيفي من 0-16 جزء في المليون مع فترة استرخاء تبلغ 1 ثانية وزمن اكتساب يبلغ 1.7 ثانية. وقبل إجراء تحول فورييه، تم تطبيق معامل ترجيح أسي يقابل توسع خطي بمقدار 0.3 هرتز. وقُسمت الأطياف إلى مراحل، وتم تصحيحها وتكاملها تلقائيًا باستخدام

صور ألدهايد أحادي ذات حلقة مغلقة أكثر استقراراً 5a و 6a من خلال إعادة الترتيب (Limiroli وآخرون 1995) أو إلى صور ألدهايد ثنائي ذات حلقة مفتوحة. كما تم وصف الصور ذات الحلقة المغلقة في صور مختلفة من ستيريو أيزومرات، مثل 5b و 6b، غير أنه توجد صور أخرى أيضاً (بيريز-تروجيلو وآخرون، 2010). وكما بينا مؤخرًا، تم العثور على صور الحلقة المغلقة لأجليكونات الأوليوروبين والليجستروسايد السائدة في زيت الزيتون في صورة 5a و 6a، في حين زادت الستيريو أيزومرات الأخرى

(7) والليجستروسايد (8)، والتي تمثل أكبر مكونات السيكوربيويد في ثمار الزيتون. وأثناء عملية السحق والعجن لإنتاج زيت الزيتون، يختلط هذان المكونان ببينا غلوكوزيداز (كودوناس وآخرون 2015)، وتتحول في البداية إلى الأجليكونات الحقيقية المقابلة 9 و 10. وهذان الشكلان غير مستقرين، وتمت ملاحظتهما فقط في ظل ظروف محددة للغاية (كريستوفوريديو وديس، 2009). ولا توجد الأجليكونات الحقيقية 9 و 10 داخل مصفوفة زيت الزيتون أو داخل وسط غير مائي بوجه عام، ويجري تحويلها أساساً إلى

الجدول 2. بيانات الرنين المغناطيسي النووي  $^{13}\text{C}$ -RMN لمركب oleokoronal (14) و (a,b,12) ligstrodials عند تركيز 3 ملغ/0.6 مل. معايرة المحور استناداً إلى  $\text{CDCl}_3$  = 177.16 جزء في المليون

14	12b (5S,4S)	12a (5S,4R)	
194.88	194.56	194.75,	1
164.23	195.08	195.72,	3
103.33	59.30	60.27,	4
29.95	31.42	31.42,	5
35.61	34.98	34.52,	6
171.98	171.33	172.07,	7
153.53	155.74	156.11,	8
142.68	141.87	142.40,	9
15.20	15.20	15.20,	10
172.18	168.55	168.18,	11
51.59	52.61	52.38,	OCH <sub>3</sub> ,
65.24	65.24	65.24,	1'
34.02	34.02	34.02,	2'
129.95	129.88	129.88,	3'
130.05	130.03	130.03,	4',84
115.29	115.29	115.29,	5,7,
154.13	154.13	154.13,	6



الشكل رقم 2. طيف الرنين المغناطيسي  $^1\text{H}$ -RMN لنطاق الألدهايد والنطاق الأوليفيني لخليط oleokoronal و 4S/4R-ligstrodial

الهيدروكسي تايروسول. ويتطابق المكونان الصغيران لكل خليط مع زوجي 4R,5S و 4S,5S من صور الأدهايد الثنائي ذات الحلقة المفتوحة لأجليكون الأوليوروبين وأجليكون الليجستروسايد 11a,b و 12a,b. ويتطابق المكون الرئيسي الثالث في كل خليط مع هيكل مشابه جدًا مع وجود فرق أساسي ألا وهو غياب أدهيد ثاني. ومن المثير للاهتمام، فبدلاً من إظهار أدهيد ثاني، أظهر كل جزئ مجموعة ثنائية منزوعة الغلاف حوالي 11.8 جزء في المليون، والتي لم ترتبط بأي كربون في HSQC. وعلاوة على ذلك، لوحظ بروتون أوليفيني إضافي حوالي 7.3 جزء في المليون كمجموعة ثنائية (J = 16 هرتز) مرتبطة بالمجموعة الثنائية عند 11.8 جزء في المليون. وكان البروتون الأوليفيني في تجربة HMBC مرتبطاً بكاربونيل يحمل مجموعة ميثوكسي. واتضح من جميع هذه البيانات أن العنصر الرئيسي في كل منطقة كان الشكل الأحادي الإينول من الأدهايدات الثنائية 11a,b و 12a,b. وخلافاً للتوقعات، كان شكلاً الإينول 13 و 14 مستقرين بسبب الرابطة الهيدروجينية بين هيدروكسيل الإينول والكاربونيل المجاور لمجموعة الكاربوميثوكسي.

تم في الماضي افتراض وجود شكل الإينول لأجليكون الليجستروسايد 14 (على سبيل المثال أنجيروسا وآخرون، 1996)؛ غير أنه جاء يقيناً هنا وللمرة الأولى كمنتج ومكون طبيعي في زيت الزيتون الذي نقترح تسميته oleokoronal. وقد ورد ذكر أشكال الأدهايد الثنائي لأجليكون الليجستروسايد 12a,b عدة مرات كمكونات في زيت الزيتون من خلال قياس الطيف الكتلي MS (مثل دي نينو وآخرون، 2000) ولكن توضيح هيكلها البنوي باستخدام الرنين المغناطيسي النووي لم يتم الإبلاغ عنه بعد. وبالمثل، فقد تم الإبلاغ عنها من خلال قياس الطيف الكتلي في مياه صرف عصارات الزيتون من قبل سانشيز دي ميدينا وآخرون (2011) وأطلق عليها اسم p-HPEA-FA. وورد ذكرها في بعض الحالات كأدهايد ثنائي لأجليكون الليجستروسايد، ولكنها في الحقيقة تشير إلى p-HPEA-EDA أو oleocanthal، والذي يلتبس مع الاسم أدهايد ثنائي أجليكون الليجستروسايد ديكاربوكسيميثيل (مثل جوميز ديل كامبو وجارسيا، 2012). وللد من استخدام أسماء وصفية وغامضة طويلة فإننا نقترح أن الاسم الأنسب لـ 12a,b هو 4R/4S-ligstrodial وذلك من خلال الربط بالليجستروال الذي يشير إلى

بشكل اصطناعي أثناء التنقية أو التحليل الكروماتوجرافي (كاركولا وآخرون، 2014)، وتوجد عادة بنسبة منخفضة جداً أو تنعدم تماماً. ولقد نشرنا مؤخرًا منهجية لملاحظة وتحديد كمية صور الأدهايد الأحادي ذات الحلقة المغلقة 5a و 6a، وذلك باستخدام الرنين المغناطيسي النووي الكمي، جنباً إلى جنب مع مركبي (3) oleacein و وما يثير الدهشة أن جميع المحاولات الأولية في عملية الفصل باستخدام الفصل الكروماتوجرافي الأنوبي أو كروماتوجرافي الطبقة الرقيقة، إما الطور العادي أو العكسي، أدت فقط إلى الهياكل المعروفة 5a,b و 6a,b، رغم أن تحليل الرنين المغناطيسي النووي أظهر وجود تركيزات صغيرة فقط من هذه الهياكل في الزيت الأصلي. واستناداً إلى هذه الملاحظة، افترضنا أن المكونات غير المعروفة كانت عبارة عن هياكل بنويوية تم تحويلها إلى 5a,b و 6a,b، أثناء التنقية. وقد أظهرت عملية إعادة الفحص الدقيق لمناطق كروماتوجرافي الطبقة الرقيقة "A" و "B" وجود بقايا صغيرة من الشكل الأولي مماثلة لتلك التي لوحظت في المادة المستخرجة من زيت الزيتون قبل التنقية. وأظهر تحليل الرنين المغناطيسي النووي للمناطق سابقة الذكر أنه كان عبارة عن خليط غير قابل للفصل من ثلاثة مركبات في كل حالة. وبما أن الخليط كان غير قابل للفصل مع تحوله أثناء أي محاولة في عملية التنقية، فقد فحصناه كخليط بواسطة تجارب رنين مغناطيسي نووي ثنائي الأبعاد موسعة من أجل توضيح الهيكل البنوي لكل مركب وتوصيف القمم الملاحظة (الجدول 1-4).

أظهر توضيح الهيكل البنوي أن المكون الرئيسي في كل خليط كان عبارة عن صورة أدهايد أحادي ذات حلقة مفتوحة في حين تطابقت الصورتان الأخريان مع صور أدهايد ثنائي ذات حلقة مفتوحة. والنسبة بين المركبات الثلاث كما تحدد من خلال دمج بروتونات الأدهايد الثلاث، عند 9.21 - 9.22 جزء في المليون للمنطقة A، كانت 1:1:2 (الشكل 2). وأظهر الخليط الأول من المركبات الثلاثة للمنطقة A الإشارات المميزة لجزء التايروسول في حين أظهر الثاني للمنطقة B الإشارات المميزة لجزء الهيدروكسي تايروسول. وباستخدام تجارب HSQC و HMBC و COSY و TOCSY، كان بمقدورنا تعيين كل قمم المركبات الثلاث في كل خليط. وأظهرت جميع المركبات القمم المميزة لجزء ميثيل متصل برابط مزدوج مجاور لبروتون أوليفيني فضلاً عن جميع القمم الأخرى المتوقعة لصورة الحلقة المفتوحة للحمض الإينولي المؤسّر إما مع التايروسول أو

**الجدول 3. بيانات الرنين المغناطيسي النووي  $^1\text{H-NMR}$  لمركبي (13)oleomissional و a,b11 oleuropeindials عند تركيز 20 ملغ/0.6 مل أ معايرة المحور استنادًا إلى  $\text{CDCl}_3$  7.26 جزء في المليون**

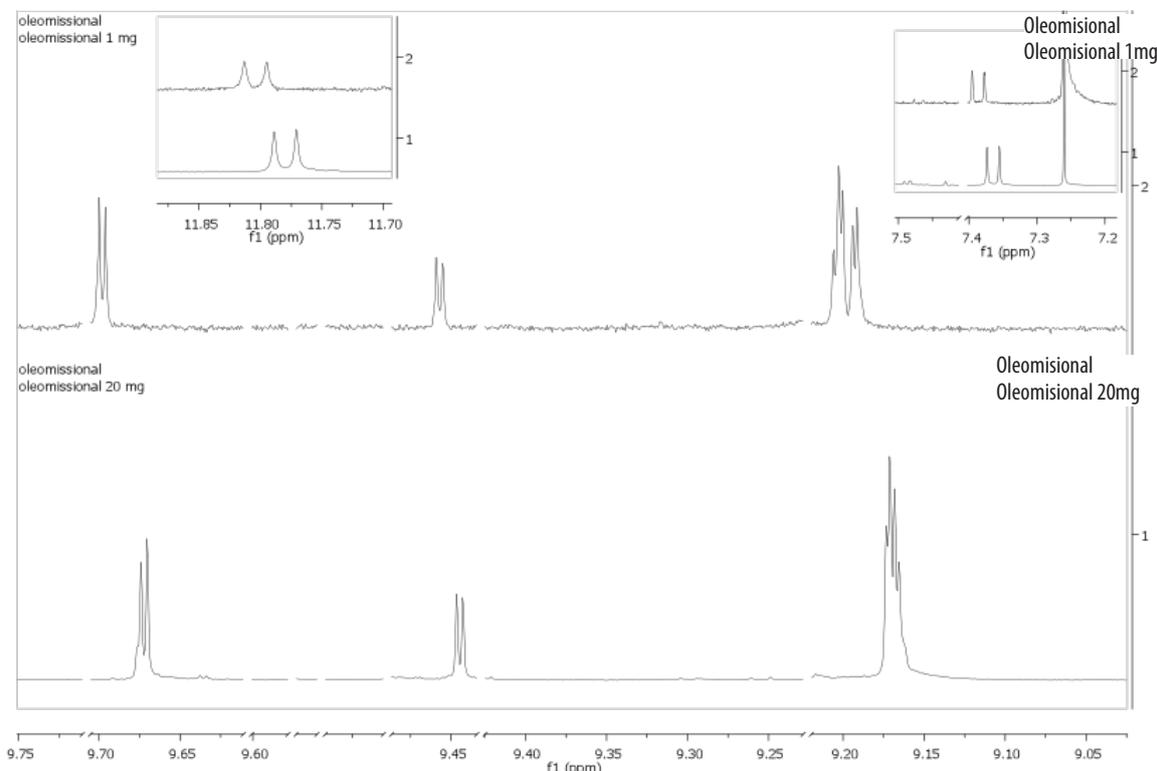
13	b (5S,4S)12	a(5S,4R)11	
9.17, d, 2.0	9.17, d, 2.0	9.17, d, 2.0	1
7.36, dd, 12.6, 0.8	9.44, d, 2.7	9.67, d, 2.7	3
-	4.10, dd, 10.5, 2.7	4.04, dd, 10.5, 2.7	4
4.17(تداخل) ddd	2.0, tdd, 10.5, 4.3, 3.80,	3.84, tdd, 10.5, 4.7, 2.0	5
2.98, dd, 15.8, 9.6	2.83, dd, 15.8, 10.5	2.82, dd, 16.0, 10.5	6a
2.77 (تداخل), dd	2.58, dd, 15.8, 4.3	2.63, dd, 16.0, 4.7	6b
6.59, C, 7.1	6.73, q, 7.1	6.70, c, 7.1	8
2.05, d, 7.1	1.99, d, 7.1	2.02, d, 7.1	10
2.611.78, d, 1	-	-	OH3
3.74, s	3.78, s	3.65, s	OCH <sub>3</sub>
4.16, m	4.12, m	4.21, m	'1
2.75, m	2.75, m	2.75, m	'2
6.71, <sup>⊂</sup> d, 1.8	6.67 <sup>⊂</sup> , d, 1.8	6.68 <sup>⊂</sup> d, 1.8	'4
6.78 (تداخل), d	6.78(تداخل), d	6.78 (تداخل), d	'7
6.60 dd	6,58	6,58	'8

<sup>1</sup> تمت ملاحظة اختلافات صغيرة في التحولات الكيميائية لـ 11a و 11b و 13 عند تسجيل الأطياف عند تركيز 1 ملغ/0.6 مل (مثل H-10: 2.04/1.98/2.07، H-3: 9.70/9.46/7.39، COOCH<sub>3</sub>: 3.66/3.80/3.76 على التوالي)

<sup>⊂</sup> قد تتبدل

**الجدول 4. بيانات الرنين المغناطيسي النووي  $^{13}\text{C-NMR}$  لمركب (13) oleomissional و oleuropeindials (a,b11) عند تركيز 20 ملغ/0.6 مل. معايرة المحور استنادًا إلى  $\text{CDCl}_3$  = 177.16 جزء في المليون**

13	11b (5S,4S)	11a (5S,4R)	
196,04	195,65	195,53	1
164,07	195,41	196,24	3
103,69	59,50	60,45	4
30,14	31,97	31,58	5
35,92	35,44	34,80	6
172,18	171,46	171,71	7
155,05	157,29	156,78	8
142,40	140,52	141,14	9
15,41	15,49	15,40	10
172,12	169,02	168,23	11
51,86	53,02	52,69	OCH <sub>3</sub>
65,52	65,52	65,52	1'
34,28	34,28	34,28	2'
130,53	130,46	130,46	3'
116,38	116,24	116,29	4'
143,68	143,65	143,60	5'
142,92	143,00	143,05	6'
115,39	115,39	115,39	7'
121,27	121,33	121,27	8'



الشكل رقم 3. طيف الرنين المغناطيسي النووي  $^1\text{H NMR}$  لنطاق الأدهايد والنطاق الأوليفيني لخليط *S/4R-4* oleoimissional وoleuropeindial (أعلى: 1 ملغ/0.6 مل، أسفل: 20 ملغ/0.6 مل).

وتجدر الإشارة إلى أن هذا المركب و11a,b يمثلان انحرافاً كبيراً للتحويلات الكيميائية للرنين المغناطيسي النووي  $^1\text{H-NMR}$  المحدد اعتماداً على تركيز العينة (الجدول 4 والشكل 3) . ويمكن أن يفسر ذلك بعض الاختلافات فيما يتعلق ببيانات الدراسات السابقة ولكن ليس الدراسات الكبرى. ومن المثير للاهتمام أن نفس الباحثين في دراسة موازية (بيانكو وآخرون، 1999b) يرجعون القمم التي لوحظت عند 11.79-11.83 جزء في المليون إلى مشتقات الأكسدة (أدهيد إلى كربوكسيل) والتي تنشأ ببطء في كلوروفورم ديوتيريوم  $\text{CDCl}_3$ . واستناداً إلى ما توصلنا إليه من نتائج، فإن تلك القمم لا ترجع إلى الأكسدة ولكن إلى التوازن بين الأدهايد والإينول.

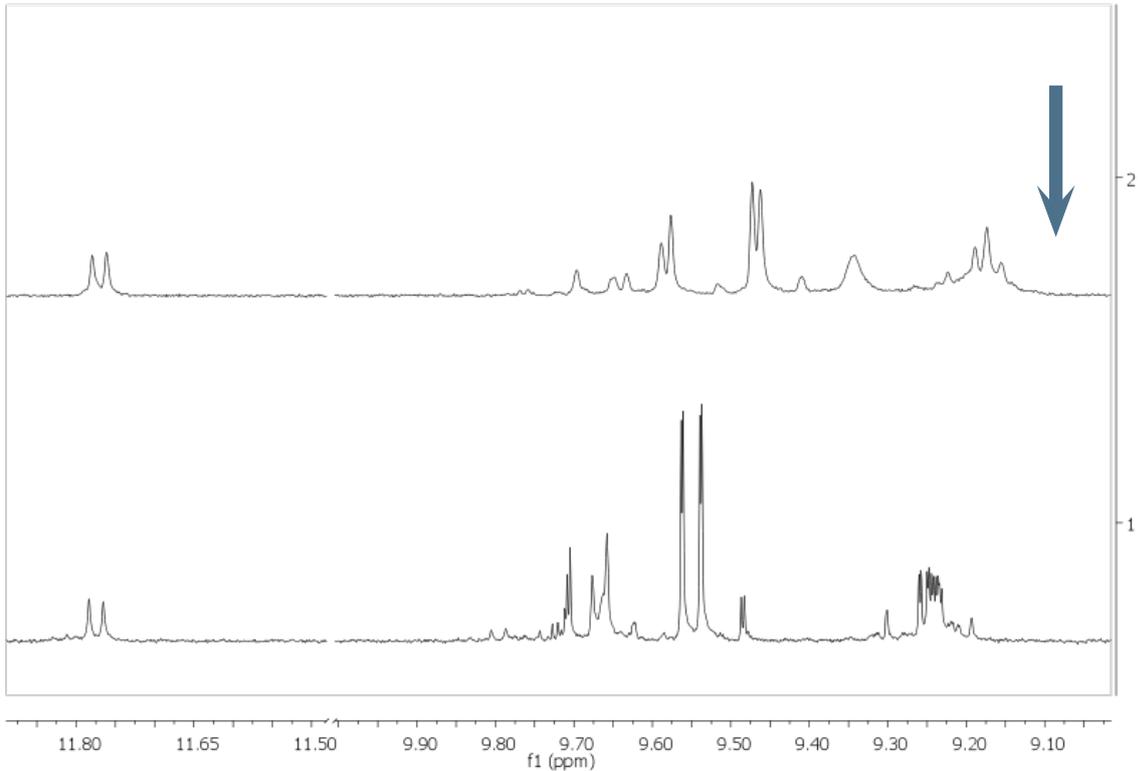
يبدو أن نفس الالتباس يظهر في الدراسة التي أجراها بياف-مارتينز وجوردون (2001) حيث يتم نسبة اثنين من القمم عند 11.76 و11.82 جزء من المليون إلى مجموعة الكربوكسيل لاثنين من الأيزومرات الهندسية الناتجة عن تميؤ مجموعات الكربوميثوكسي 13. وبالمثل، لا يتمثل السبب في التميؤ أو الأكسدة ولكن التوازن بين الأدهايد وشكل الإينول؛ لذا ينبغي اعتبار أن الهيكل المقترح قابلاً للشك. كما يصف نفس الباحثين في نفس العمل أشكال الأدهايد الثنائي مفتوحة الحلقة 11a,b المعزولة عن أوراق الزيتون، غير أن بيانات الرنين المغناطيسي

شكل أدهايد أحادي مغلق الحلقة من أجليكون الليجستروسايد 6a,b (كاليبس وآخرون، 1993).

لم يتم الإبلاغ من قبل عن الشكل الإينولي لأجليكون الأوليوروبين 13 كأحد مكونات زيت الزيتون، ولكن فقط كأحد مكونات ثمار الزيتون غير المصنعة (بيانكو واوشيللا 2000) أو كمنتج تميؤ إنزيمي من الأوليوروبين (بيانكو وآخرون، 1999a). بيد أن هناك العديد من التناقضات في توصيف الرنين المغناطيسي النووي لهذا المركب (بيانكو واوشيللا 2000؛ بيانكو وآخرون، 1999a) والتي تحتاج إلى مراجعة. والأهم من ذلك، لم يذكر الباحثون القمة الحيوية للهيدروكسيل الإينولي عند 11.78 جزء في المليون. كما أشاروا إلى التحول الكيميائي للكربون الأوليفيني الذي يحمل مجموعة كربنوميثوكسي عند 130.37 جزء في المليون في حين أننا لاحظنا ذلك عند 103.69 جزء في المليون. وجاء البروتون الأوليفيني الإينولي عند 7.36 جزء في المليون كمجموعة ثنائية بقيمة اقتران 6 هرتز في حين أن الاقتران الحقيقي هو 16 هرتز، ومن الواضح أنه ليست هناك إشارة OH عند 7.40 جزء في المليون كما ذكر سابقاً. وثمة العديد من الاختلافات الأخرى في الرنين المغناطيسي النووي ( $^1\text{H}$  و  $^{13}\text{C}$ ) فضلاً عن العديد من ثوابت الاقتران المفقودة، وجميعها يجعل من الضروري توفير وصف أكثر اكتمالاً ودقة.

مضلل للغاية ويحتوي على العديد من عمليات العزو التي تحتاج أيضاً إلى مراجعة. ويعتبر التوصيف الذي ذكره بيانكو وآخرون (1999a) في تميؤ الأوليوروبين أكثر دقة ولكن ما تزال هناك عدة قمم لم يتم ملاحظتها (على سبيل المثال عند 56 جزء في المليون) أو جرى ملاحظتها عند تحولات كيميائية مختلفة

النووي الواردة غير مكتملة بالنسبة لكثير من ثوابت الاقتران. هذا إضافة إلى أن هناك التباس في العديد من الحالات في بيانات  $^{13}\text{C}$  بين القمم المنسوبة لكل من الاثنين من الدياستيريوايزومرات. وورد ذكر مركبات 11a,b في زيت الزيتون من قبل دي نينو وآخرون (2000)، ولكن توصيف الرنين المغناطيسي النووي



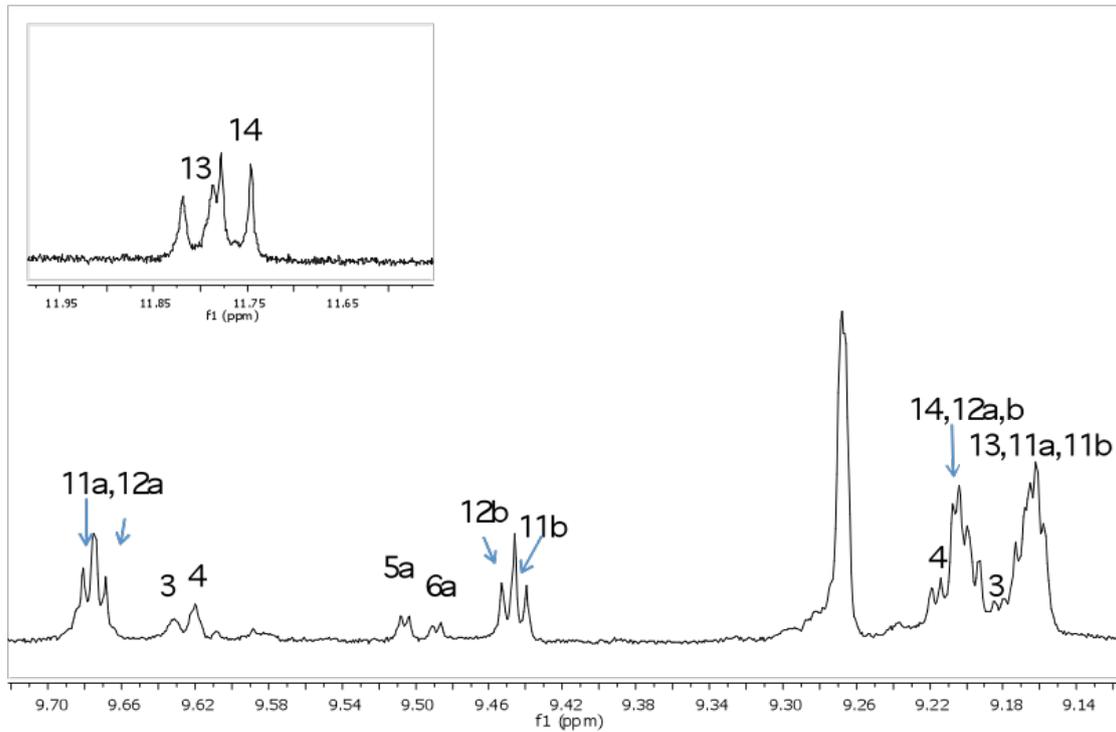
**الشكل رقم 4.** طيف الرنين المغناطيسي النووي  $^1\text{H}$  RMN بالنبض الحثي الانتقائي لزيت الزيتون النقي (أعلى) أو المحتوى المستخرج من زيت الزيتون المخفف في  $\text{CDCl}_3$  (أسفل). ويمكن ملاحظة قمة مركب oleokoronol عند 11.78 جزء في المليون في كلتا الحالتين مما يبين أن هذا المركب هو بالفعل مكون حقيقي في زيت الزيتون.

وللتأكد من أن مركب oleokoronol هو مكون حقيقي في زيت الزيتون وليس مادة مصنعة تنتج أثناء عملية استخراج زيت الزيتون أو تخفيفه مع مذيب الرنين المغناطيسي النووي ( $\text{CDCl}_3$ )، فقد أجرينا تجربة نبض حثي انتقائي في عينة زيت الزيتون دون استخدام المذيب مطلقاً كما هو موضح في الجزء التجريبي وقارناها بالمحتوى المستخرج من نفس زيت الزيتون المخفف في  $\text{CDCl}_3$ . ويتيح النبض الحثي الانتقائي ملاحظة القمم ذات التركيز المنخفض في وجود مكونات أخرى بتركيز عال جداً (مثل الدهون). وقد ورد سابقاً وصف تفصيلي للمنهجية المطبقة (ميليو وآخرون، 2015). وتمكنا في هذه التجربة من ملاحظة الهيدروكسيل منزوع الغلاف عند 11.78 جزء في المليون من شكل الإينول 14 لأجليكون الليجستروسايد في زيت الزيتون الكامل وفي المحتوى المستخرج من نفس زيت الزيتون (الشكل 4)، مما يثبت أنه عبارة عن مكون حقيقي في زيت الزيتون.

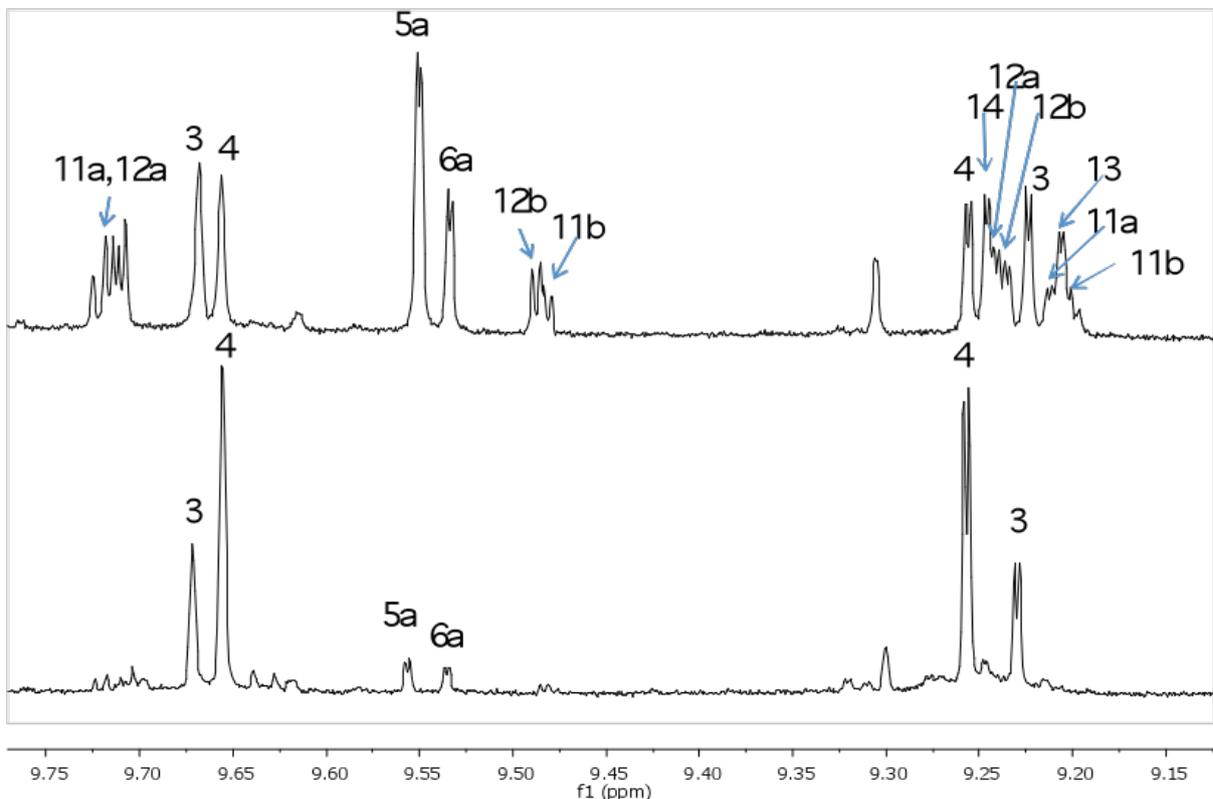
جداً (<5 جزء في المليون فرق للكربون الذي يحمل مجموعة الكربوميثوكسي) أو التي لم يكتمل بشأنها الوصف الخاص بنمط الانقسام وثوابت الاقتران المقابلة. وقد قدم كريستوفوريديو وديس (2009) الوصف الأكثر دقة في قسم من ورقة بحثية تتعلق بدراسة التميؤ الإنزيمي للأوليوروبين، غير أنه ما تزال هناك اختلافات ولم يتم توفير أية بيانات للرنين المغناطيسي النووي الخاص بالكربون.

ولتجنب الالتباس وتبسيط التسمية الخاصة بشكل الإينول 13، فإننا نقترح الاسم oleomissional بدلاً من enololeu- ropeindial الذي تم توصيفه بشكل خاطئ (بيانكو وآخرون، 1999a). وبالنسبة لأشكال الألدهايد الثنائي مفتوحة الحلقة لأجليكون الأوليوروبين، فإن الاسم الأنسب سيكون 4S/4R- oleuropeindial كما ورد سابقاً (بيانكو وآخرون، 1999).

وسبب الانحراف الملحوظ للتحويلات الكيميائية في طيف الزيت وللمزيد من التأكيد على الهياكل المقترحة، أجرينا التحول الإنزيمي للأوليوروبين إلى أشكال الحلقة المفتوحة. وفي ظل النقي هو وجود كميات عالية من الدهون.



الشكل رقم 5. طيف الرنين المغناطيسي النووي RMN H1 لنطاق الأدهايد الخاص بصنف زيت الزيتون كورونيكي الذي تم إنتاجه عند درجة حرارة منخفضة ومع زمن استرخاء قصير (مسجل عند 004 ميغاهرتز).



الشكل رقم 6. طيف الرنين المغناطيسي النووي RMN H1 لنطاق الأدهايد الخاص بالعينة المستخرجة من صنف زيت الزيتون ميشن (أ: أعلى) وصنف كورونيكي (ب: أسفل)، موضحاً القمم المطابقة للمركبات 3, 4, 5a, 6a, 11a,b, 12a,b, 13, 14. للمقارنة الملاحظة في المحتوى المستخرج من زيت الزيتون يختلف قليلاً عن ذلك الخاص بالمركبات النقية ويرجع ذلك إلى وجود الدهون في المحتوى المستخرج (غير مبيّن).

أن الأشكال الإينولية للأجليكونات هي مكونات فينولية رئيسية، على الأقل في أصناف معينة من زيت الزيتون. ويقدم التوصيف الكامل للمركبات الجديدة وبساطة تحليل الرنين المغناطيسي النووي الكمي منظورًا جديدًا لمراقبة الجودة المتعلقة بخصائص الحماية الصحية التي يتميز بها زيت الزيتون.

## شكر وتقدير

نود أن نتوجه بالشكر إلى تعاونية باليوباناجيا بمدينة لاكونيا وبستان زيتون بيركلي في ولاية كاليفورنيا لتقديم عينات زيت الزيتون، والسيدة ماركوميتشيلياكي من مزرعة فولفي لتقديم أوراق الزيتون، وكذا فينيا سمايرلي وستيلا كونستانوبولو لفصل الأوليوروبين، وبروفيسور ديوميدس لوغوثيريس لتوفير مرفق الرنين المغناطيسي النووي في جامعة كومنولث فرجينيا. وقد عبر A.V. و T.G. عن شكرهما للتمويل المقدم من SYNERGA- SIA 2011 PROGRAM. ويشارك في تمويل هذا البرنامج الصندوق الأوروبي للتنمية الإقليمية والموارد الوطنية (رمز المشروع 11SYN\_2\_1613). كما عبر P.D. و E.M. و P.M. عن شكرهم نظير الدعم المالي من مؤسسة Latsis.

## المراجع

- 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.

درجة الحموضة المناسبة، أمكن الحد من تحول الأوليوروبين إلى شكل الحلقة المغلقة 5a وتوجيه التحول فقط إلى أشكال الحلقة المفتوحة. وأظهر الخليط الناتج من المركبات نفس القمم تمامًا كما حدث مع الخليط المعزول عن زيت الزيتون، ومرة أخرى كان المشتق البارز هو شكل الإينول 13 المصحوب باثنين من الاستيريوايزومرات 11a و 11b.

فيما يتعلق بالقياس الكمي لأجليكونات الأوليوروبين والليجستروسايد، فقد عرضنا في عمل سابق طريقة مثبتة لقياس أشكال الأدهايد الأحادي مغلقة الحلقة 5 و 6 (كاركولا وآخرون، 2014). وباستخدام نفس المنهجية ومنحنيات المعايرة كان بمقدورنا الحصول على بيانات كمية لكل من أشكال الأدهايد الثنائي والأشكال الإينولية. ولا يتحقق الفصل التام لكل قمة إلا من خلال الرنين المغناطيسي النووي بحقول مغناطيسية عالية (>600 ميغاهيرتز)؛ غير أنه حتى عند 400 ميغاهيرتز، فإن تكامل الرنين المغناطيسي النووي في نطاق بروتونات الأدهايد بأكمله يمكن أن يوفر بيانات كمية لجميع أشكال الأجليكونات مفتوحة الحلقة بشكل إجمالي.

وفيما يتعلق بوفرة مركبي oleomis و oleokoronal و sional، تجدر الإشارة إلى أنه تم اكتشافهما لأول مرة في زيت الزيتون من صنف كورونيكي (الشكل 5) وميشن (الشكل 6a). ومن الجدير بالذكر أنه في معظم الزيوت التي خضعت للفحص، كان تركيز oleokoronal و oleomissional وكذا الأدهايدات الثنائية ذات الصلة أقل مما هو عليه في oleacein و oleocanthal، وانعدمت تمامًا في كثير من الحالات (الشكل 6b). ومع ذلك، يبدو أن oleokoronal أو oleomissional، في أصناف معينة ووفقًا لمعايير إنتاج الزيت، يمكن أن تمثل مركبات فينول رئيسية في زيت الزيتون. وثمة دراسة بحثية منفصلة تعمل على توفير المزيد من البيانات حول هذه المسألة وكذلك المزيد من البيانات الكمية..

## النتيجة

أجرينا في العمل الحالي عملية فصل وتوصيف بواسطة الرنين المغناطيسي النووي لسلسلة من المركبات التي تنتمي إلى عائلة أجليكونات الأوليوروبين والليجستروسايد، وقد تم اكتشاف بعضها لأول مرة كمكونات لزيت الزيتون. وتم اقتراح أسماء جديدة مثل oleokoronal و oleomissional و ligstrodial لتفادي الالتباس الناشئ عن استخدام أسماء معقدة أو مختصرة. وقد أثبت فحص الرنين المغناطيسي النووي المباشر لزيت الزيتون النقي

- tes 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. *<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C 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-hexanoate 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.
- 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 <sup>1</sup>H 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 <sup>1</sup>H 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  $\beta$ -glucosidase hydrolyses and activa-*

## مظاهر الصحة النباتية للزيتون في وسط جنوب إيطاليا بين الشدائد والملاحظات وحالات الطوارئ الجديدة

2ي زوت ل.، 1يرازي ف. ف.

<sup>1</sup> مركز البحوث لزراعة الزيتون وصناعة الزيوت (CRA-OLI)، 87036، C.da Li Rocchi-Vermicelli، Rende (CS)، إيطاليا (الكتاب للمراسلات)، الإيميل: [veronica.vizzarri@entecra.it](mailto:veronica.vizzarri@entecra.it)

<sup>2</sup> قسم العلوم الزراعية والبيئية والغذائية، جامعة بيروجيا، Borgo XX Giugno, 74, 06121، بيروجيا، إيطاليا، الإيميل: [laura.tosi@unipg.it](mailto:laura.tosi@unipg.it)

### الملخص

تتطلب البيئة الاقتصادية والاجتماعية والثقافية والبيئية لشجرة الزيتون في إيطاليا وبلدان البحر الأبيض المتوسط الأخرى والحفاظ على بساتين الزيتون الموجودة والزراعة في المناطق الجديدة أو حتى دخولها في مناطق خارج أوروبا اهتماماً كبيراً لقضايا أمراض النبات الزراعية ودراسة مستمرة للجوانب الزراعية والوبائية للأمراض النباتية والآفات. وبالتالي، تشير هذه المذكرة إلى الوضع الحالي لقضايا الأمراض النباتية للزيتون في ضوء تغير المناخ، وتُظهر كيف يمكن أن تؤثر على عودة ظهور أمراض معروفة بالفعل، مع التركيز على حالات الطوارئ الجديدة وتوفير المعلومات عن أحدث الاستراتيجيات للإدارة المتكاملة للآفات المستدامة.

### 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.

## مقدمة

تضم مستويين من التطبيق (الإدارة المتكاملة للأفات والزراعة العضوية)، يتم توريد المبادئ العامة للإدارة المتكاملة للأفات، والتي تصبح إلزامية. وباختصار، فإن التشريعات الجديدة تبنى الدفاع على الوقاية، وذلك باستخدام تأزر القدرات والميزات التي تقدمها مختلف وسائل النضال من أجل السماح لتوفير الحماية الكاملة للمحصول، دون الإقتصار على احتواء مرض نباتي واحد، والتصرف بسرعة عندما تظهر حالات طوارئ جديدة (مثل التجفيف السريع للزيتون). يتطلب تحقيق الحماية العقلانية للمحاصيل التحديث المستمر والمتواصل للمعارف والتكنولوجيات والتقنيات والتكامل المتزايد من مهارات مختلفة.

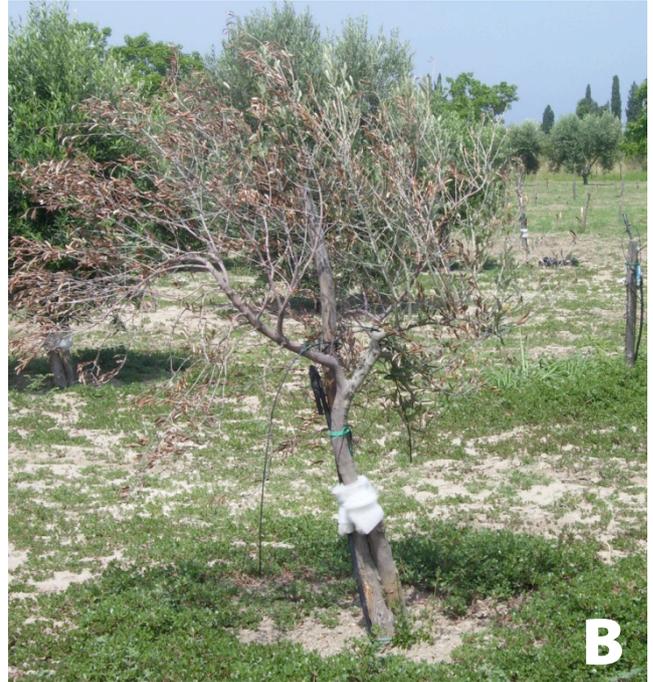
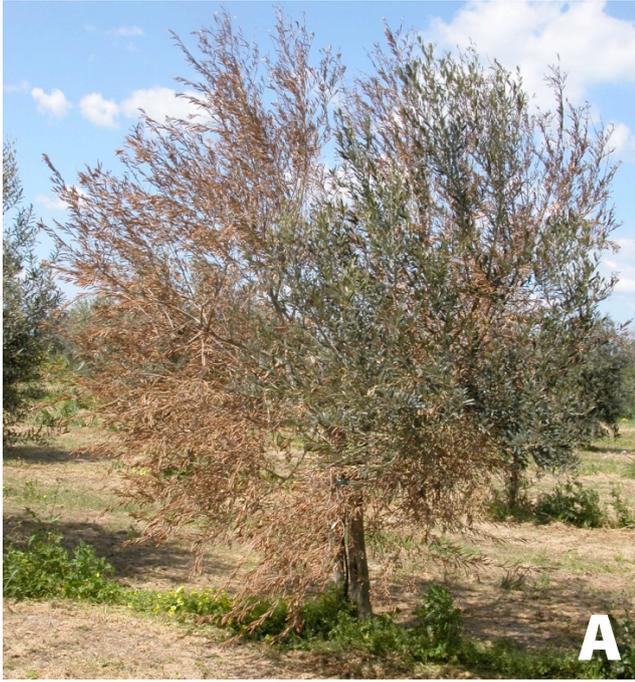
## الجوانب الوبائية للكبوكبية وتأثير حماية المحاصيل

هذه النباتات اللازهرية، المنتشرة منذ سنوات عديدة في بساتين الزيتون في وسط جنوب إيطاليا وحتى في بلدان مختلفة في منطقة البحر الأبيض المتوسط (إسبانيا، اليونان، تونس، المغرب، سوريا، وما إلى ذلك)، تسبب مشاكل على حد سواء في البساتين القديمة وفي بساتين الزيتون الحديثة والمروية في أغلب الأحيان. أظهرت البحوث التي أجريت في بساتين الزيتون في وسط إيطاليا (أومبريا، توسكانا) وفي الجنوب (كالابريا وصقلية وبوليا)، منذ التسعينات (توزي وزازيريني، 1998؛ 2000؛ تشيكاريزي 2003، فيزارى، 2005)، أن العوامل المناخية والزراعية والمظهرية المتعلقة بزيادة حدوث وشدة المرض، وبظاهرة الانتعاش الطبيعي للأشياء المصابة (وهي ظاهرة ليست نادرة)، قد تؤثر بشكل مختلف على تطوير الكبوكبية (الشكل 1) وبالتالي إحباط تدابير الصحة النباتية.

تعتبر شهادة الصحة النباتية للنبات مهمة جدًا ليس فقط في إنشاء بساتين جديدة ولكن أيضًا في تجديد بساتين الزيتون القديمة مع زيادة الكثافة النباتية، كما حدث خلال العقدين الماضيين في اليونان وإسبانيا وحتى إيطاليا، على حد سواء في المحاصيل الجافة والمروية (نافارو وبارا، 2008). وفي هذا الصدد، كشفت بعض البحوث التي أجريت في بوليا (نيجرو وآخرون، 2005)

يظهر قطاع الزيتون الإيطالي، في جميع أنحاء الإقليم، حالات مختلفة جدًا مما قد يفسر فقدان القدرة التنافسية للبلاد. في الواقع، على عكس إسبانيا، ما زالت تمارس زراعة الزيتون في إيطاليا في الأراضي الهامشية حتى وإن كان، كما يحدث في المناطق الجنوبية، هو الخيار الوحيد لاستغلال بعض الأقاليم. على الرغم من بعض نقاط الضعف مثل انخفاض سطح المعدل الوطني، 70% من مزارع الزيتون لها مساحة أقل قليلاً من هكتارين، إلا أن هناك بعض نقاط القوة الممتلئة في اتساع تراث الأصناف، حتى لو عشرة فقط هي الأصناف الأكثر شيوعًا على المستوى الوطني، تحتل مساحة 475000 هكتار، حوالي 42% من المجموع (ماداو، 2009). ومن بين هذه الأصناف نجد كوراتينا، أوليارولا، سالينيتينا وتشيلينا دي نارودو، على نطاق واسع في بوليا، وغيرها من التي تزرع في كثير من الأراضي الإيطالية (كاروليا، فرانتويو، ليتشينو). ما لا يقل عن مائة أصناف أخرى، لا تزال قليلاً جدًا (بين 1000 و10000 متر مربع) ولكن، نظرًا لخصائص النويات، والتي تهدف للاستهلاك المباشر أو لنوعية النفط، تمثل موارد كبيرة خاصة لإيجاد مصادر جديدة لمقاومة الشدائد الأحيائية التي غالبًا ما تؤثر على إنتاج الزيتون، وكذلك لتوجيه المحاصيل في أفضل المناطق لأنها أكثر سهولة للتكيف مع أنواع التربة المختلفة والظروف المناخية للأراضي الإيطالية.

الصحة النباتية للزيتون، وتظهر من بين الأمراض المعروفة بالفعل مرض الكبوكبية (Verticillium)، وهو مرض يصيب الأوعية الدموية لا تزال مواجهته صعبة، ومرض anthrac-nosys الذي يعتبر طفيف والذي يظهر في السنوات الأخيرة زيادة كثافة الهجمات في بعض مناطق الزيتون، ويركز أخيرًا على اثنين من المحن الناشئة. والهدف من هذا الاستعراض هو، بالتالي، تسليط الضوء على أن التطور وتبنى أساليب النضال لا يستغنيان عن معرفة دقيقة ومحدثة لتقنيات الزراعة التي، حينما تتعدل، تؤثر على النظام البيئي الزراعي للزيتون مسببة تأثير على حدوث وشدة المحن مثل تلك المذكورة أعلاه. وقاية النبات الحديثة، كما تشترطها توجيهات الاتحاد الأوروبي 128/2009 CE، التي نفذت في إيطاليا من D.L. رقم 150/2012، يتناول بشكل واسع وعضوي الجوانب المتعلقة بالأثر البيئي وسلامة الغذاء بسبب استخدام منتجات حماية المحاصيل. اعتباراً من 2014/1/1، من خلال خطة العمل الوطنية (PAN) التي



الشكل 1 - كيكوبية الزيتون مظهر نموذجي للنوبة المزمنة أو التدهور البطيء (أ) والنوبة الحادة أو السكتة (ب).

أنواع الأمراض ND تحدد أعراض مشابهة، ولكن خطورتها خفيفة أو معتدلة.

بشكل عام، الاختلافات في الفوعة واضحة أيضًا بين أصناف الزيتون المختلفة، والالتهابات التي تسببها أنواع الأمراض D تبدأ في وقت سابق وتتقدم بشكل أسرع وأكبر كثافة (رودريغيز-خورادو وآخرون، 1993؛ لوبيز-اسكوديرو وآخرون، 2004؛ مارتوس-مورينو وآخرون، 2006؛ درفيس وآخرون، 2010).

وعلاوة على ذلك، فمن المعروف أن استنساخ الممرض له طبيعة لاجنسية، إذًا تتمثل الاحتمالات الوحيدة التي يمكن أن تضمن تبادل المادة الوراثية في التفرع الخوطي (اندماج من خيوط بين معزولات متوافقة نباتيًا) ومن تغاير النوى اللاحقة (اندماج النوى). على الرغم من أن العديد من الدراسات قد وجدت ارتباطًا بين مجموعات التوافق النباتي (VCG) والتنوع الجيني (الجزئية)، فإن العلاقة بين خصوصية المضيف، الفوعة من مسببات المرض والتوزيع الجغرافي أكثر تعقيدًا ويصعب تفسيرها. في الواقع، على الرغم من أن في جميع البلدان تم الإبلاغ عن نوع المرض المسقط (بيريز-آرتس وآخرون، 2000؛ كولا-دوروميرو وآخرون، 2006؛ درفيس وآخرون، 2010)، وصُنّف على أنه ينتمي إلى مجموعة VCG 1A، وتم تعزيز pathotype ND إلى المجموعات الأخرى (VCG 2، VCG 4)، أظهرت بعض الأبحاث أنه لا توجد هناك علاقة بين الأمراض من عزلات الزيتون والمجموعات VCG (تانانوى

عن وجود الكيكوبية (*Verticillium dahliae*) في 50% من المشاتل التي تم تحليلها، وكذلك لوحظ في أومبريا حالات الكيكوبية في النباتات الصغيرة، وكذلك في بساتين الزيتون المستعادة بسبب مواد الإكثار المصابة (توزي).

تديج نيتاس) ملاءةً وركذملا تلاحلا نم لك في بجيد داوم مادختسا طبتري نأ، (ضرملا تجميتت تميملا تاتابلا لادبتساو الإكثار الصحية مع اختيار أصناف مقاومة أو استخدام الأصناف المطعمة على اصول مقاومة للكيكوبية. هذه الوسيلة للنضال تعتمد بشكل قوى على بعض الخصائص البيولوجية للمرض (كثافة اللقاح في التربة، والفوعة من العزلات)، والظروف البيئية ونتائج فحص المقاومة، التي لا تتفق دائمًا نتيجة لاستخدام عزلات مختلفة من الكيكوبية، وأساليب مختلفة من التلقيح والظروف التجريبية المستخدمة لتقييم المقاومة. وبالتالي، تشير إلى ضرورة اعتماد بروتوكولات تجريبية موحدة ومعترف بها دوليًا لهذا الجانب الأخير.

بناءً على فوعة الزيتون، تصنف العزلات الكيكوبية تقليديًا كأنواع أمراض (pathotypes) مزيلات الورق (D) وغير مزيلات (ND) حسب القدرة على تحديد السقوط الكامل لأوراق الشجر الخضراء (رودريغيز-خورادو وآخرون، 1993). وبالأخص، فإن أنواع الأمراض D، معزولة عن الزيتون والقطن، قادرة على إظهار الفوعة على كل من المضيف مع الأعراض التي تتعلق بالذبول، الاخضرار، تساقط الأوراق وموت النبات، في حين أن

أخرى من (الزيتون) أوليا يوريبا أو الأنواع المختلفة للأوليا نتاج متباينة. يمكن في الواقع، أن يتغير رد فعل النمط الجيني الوارد في الظروف التجريبية نتيجة العوامل البيئية والبيولوجية والزراعية التي سبق ذكرها (بلانكو-لوبيز وآخرون، 1998). يمكن أن تتغير القوة في الظروف الطبيعية بسبب ظاهرة إعادة الهيكلة (الانتعاش الطبيعي) للنباتات المصابة التي يلاحظ فيها انسحاب مؤقت للأعراض (حتى أكثر من 2-3 سنوات) مع صدور الغطاء النباتي الجديد تحت الفروع المجففة (توزي وزازيريني، 1998؛ 2000؛ تراييرو وبلانكو، 2001؛ تشيكاريزي، 2003). وبالتالي، يتطلب وجود إصابات جديدة لتحديد استئناف المرض. ويعتقد أن هذه الظاهرة ترجع إلى تفعيل استجابات الدفاع للمضيف مع إنتاج المركبات الفينولية، وانسداد الأوعية الخشبية المصابة مما يترتب على ذلك تعطيل الكبوكبية. قد لوحظت ظاهرة الاستعادة، المعتمدة على فوعة العوامل المسببة للأمراض ومقاومة الأصناف، أكثر في بساتين الزيتون في وجود أنواع الأمراض ND (-pathot) (types ND) وأصناف مقاومة (توزي وزازيريني، 1998، 2000؛ فيزاري، 2005، لوبيز-اسكوديرو وآخرون، 2004؛ مارتوس - مورينو وآخرون، 2001). وهذا يمكن أن يتيسر من خلال اعتماد الممارسات الثقافية المناسبة، الأسمدة النيتروجينية المتوازنة، والقضاء على الأعشاب الضارة من خلال القص لتجنب الحرق الذي يمكن أن يؤدي إلى إصابات وتعزيز إصابات جديدة، بالإضافة إلى استخدام التشميس في جميع أنحاء الأرض حول النباتات لتقليل كمية لقاح الكبوكبية (توزي وزازيريني 1998، 2000؛ تشيكاريزي، 2003؛ تراييرو وبلانكو، 2001). في المقابل، في دراسة حديثة، أجريت في بوليا (جنوب إيطاليا)، بحضور الزيتون الشباب (5-12 سنة) من الصنف عرضة بيلا دي تشيرينولا (-Bella di Ceri gnola) وفي وجود كثافة معتدلة من لقاح الكبوكبية (-pathot) (type ND) في الأرض، تم تسليط الضوء على أن إعادة تأهيل النباتات، اصطناعياً بمفرده وبالاشتراك مع حروق الشمس، سياناميد الكالسيوم وعملية السرطنة، هي نتيجة منخفضة نوعاً ما، ومقتصرة على سنة واحدة (بوبيتشي و تشيرو، 2014).

يجب في مناطق زراعة الزيتون الإيطالية، وفقاً لطبيعة الكبوكبية، معظم انتشار أنواع المرض ND وعدم القدرة على القضاء على هذا المرض، أن تستند استراتيجيات التحكم على تطبيق الممارسات الزراعية التي تتفاعل مع خصائص بيولوجية معينة للمرض والظروف البيئية التي يمكن أن توفر الآثار المفيدة، إن لم تكن تآزرية، في احتواء هذه المحنة.

وآخرون، 2002)، وكيف ضمن مجموعة VCG 1A/D، تظهر بعض العزلات D فوعة (شدة الأعراض)، في التطعيمات الاصطناعية، مماثلة لتلك التي توجد في pathotypes ND (درفيس وآخرون، 2010).

يبدو أن التوصيف والتمايز الجيني لعزلات الكبوكبية للزيتون التي تم دراستها باستخدام التقنيات الجزيئية (RAPD، AFLP و PCR مع علامات محددة)، يظهرون أن ضمن مجموعة معينة من مجموعات التوافق النباتي (VCG) هناك تشابه على المستوى الجزيئي. هذه المجموعات من العزلات متعلقة بخصوصية المضيف والأصل الجغرافي (كولادو-روميرو وآخرون، 2006؛ 2008) على الرغم من أنه تجدر الإشارة إلى أن لم تظهر أنواع المرض VCG 1A/D، المعزولة عن أشجار الزيتون في تركيا، ومختلفة جزيئياً عن تلك الإسبانية، اختلافات كبيرة في الفوعة في اختبارات الأمراض (درفيس وآخرون، 2010). قد أظهرت الأبحاث التي أجريت في مناطق زراعة الزيتون في حوض البحر الأبيض المتوسط أن أنواع الأمراض D (pathotypes D) انتشرت بسرعة في إسبانيا (ميركادو-بلانكو وآخرون، 2003؛ نافاس-كورتيس وآخرون، 2008). وأفادت التقارير أن في تركيا زيادة في فوعة العزلات التي تنتمي إلى المجموعة VCG 1A/D (درفيس وآخرون 2010)، بينما يبدو أنه تسود في إيطاليا الأنواع ND (نيجرو وآخرون 2005، فيزاري 2005). لا عجب، إذن، أن هناك اختلافات بين نتائج اختبارات المقاومة في ظروف اصطناعية وتلك المتعلقة بالملاحظات على سلوك الأصناف الذي يمكن أن يتأثر إلى حد كبير بالظروف البيئية، وكمية اللقاح الخاص بمسببات المرض في التربة، والفوعة وأيضاً بالممارسات الزراعية المتبينة. تشير البحوث التي أجريت في مختلف البلدان لأكثر من أربعين عاماً في الظروف الطبيعية والتجريبية، إلى أن الأصناف الأفضل محصولية هي أكثر عرضة لأنواع الأمراض D (pathotypes D)، على سبيل المثال بيكوال، هوجيبلانكا، أريكانا، مانزانلا دي اشبيلية (إسبانيا)، القلمون، أمفيسيس، كونسيرفوليا (اليونان)، اسكولانا، ولينشينو (إيطاليا). تم الإفصاح عن المستويات الأعلى من المقاومة في الأصناف أوبلونجا، شنجلو ريال، أمبلتر وفرانتويو (لوبيز-اسكوديرو وميركادو-بلانكو، 2011).

يتمثل بديل آخر في اصول المقاومة: سيفيانو (هارتمان وآخرون، 1971)، وكونسيرفوليا (تجاموس وآخرون، 1985)، وأظهرت المطعمة على أوباونجا مقاومة نحو الكبوكبية، على الرغم من أنه قد أظهرت تطعيم أصناف

بالمعنى الدقيق، المسؤول خصوصاً عن انتشار أمراض الـ an-thracnosys في البرتغال (تالهنهاس وآخرون، 2011)، من شجرة الزيتون في إيطاليا، على الرغم من معرفة العامل المسبب لـ anthracnosys الفراولة في مناطق مختلفة بما في ذلك بوليا وكالابريا. وبالمثل، لم يعزل الـ C.acutatum بالمعنى الدقيق للكلمة (المجموعة الأولى A5) عن شجرة الزيتون في إيطاليا وهو النوع السائد في مناطق زراعة الزيتون في نصف الكرة الجنوبي (فايدا وآخرون، 2011). في الأساس، تعتبر عدة أنواع من الـ Colletotrichum هي المسؤولة عن anthracnosys الزيتون وتشير الأبحاث، مع استثناءات قليلة، أن بعض الأنواع هي السائدة في منطقة معينة للزيتون وتسلط الضوء على تعديل محتمل للظروف البيئية والخصائص الجينية للمضيف.

يتبين مما تقدم أن فوعة الممرض والتعرض للظروف البيئية هي العوامل التي تسبب التهابات الـ Colletotrichum. وتشير النتائج الأخيرة من وجهة نظر وبائية إلى أنه في ظل الظروف الطبيعية، تجري الالتهابات المنقولة من الزهور والثمار الصغيرة في الربيع عندما تكون ظروف درجة الحرارة والرطوبة مواتية. خلال نمو النويات في أشهر الصيف، التي تتميز بفترات حارة وجافة، تصبح العدوى كامنة وتشكل المصدر الرئيسي للفاح لمواجهة أوبئة الخريف. يمكن أن يخترق الممرض مباشرة، ويجعل ثقب في الجزء الخارجي للنويات من خلال إنتاج cutin-ases خارج الخلية، ولكن تزيد شدة الإصابة ومعدل الاستعمار بشكل كبير في وجود شقوق صغيرة تسببها لدغات وضع البيض أو ثقب خفان ذبابة ثمار الزيتون (Bactrocera oleae Gmelin). يشجع نشاط اليرقات الغذائي استعمار مسببات المرض وتقدم نضج الزيتون، ويمكن أيضاً أن تسهم الحشرة في تشتت الغبيرات.

تزيد قابلية النويات مع نضوجها وفي ظروف مواتية وهي تخضع للتغفن (الشكل 2) والتحنيط، مما يؤدي إلى خسائر فادحة في الكمية والنوعية، وخاصة بالنسبة لنوعية الزيت الرديئة. بالإضافة إلى ذلك، يقع الممرض على سطح الثمار المصابة مما يؤدي، إذا استمرت الظروف البيئية المواتية، إلى دورات عدوى ثانوية. وتسمح الثمار المحنطة التي تتشبت بالفروع، لبقاء مسببات الأمراض في فصل الشتاء وهي تمثل مصدر اللقاح للموسم التالي. المعلومات حول قابلية/مقاومة الأصناف المختلفة ليست بمعزل عن التناقض، ليس هناك دائماً تحديد واضح للأصناف، وتناقض النتائج التي حصل عليها من قبل المختبر حول الملاحظات في هذا المجال. وفي هذا الصدد، هناك علاقة أكبر من البيانات إذا كانت تتم العدوى الاصطناعية، تحت ظروف خاضعة للرقابة، على نويات

## الجوانب الوبائية لـ anthracnosys وتأثير حماية المحاصيل

يوجد anthracnosys أو الجذام الحاضر الآن في العديد من مناطق الزيتون في العالم، منتشر منذ فترة طويلة على نطاق واسع في بعض بلدان حوض البحر الأبيض المتوسط، وإن كان ذلك مع كثافة مختلفة نتيجة لخريف معتدل وماطر. لوحظ في إيطاليا أن المرض أكثر تواتراً وشدة في بعض المناطق الجنوبية (بوليا، كالابريا)، أيضاً في سردينيا وصقلية وأحياناً في أومبريا وتوسكانا. من أول انذار في بوليا (تشيكاروني، 1950)، أظهرت العدوى اتجاهات الوباء في مناطق جنوب إيطاليا لمدة عشرين سنة على الأقل ومن ثم انحدرت (بوليا، سردينيا وصقلية). عزت هذه الظاهرة في البداية إلى فقدان فوعة العامل المسبب، ونتيجة لذلك، فقد نُسبت إلى اتجاهات موسمية أكثر جفافاً نتيجة لتغير المناخ في العقدين الماضيين. يمثل كل من بيانا دي جويبا تاورو (كالابريا) وسالنتو (بوليا) استثناء، حيث لاتزال تساعد الظروف البيئية ظهور أوبئة كبرى (كاتشيولا وآخرون، 2012).

وقد أُشير أن أنواع مختلفة من الـ Colletotrichum هي المسؤولة عن الـ anthracnosys في مختلف البلدان التي ينتشر فيها المرض. أظهرت مؤخراً دراسات مورفولوجية وجزيئية (فايدا وآخرون، 2011) أن C. clavatum (المشار إليه سابقاً بـ C. acutatum المجموعة الجزيئية A4) قد تسبب في نقشي أوبئة خطيرة في اليونان، الجبل الأسود، وفي بعض المناطق المحظورة البرتغالية والإسبانية والإيطالية. على وجه الخصوص، في المناطق الجنوبية الإيطالية، من خلال اختبارات التوافق الخسري، (اجوستيو وآخرون، 2002)، لربط المنشأ الجغرافي والمستوى الجزيئي (عن طريق RAPD)، قد تم تحديد مجموعتين للتوافق النباتي (VCG) في سكان من Colletotrichum: واحدة تتألف من عزلات أصلها بوليا، والثانية تضم الكتل القادمة من كالابريا، سردينيا وأومبريا والعزلة اليونانية (CBS 193.32) التي أودعها بيترى في عام 1930. يشير وجود مجموعتين متميزتين للتوافق النباتي (VCG) في بوليا وكالابريا أن الـ C.clavatum دخل إيطاليا عن طريق البلقان في أوقات مختلفة، وربما خلال سنوات 1930 - 1940 (اجوستيو، 2010) وانتشر بعد ذلك، من خلال انتشار المواد المعدية من كالابريا إلى مناطق أخرى (سردينيا، أومبريا). مع ذلك، فإنه لا يمكن استبعاد أنه كان هناك إدخال واحد من مسببات المرض وأنه قد نشأت مجموعات مختلفة للتوافق النباتي (VCG) في مختلف البلدان نتيجة لعملية التنوع الناجمة عن العزلة الجغرافية. وهكذا، لم يتم عزل الـ C. simmond-sii (الذي حدد في البداية كمجموعة A2 من C.acutatum)

والحد من إصابة النويات. القضية الأساسية هي التدخل في مرحلة ما قبل الإزهار لاحتواء العدوى الكامنة، وتطبيق المنتجات القائمة على النحاس في مرحلة ما بعد البوتينغ للحد من تلك العدوى الثانوية (نيجرو وآخرون، 2011؛ كاتشيولا وآخرون، 2012). في إيطاليا، قد أذنت وزارة الصحة مؤقتًا، منذ عام 2011، استخدام الـ pyraclostrobin في تطبيق واحد، بين شهري يوليو وأغسطس، على أشجار الزيتون في كالابريا مع الضغط المرتفع للأمراض، ولكن ثبت أن هذا العلاج غير فعال إلى حد ما (كاتشيولا وآخرون، 2012).

## طوارئ الصحة النباتية الجديدة: مجمع التجفيف السريع للزيتون

التقرير الأول لمجمع التجفيف السريع للزيتون، (CoDiRO Olive Quick Decline Syndrome، بالإنجليزية (OQDS)، في بعض بساتين سالنتو (بوليا، جنوب إيطاليا) والذي يعود تاريخه إلى عام 2010 (سابوناري وآخرون، 2013) ومن هنا، انتشرت الأمراض النباتية بسرعة، مؤثرة في عام 2013 على مساحة تبلغ حوالي 10000 هكتار. وتتميز أعراض هذا المرض عن طريق التجفيف المفاجئ للأغصان والفروع التي تمتد إلى أوراق الشجر مما يؤدي إلى موت النبات. وبالتالي تظهر هوامش الورقة مصفرة ثم تصبح بنية اللون حتى تجف. تُظهر المقاطع العرضية من الجذع والفروع والأغصان إسمرارًا، أكثر أو أقل امتدادًا، للعناصر الوعائية. تعتبر الأشجار القديمة هي الأشد ضررًا، وعندما تموت، فإنها تظهر مجففة مع انبعاثات وفيرة من الشكير في الجزء الأوسط بين الجذر والجذع من الشجرة، نتيجة لتشنج جذري من قبل المزارعين على أمل أن يصدر غطاء نباتي جديد (الشكل 3).

سمحت دراسات سببية طويلة ومعقدة، ليست قاطعة وشاملة، (التالي: أ) تحديد، من خلال مقاييسات مصلية وجزئية، أشجار الزيتون التي يظهر عليها أعراض المرض، ولكن أيضًا في نباتات الدفلى وأشجار اللوز مع تجريد الأوراق، وأنواع أخرى من الأشجار والأعشاب، البكتيريا سلبية الغرام - *Xylella fastidiosa* (ويل وراجو). باوكا (كاريدى وآخرون، 2014؛ لوكنسولى وآخرون، 2014)؛ ب) عزل البكتيريا في المحاصيل النقية (البابو وآخرون، 2014)؛ ج) تسلسل جينوم البكتيريا (جامببتروزى وآخرون، 2015)؛ د) إثبات أن *Philaenus spumarius* L، المعروف باسم Frogopper لإصدار إفراز غدي بطنى أبيض يحيط كالرغوة الحوريات الشابة لحمائتها

غير ناضجة وأكثر إضرارًا من تلك الناضجة، لأن قابلية الفاكهة تزيد مع النضج. أوتوبراتيكا، كورنيولا، سترانا، كاروليا، بيكودو، ومورونامزانيا دي اسبيلية هي من بين الأصناف الأكثر عرضة، بينما تعتبر فرانتويو، ليتشينو، سانتوماورو، بيكوال، بلانكيثا، كورونيكي ورازولا قابلة للمقاومة (كاتشيولا وآخرون، 2012). وبالتالي، فإن استخدام أصناف أقل عرضة أو مقاومة هو وسيلة صالحة لاحتواء المرض في وقت إنشاء بساتين جديدة. في المقابل، فإنه يستحسن في بساتين الزيتون القائمة، حيث توجد أصناف

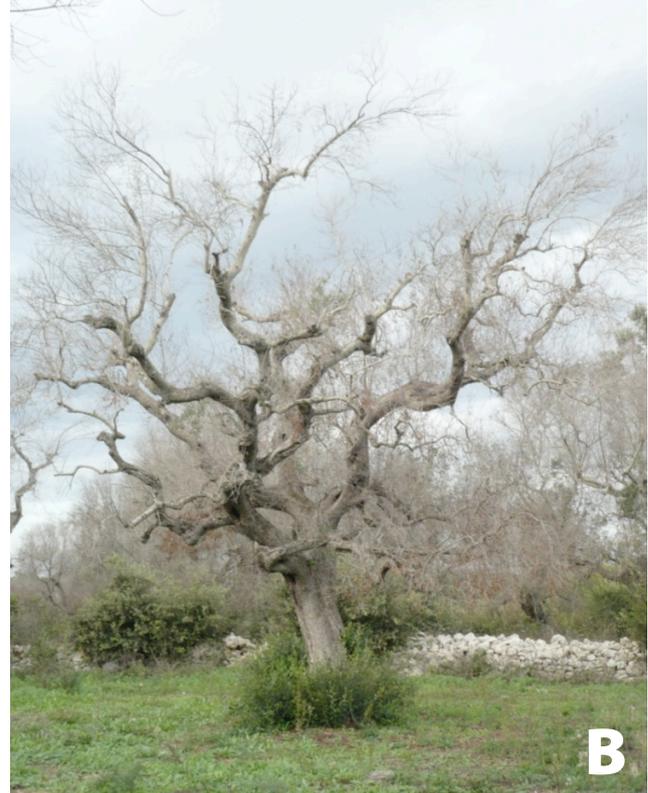


الشكل 2 - الزيتون المصاب بالجذام. أعراض نموذجية للإصابة بـ "وجه القرد" في النويات المصابة بهجوم من قبل مرض *Colletotrichum gloeosporioides* مع ظهور فطر *acervuli* بوضوح.

عرضة أو ظروف بيئية مواتية لتنمية الـ *anthracnose*، تنفيذ التقليل لإزالة الفروع والأغصان المصابة والفواكه المحنطة من أجل تقليل كمية اللقاح وتشجيع المزيد من تهوية المظلة وذلك للحد من الرطوبة داخل الغطاء النباتي وتقدم جمع النويات. ومع ذلك، يجب أن تكون هذه الوسائل للدفاع متكاملة مع المعالجة الكيميائية، وهي ليست حاسمة لكنها ضرورية لتجنب الأوبئة الخطيرة. ويستحسن التدخل مع المنتجات القائمة على النحاس، لصالح تركيبات منخفضة الجرعة من أيونات النحاسيك والتي تتميز بالالتصاق والمثابرة، والتي إذا تم تطبيقها قبل الإزهار وبعد الفاكهة ضد عين الطاووس، تساعد للاستفادة من النشاط الجانبي بالنسبة للـ *anthracnose*. يجب أن تتكرر العلاجات القائمة على النحاس خلال نمو النويات وقبل البوتينغ. للأسف يجب في السنوات الرطبة وفي حضور أشجار الزيتون، مراقبة التوزيع الصحيح والموحد للمنتجات الصحية للنبات في أوراق الشجر. أجريت مؤخرًا اختبارات في بساتين الزيتون في بوليا لمقارنة فعالية بعض استراتيجيات الدفاع التي تنطوي على استخدام المنتجات القائمة على النحاس، *pyraclostrobin* وخليط *tebuconazole+tryfloxystrobin*. أظهرت التجربة أنه إذا ارتبط الـ *pyraclostrobin* بالنحاس وخليط *tryfloxystrobin* + *tebuconazole* تظهر فعالية عالية ضد مسببات المرض

وبائية، هي أكثر قدرة على نقل البكتيريا، مثل *X. fastidi-osa*. في الواقع، حيث أن هذه البكتيريا الأخيرة خشبية وديمة الأبوغ، لا يمكن أن تنتقل إلا عن طريق الحشرات التي جهازها الفمي مصاص وخارق (تسمى *xilemomizi*). عند الحصول

من الجفاف والأعداء الطبيعية، هو النوع الوحيد الذي يمكن أن ينقل البكتيريا (سابوناري وآخرون، 2014). في سالنتو، هذه الحشرة المنهومة والتي لديها القدرة على التكيف البيئي الجيد لا تسبب اضرار مباشرة كبيرة للمحاصيل، ولكن من وجهة نظر



الشكل 3 – الجفاف الكلي السريع للزيتون (CoDiRO). مظهر جفاف نموذجي للأوراق كما يعرف بـ "جلد النمر" لمنطقة التاج (أ) والجفاف الكلي للنبات نتيجة انسداد الأوعية للمفاوية (ب).

مجموعة من نباتات القهوة للزينة المصابة بـ *Xylella*، المستوردة من كوستاريكا. لذلك فمن المحتمل جداً أن السلالة CoDiRO من أصل كوستاريكي، كما تؤكد التحليلات الجزيئية (جاميتروزي وآخرون، 2015).

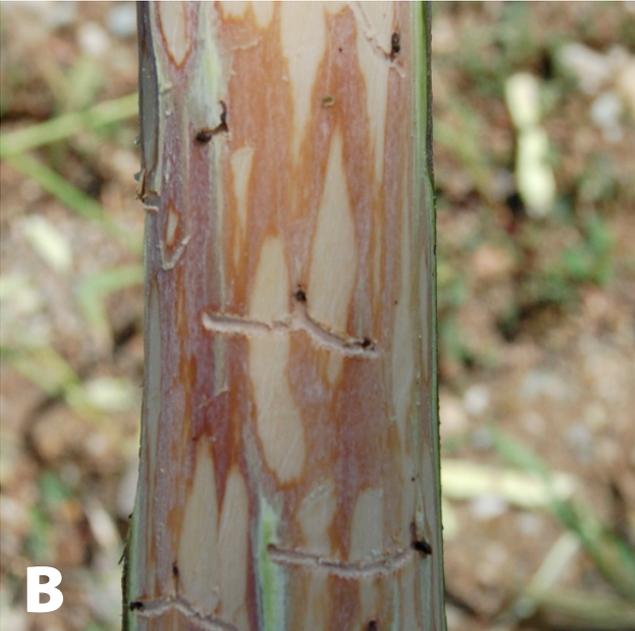
على البكتيريا، يمكن للحشرات الناقلات من خلال التغذية أن تلحقه في الأنواع البرية والمزروعة ولكن يمكن أن تتضاعف فقط في المضيفات المعرضة للإصابة مما يؤدي إلى إصابات كامنة أو نباتات ذات أعراض مرضية. وقد أبرزت التحقيقات في هذا المجال حشرات ناقلات أخرى محتملة (البابينو وآخرون، 2014b)، على الرغم من أنه لم تثبت العدوى حتى الآن.

يمكن تلخيص الإطار التنظيمي المحدث إلى الوقت الحالي على النحو التالي: 19 يونيو 2015، وفق المرسوم الوزاري "تدابير الطوارئ للوقاية والسيطرة واحتواء *Xylella fastidiosa* (ويل وراجو) في أراضي الجمهورية الإيطالية" الجريدة الرسمية رقم 148 في 29 يونيو 2015، تطبيقاً للقرار (2015/789) للجنة الأوروبية في 18 مايو 2015، الذي يهدف إلى تعزيز إجراءات الحماية لمنع دخول وانتشار البكتيريا. يلغى القانون الساري منذ 30 يونيو 2015، الأحكام السابقة على 26 سبتمبر 2014 و 17 مارس 2015، وتنفيذاً لقرار الاتحاد الأوروبي رقم 497/2014. ومن بين أهم جوانب القانون: تعزيز الرقابة على كامل الأراضي الوطنية، وتعريف المناطق المحددة، التي تتألف من المنطقة

*X. fastidiosa* هو ممرض ينتمي إلى الحجر الصحي، و مدرج في القائمة A1، A1، الأول، الجزء A، القسم الأول، توجيه الاتحاد الأوروبي 2000/29CE، والأمراض المتوطنة في الأمريكتين، حيث تسبب الصفار المنوع لأشجار الحمضيات (كوستاريكا والبرازيل) ومرض بيرس على الكرمة (كاليفورنيا). يعزى دخوله، في منطقة خالية في السابق، إلى تجارة المواد النباتية المصابة، وتم تأكيد هذا الظن في وقت لاحق في أكتوبر 2014، من خلال اعتراض من إدارة وقاية النباتات الهولندية حول

التدفق للمفاوي. تمثل الجذوع وفروع الاثمار الضعيفة، أو التي أصابها ضرر نتيجة للأحداث السلبية المناخية (الصقيع والجفاف لفترات طويلة، وما إلى ذلك)، أعضاء النبات الأكثر شهية من قبل الطفيلي. يزيد ضعف الأطراف التي هوجمت بسبب النشاط الغذائي للعديد من اليرقات التي تنمو تحت اللحاء. يمكن أن يسبب الـ *Phloeotribus* اضرار حتى على أشجار الزيتون التي تقع في المنطقة المجاورة مباشرة لأكوام من خشب الزيتون أو مخلفات التقليم التي تعمل على تفشى الإصابة. في هذه الحالة تنمو

المصابة (منطقة الاستيطان) ومنطقة عازلة (منطقة تهدف إلى الحد من انتشار الوباء)، وحظر الدخول في أرض إتحاد النباتات القادمة من كوستاريكا وهندوراس ماعدا بذور القهوة، بالإضافة إلى تحديد التدابير للقضاء والاحتواء. مع الأخذ في الاعتبار التجارب حتى الآن، فإن التدابير الأكثر عقلانية التي يجب اتخاذها تُبنى على: التدخلات الزراعية (في الربيع قص الأعشاب الضارة واعمال الحرث للقضاء على المراحل الأولى من نمو النواقل وتقليل عدد الحشرات البالغات التي يمكن أن تنتشر البكتيريا)، وعلاجات ضد البالغين من ناقلات الأمراض والحشرات، التي ربما نجت من المداخلات السابقة، مع المبيدات المسجلة والمرخصة على الزيتون، والقضاء وتدمير النباتات المصابة.



## التجفيف الناجم عن الـ *Phloeotribus* *scarabaeoides* (برنارد)

الـ *Phloeotribus* هو خنفساء الظلام، مع تغطية داكنة غامضة، صغيرة الحجم (طولها 2-2.4 مم) ولكنها قوية، منتشرة على نطاق واسع في جميع مناطق زراعة الزيتون في البحر الأبيض المتوسط والمغرب (لوزانو وآخرون، 1999) وتهاجم الزيتون وغيرها من الزيتونية. هذه الحشرة خشبية (-*xylopha-gous*)، سواء في مراحل اليرقات وعند البلوغ، ولها 3-1 أجيال في السنة حسب قابلية الأشجار الضعيفة أو المواد النباتية الأخرى (روسو، 1938، a، b). يحفر الكبار تأكل القوى (الشكل 4) في الربيع، في الجزء العلوي من الإزهار والبراعم المتزايدة في النمو. في وقت لاحق، تحفر الإناث، تليها الذكور، أنفاق لوضع البيض في الفروع المتحللة أو المقصوفة مع التقليم حيث توجد العديد من المجموعات الصغيرة من نشارة الخشب البيضاء.

معظم الأضرار سببها الكبار، الذين مع العديد من الحفريات يتسببون في موت الفروع المثمرة للعام الواحد مما يؤدي إلى خسارة الإنتاج، حتى تقضى على 73% من المحصول المحتمل (جونزاليس وكامبوس، 1994). من الممكن أن يسفر الهجوم على النباتات الوهنة جداً أو تلك المزروعة حديثاً في الحقل عن وفاة الأنواع المصابة (بينازون، 1992). تسبب الخنفساء اللحاء أيضا ضرر غير مباشر حيث أن تريس الزيتون (*Liothrips oleae*) يجد ملجأ للإشتاء ووضع البيض في مكان تغذيته.

الشكل 4 - خنفساء قلف الزيتون (*Phloeotribus*) تشير نشارة الخشب إلى وجود خنفساء اللحاء في المنطقة تحت القشرية (أ) وأنفاق الإمداد بالطاقة (ب).

يفضل الـ *Phloeotribus* هجوم الأخشاب الضعيفة القليلة

ب) ولا يسبب تطبيق المادة الفعالة على الجذوع، الغير مستخدمة للاستهلاك البشري، تأثيرات سامة للبشر؛ ج) ويتم تخفيض عدد سكان الخنفساء قبل هجوم أشجار الزيتون.

## ملاحظات ختامية وآفاق مستقبلية

تشير مشاكل أمراض نبات الزيتون، التي وصفت بإيجاز في هذا العرض، كيف ينبغي للدفاع السليم أن يبنى على المعرفة المسببة الدقيقة، التي تحدد اليوم بشكل أكبر أهمية ضمان نجاح تدابير الصحة النباتية بها. فقط دفاع متكامل يمكن أن يمثل الاستراتيجية الأكثر فعالية لمواجهة المصاعب القديمة والجديدة التي يعاني منها *pathosystem* الزيتون وأيضاً تشكل مثالا لاعتمادها على المحاصيل الخشبية الأخرى. تتطلب فعالية الفطريات الضئيلة وزيادة التركيز على الجوانب البيئية والسامة، التي تفرضها الأنظمة الأوروبية والوطنية، اتباع نهج متكامل يستفيد من إمكانيات وخصائص الوسائل المختلفة للنضال، يتصرف بشكل مبكر سواء في بساتين الزيتون القديمة أو الجديدة على حد سواء. تلعب الوقاية دوراً كبيراً في قطاع المشاتل حيث تضمن الشهادات، ليس فقط الامتثال للأصناف ولكن أيضاً صحة النبات. في هذا الصدد، تعتبر وسائل التشخيص، ولا سيما تلك الجزيئية مثل الـ PCR الكمي في الوقت الحقيقي (-qRT-PCR)، ضرورية في حالة الكبوكبية للتحقق من عدم وجود مسببات المرض في أجزاء عرضية للنبات وأيضاً في الأرض (تشيكيريني وآخرون، 2014). قد يسمح تأكيد وجود العدوى الكامنة و/أو وجود صرم للكبوكبية في التربة مراقبة الوضع في بساتين الزيتون وتقييم فعالية تدابير الصحة النباتية المطبقة. استخدام هذا الأسلوب في المشاتل من شأنه الحصول على شتلات سليمة وتجنب إدخال، حتى من خلال التربة الملوثة، الممرض الى مناطق جديدة للزراعة.

في الوقت الحاضر، يتطلب التجفيف السريع للزيتون مزيداً من المراقبة على المستوى الوطني فيما يتعلق بإدخال وحركة المواد النباتية لضمان صحتها من وجهة نظر الصحة النباتية. ومن جانب آخر، الرصد المستمر والمتواصل في بساتين الزيتون والمشاتل واعتماد اختبارات تشخيصية منتظمة باستخدام بروتوكولات محددة، هي الشروط المسبقة التي يمكن أن تضمن النجاح الأكبر لاحتواء المحن القديمة والجديدة.

اليرقات على الحطب الميت أو الضعيف (بقايا التقليم والفروع المجففة، وغيرها)، ويتخذ البالغون الزيتون الصحي خلال مرحلة الرضاعة، حيث تحفر أنفاق للتغذية أيضاً على الفروع التي تتمتع بحالة خضرية جيدة مما يتسبب في وفاة الفروع الصغيرة، النورات وحتى الثمار الصغيرة، وتقل بشكل كبير إنتاج السنة.

سهلت سخونة وجفاف الصيف في السنوات الأخيرة، كما ذكرت العديد من التقارير، تطوير الـ *Phloeotribus* في بساتين الزيتون في سهل سيباري (كالابريا) مما تسبب في وفاة أشجار الزيتون الشابة وفشل البساتين الجديدة لأصناف الكاروليا. يقضي الـ *Phloeotribus* فصل الشتاء مثل اليرقة و/أو البالغ، ولأن الشتاء في السنوات الأخيرة كان معتدلاً بشكل خاص، ودون صقيع لفترات طويلة، لم يعاني هذا النوع من ضرر البرد، وتضاعفت بشكل كبير. كما لم يعرف أعداء طبيعية فعالة وقادرة على الحفاظ على سكان خنفساء اللحاء داخل حدود العتبة الاقتصادية للتدخل.

ولذلك فمن الضروري الوقاية من أجل الدفاع ضد هجمات هذه الخنفساء لحفظ النباتات في حالة خضرية جيدة مع الممارسات الزراعية السليمة: الحراثة والتسميد المتوازن والري (حيثما أمكن)، وأداء معالجات الصحة النباتية اللازمة ضد المحن الأخرى، والقضاء، مع التقليم السنوي، على أجزاء النبات الضعيفة أو المنهكة (فورلونج وآخرون، 2004). تمثل مخلفات التقليم الشتوي اندلاع محتمل لنمو الحشرات ويجب أن تُبعد في أقرب وقت، وكذلك يجب تجنب وضع خشب الزيتون (للمواقد أو الأفران) على مقربة من النباتات المزروعة. وسيلة فعالة للنضال هي تسوية أكوام من الأغصان الناتجة عن التقليم (فروع الطعم) في شهر مارس، التي تقع في أكثر المناطق المشبوهة داخل الزيتون المصاب، وذلك لجذب الكبار المتكاثرة. يجب إزالة وحرق هذه الطعوم بحلول نهاية أبريل، بمجرد أن تبدأ في ظهور النشارة وقبل خروج الكبار من الجيل الأول، وتتجه إلى النباتات للإنجاب. ولأن هذه الخنفساء الصغيرة تنتشر في عمق خشب الزيتون، فمن الصعب للغاية الوصول إليها من الخارج بواسطة العلاجات الكيميائية. وتم الحصول على نتائج جيدة باستخدام الدلتاميثرين، الذي مثله مثل البيريثرويدات الأخرى (لوتش، 2005)، هو مبيد حشري يقلل من وجود الـ *Phloeotribus* في تطبيق واحد. ومع ذلك، فإن الدلتاميثرين عنصر نشط واسع العمل، وبالتالي يؤدي إلى ارتفاع معدل الوفيات في المفصليات غير المستهدفة (روانو وآخرون، 2008). احتواء الـ *P. scarabaeoides* مع الدلتاميثرين على الجذوع المستعمرة بالفعل من قبل الحشرة هي استراتيجية جيدة لعدة أسباب: أ) تجنب تشتت الـ *Phloeotribus* بسبب التأثير الناجم عن مبيد الحشرات؛

- 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., MOURBARAK 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.
- 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 biológico 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

- PÉREZ-ARTÉS E., GARCIA-PEDRAJAS M.D., BEJARANANO-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 Andalucía (southern Spain) *Bull OEPP/EPPO 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 coleotteri 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 coleotteri scolitidi, fleotribo: *Phloeotribus scarabaeoides* (Bern.). *Fauv. Parte seconda: Biografia, simbionti, 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., SREENIVASAPRASAD 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.
- TANATOU 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. 3<sup>rd</sup> Nat. Phytopathol. Conf. Hellenic Phytopathol. Soc.*, 18-19.
- 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” Gonnosfanadiga (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*. 8<sup>th</sup> *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*, 6<sup>th</sup> 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.

In: Barranco D., Fernández-Escobar R., Rallo L., (eds) El cultivo del olivo, 4<sup>th</sup> 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.

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.



Príncipe de Vergara, 154.  
28002 Madrid, España  
Tel.: 34-915 903 638  
Fax: 34-915 631 263  
E-mail: [ioc@internationaloliveoil.org](mailto:ioc@internationaloliveoil.org)  
[www.internationaloliveoil.org](http://www.internationaloliveoil.org)