الفصل الثاني عشر

قياس وتحسين المقاومة الطبيعية للفواكه

Measuring and Improving the natural resistance of fruit

جي. ام، أوريا و أ. جوانزاليز يورينا، معهد بليوريديسسيد – لينا، الجامعة الكاملة بمدريد

J. M. Orea and A. Gonzalez Urenam Instituto Pluridis ciplinar, Driversidad Complutenese de Madrid

(١٢,١) مقدمة: آليات الدفاع النباتي وجودة ما بعد الحصاد

Introduction: Plant defence mechanisms and post-harvest quality

يعتبر علم النبات وخصوصاً الدفاع النباتي، (plant defence) أحد أكثر حقول العلوم الحيوية الحديثة تطوراً وتقدماً. وحالياً، تعتمد دراسة آليات الدفاع النباتي على مدخلين جيدي التأسيس والارتباط، وبالتحديد هما وجه/جانب الوراثة(genetic view) والوجه الفيزيوكيميائي(physiochemical view). يقوم الجانب الوراثي على التطورات في حقل البيولوجيا، وهو علم الأحياء الجزيئية للنبات(plant molecular biology)، ومن خلال العمل في إنجاز تسلسل تتابع جينوم النبات لتحديد الجينات المعنية بمقاومة النباتات للأمراض. إن المعرفة والعلم بفسيولوجيا آليات الدفاع (physidogy of defence mechanisms) أمر مهم لتطوير طرق جديدة ليست فقط لتحسين مراقبة ومتابعة الحالة الصحية للفواكه بعد الحصاد، ولكن لإيجاد وسائل جديدة لتحسين فترة الصلاحية

obeikandl.com

أيضاً. وتعتبر الأهداف الأخيرة أساسية للمعالجة الفيزيوكيميائية التي نوقشت في هذا الفصل.

استخدمت المنتجات الطبيعية للأيض الثانوي للنبات (plant's secondary metobolism) في الطب الطبيعي(natural medicine) منذ العصور القديمة والأوقات المبكرة للتاريخ البشري (early times of human history). ولأن الوظائف الأساسية لهذه الكيميائيات هي حماية ووقاية النبات من الهجوم، فإن الإستراتيجية الجيدة تتطلب بالضرورة تحديد مكونات استجابة الدفاع الطبيعية الموجودة في النبات. ولذا، فإن التقنيات الفيزيوكيميائية الحديثة، التي تمت الإشارة إليها في هذا الفصل والتي تعتمد بشكل خاص على الليزر(laser-based technologies) ومن النوع الموصوف في هذا الفصل، قد تكون مفيدة جداً. ليس فقط كمؤشرات مبكرة وحساسة للفساد (Sensitive indicators for spoilage)، ولكن لتحفيز المقاومة الطبيعية للمحاصيل أيضاً.

(١٢,٢) آليات الدفاع النباتية: الإيثلين، الفايتواليكسينات ومركبات أخرى
Plant Defence Mechanisms: Ethlene, Phytoalexins and Other Compounds

وحتى لحظة تأليف هذا الكتاب فإن الإيثلين وهو من جزيئات الدفاع النباتية، قد نال فرصة أكبر للدراسة، الإيثلين هو هرمون نباتي يلعب دوراً مهماً في تنظيم الكثير من العمليات المتولدة بيئياً وتطورياً، مثل استجابات الممرضات المعدية (pathogen infection responses) ومقاومة الإجهاد (stress resistance) وإنبات البذور (seed germination) وتلقيح/تأبير وذبول الزهور (pollination and wilting of flowers) ونضج ثمار الفواكه وذهاب الاخضرار(fruit ripening and degreening) والشيخوخة (senescence) وانفصال الأوراق والثمار (leaf and fruits abscission) وما إلى ذلك.[١-٦] بالرغم من أن ابتعاث الإيثلين مختلف من عضو إلى عضو آخر، ومن نوع إلى آخر، اختلافاً كبيراً، إلا أنه قد

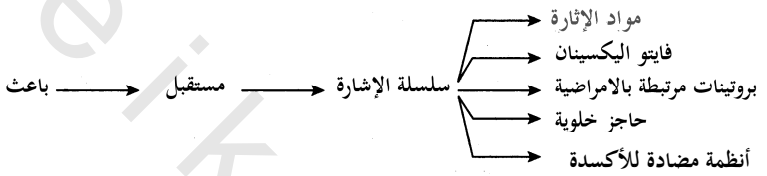
أثبت وبشكل واسع ، أن فرص بقاء النباتات المجهدة ، تعتمد بشكل كبير على مقدرتها على خلق استجابات مرتبطة بالإيثلين (ethylene related responses).[٧، ٨] تعرف المجموعة الثانية من نواتج الأيض الثانوية المهمة بالفايتواليكسينات (phytoalexins) ، أي المركبات المضادة للممرضات (antipathogenic compounds) التي تنتجها النباتات بعد الإصابة بالعدوى أو يتم ابتعاثها بواسطة العوامل غير البيولوجية(abiotic agents).[٩] وقد درست الفايتوالكيسينات دراسة واسعة أثناء النصف الثاني من القرن العشرين ، وقد تضمنت الدراسات كثيرا من حقول علوم النبات ، والتي شملت التصنيع الحيوي (biosynthesis) والجهازية الكيميائية (chemosystematics) وكيمياء المنتجات الطبيعية (natural products chemistry) وعلم الأحياء الجزيئية (molecular biology) وعلم الأدوية (pharmacology) أو الجينات الفطرية (fungal genetics).[١٠-١٣] وبصفة عامة فإن الفايتواليكسينات هي مركبات غير طيارة (non-volatile compounds) ذات أوزان جزيئية منخفضة (أقل من ١٠٠٠ أ ام يو (below 1000 amu) ، أي ، أن البيتيدات والبروتينات ذات العلاقة بتسبيب المرض (pathogenesis related peptides and proteins) التي تنتجها نباتات غير مضمنة في هذه المجموعة. وتُظهر الفايتواليكسينات تنوعاً كيميائياً كبيراً ، وبينما تنتج كثير من عائلات النبات (plant families) فايتواليكسينات ذات تراكيب كيميائية متشابهة ، إلا أن نباتاً ما ، قد ينتج فايتواليكسين غير مرتبط أو مشابه تماماً ، لفايتواليكسينات أخرى منتجة من نبات آخر من العائلة نفسها. ومن أمثلة المركبات المختارة ، والتي أثبتت خصائصها الفايتواليكسينية (phytoalexinic character) : مشتقات الفلافونويدات والايسوفلافونويدات (flavonoid and isoflavonoid derivatives) والاستيلبينات(stilbenes) والسيسكويتيربينات (sesquiterpenes) ومشتقات الفينايل بروبانويد (phenylpropanoid dervatives) والبوليكيتيدات(polyketides).

إضافة لهذا الاختلاف(التنوع) الكيميائي، هناك كثير من الصعوبات الأخرى في تحديد ما كان مركب ما فايتواليكسين أم لا. وبالرغم من أن إنتاج الفايتواليكسينات بعد العدوى يفيد بأن مركب ممرض أو بعض المنتجات التي تنشأ من تفاعل المضيف – الممرض(host-pathogen interation) (ما تعرف بالباعثات elicitors) هي التي تحفز التصنيع الحيوي للفايتواليكسين، إلا أن مسار التصنيع الحيوي ليس دائماً سهل التفسير (elucidate). عليه، فإن بعض المركبات التكوينية(constitutive compounds)، قد تعمل كمضادات فطرية سابقة التكوين(preformed antifungal) في عائلة، وتعمل كفايتواليكسين في عائلة أخرى، وأكثر من ذلك حتى في حالة الأرز، فقد تم توضيح أن مركب الموميلاكتون أ(momilactone A) هو مركب تكويني في قشر الثمر (husks) والجذوع(stems)، ولكنه فايتواليكسين في الأوراق.

ولذلك فبالرغم من صعوبة تحديد الفايتواليكسينات من خلال تراكيبها الكيميائية أو من خلال مساراتها التصنيعية، إلا أنها محددة تحديداً جيداً بديناميكيات تصنيعها الحيوي ووظائفها داخل النبات. ومن الواضح مسبقاً أن توليد الفايتواليكسينات ليس فقط استجابة للعدوى، بل إنها واحدة من الإستراتيجيات الأساسية للآلية الدفاعية للنباتات ضد ممرضاتها.(١٤)

بجانب الفايتواليكسينات والمواد التأشيرية (signalling substances) مثل الإيثلين، تصنف الجزيئات الدفاعية الأخرى التي تتكون/تتولد في النباتات بالبواعث/المستنهضات الحيوية وغير الحيوية كبروتينات مرتبطة بالإمراضية وحواجز خلوية(cellular barriers) اللجينينات/خشبينات والاكستينسينات/مديدات وكالوز/لحاء (lignins, extensins and callose) وأنظمة مضادة للأكسدة (antioxidative systems). من الضروري في كل الحالات أن تتواجد في النبات بعض المستقبلات لهذه

البواعث، وهي المسئولة عن الإشارة الأولية (Intial signal) وفي كثير من الأحوال أنواع أكسجين منشطة (activated oxygen species) والتي تحث إنتاج جزيئات دفاعية معينة.[١٥- ١٧] ويلخص الشكل رقم (١٢,١) المخطط العام(general scheme) لعمل مثل هذه البواعث.[١٨]



الشكل رقم (١٢,١). آليات الدفاع النباتية الأساسية المتولدة بالبواعث الحيوية و/أو غير الحيوية.
(adapted from Sandermann *et al.* [18])

إن الهدف الأساسي لهذا الفصل هو الإجابة على السؤال الرئيس وهو: كيف يمكن استخدام المعرفة المتوافرة حالياً حول آليات النبات الدفاعية والتي تشمل أنواعاً كثيرة ومتنوعة من المقاومة الكيميائية(chemical warfare) ضد الممرضات؟، وذلك لزيادة مقاومة الفواكه (للأمراض)، وتوجد أسئلة أخرى كثيرة وثيقة الصلة بهذا السؤال الرئيس ومنها ما هو مستوى الحل ومستوى الحساسية اللذين يمكن تحقيقهما من خلال التقنية الحديثة لمراقبة وتتبع الحالة الصحية للفواكه؟ هل يمكن زيادة التركيز الداخلي لمبيدات الآفات الطبيعية(natural pesticides) هذه، في الفواكه، من أجل تحسين مقاومتها للفساد؟ وهل يمكن استخدام مبيدات الآفات الطبيعية هذه خارجياً لتحسين (تمديد) فترة صلاحية الفواكه والخضراوات؟ وإذا كان ذلك ممكناً، هل يمكن تقبلها بيولوجيا (حيوياً) وبيئياً (ecologically) وتجارياً؟ ما الذي يمكن تعلمه من فسيولوجيا النبات الدفاعية (plant defence physiologey)؟، التي قد تستخدم تجارب في نهاية الأمر للمحافظة على جودة الفواكه بعد الحصاد.

إن التقدم الذي تم في الإجابة على هذه الأسئلة، مع مناقشة الطرق الجديدة التي تم تطويرها في هذا الحقل الهام المشوق، هو موضوع هذا الفصل. إلى هذا المدى، تهتم أو تعنى الأقسام ٣-١٢ و٤-١٢ بتطبيق/ استخدام طرق التحليل شديدة الحساسية (highly sensitive analytical methods) للكشف عن المركبات الطبيعية الدفاعية الموجودة في النباتات وتتبعها، وبصفة خاصة الإثايلين والفايتواليكسين ريسفيراترول (phytoalexin resveratrol) وتستعرض الأقسام ٥-١٢ إلى ٩-١٢ أمثلة مختارة لمختلف المعالجات أو التدخلات لتحسين المقاومة الطبيعية للنباتات باستخدام جزيئات النبات الدفاعية الخاصة به؛ لذا، يتم استعراض حقول البحث الرئيسة المستقبلية المحتملة المخصصة لتحسين المقاومة الطبيعية في الفواكه. وأخيراً، تستعرض قائمة المصادر الرئيسة مزيداً من المعلومات والنصائح.

(١٢,٣) الاكتشاف الإليكتروني لإجهاد النبات: المركبات الطيارة

On-Line Detection of Plant Stress: Volatile Compounds

يعتمد تحديد الاستجابة الدفاعية الطبيعية للنباتات أو التعرف عليها على استخدام الطرق التحليلية شديدة الحساسية. ويستعرض هذا القسم تطور طرق واستخدام التقنيات الجديدة المعتمدة على الليزر التي تمكن من كشف الجزيئات الدفاعية الطبيعية (الطيارة) ذات الحساسية غير المسبوقة (unprecedented sencitivity) ومتعددة الاستعمالات والبراعات (versatility) التي يعول عليها (يعتمد عليها) (reliability).

معظم مكونات الاستجابة المناعية الطبيعية للنبات، هي مركبات عضوية طيارة (volatile organic compounds) يتم ابتعاثها كإستجابة لهجمة الممرضات. إن كشف هذه المركبات يخلق مشاكل كثيرة متعددة، وذلك بسبب اختلافاتها الواسعة، وانخفاض التركيز (عادة ما يكون جزء في البليون 10^{-9} (ppb $=10^{-9}$)، أو جزء في التريليون 10^{-12}

($ppt10^{-12}$)) وسرعة العمليات المتضمنة والتي قد تحدث خلال دقائق قليلة، كما تم توضيحه مسبقاً في حالة استجابة النبات للإجهاد والضغوط[١٩].

يجب أن تلبي التقنيات التي تم تطويرها لاكتشاف المركبات الطيارة على خط الإنتاج (on-line detection of volatile compounds) في الحقول الأخرى، عدة متطلبات محددة ليتم استخدامها في أبحاث فسيولوجيا النباتات أو أمراضها وهي:

- الحساسية الشديدة لاكتشاف تركيزات بمستوى جزء في التريليون.
- انتقائية عالية تميز بوضوح بين الكثير من المركبات وبين القدرة على تحليل مختلف الغازات في نفس الوقت باستخدام معدة/جهاز وحيد.
- وقت انحلال ممتاز(excellent time resolution) لقياسات الوقت الحقيقي.
- تشغيل آلي(automatic operation) يُمكِّن من التحليل في النهار والليل (day and night analysis).

عادةً، يمكن فصل الطرق المستخدمة للتحليل الدقيق (trace analysis) للمركبات الطيارة إلى تقنيات اسبيكتروسكوبية (مطيافية، (spectroscopic)) وغير مطيافية(non-spectroscopic). وفي التقنيات غير المطيافية، فإن الأكثر شيوعاً في الاستخدام هو التألق (الإشراقية) الكيميائي (chemilminiscence) والمطيافية الكتلية (mass spectrometry (MS) وكروموتوغرافيا الغاز (gas chromatography (GC)، وبينما تم استخدام التقنيتين الأوليين وأساساً، كوسائل مختبرية (laboratory tools)، فقد حققت تقنية كروموتوغرافيا الغاز مظاهر بارزة لعدة غازات فيما يتعلق بحدود الكشف بمستوى جزء من التريليون (part per trillion pptv) وبدرجة عالية الموثوقية خاصة عند استخدام الأجهزة التجارية لكروموتوغرافيا الغاز المطيافية الكتلية (GC-MS instrumentation). في علم النبات، وعلى سبيل المثال، فقد استخدمت تقنية الـ GC-MS لكشف ابتعاث الإيثايلين ethylene

(emission) كاستجابة ضغط(stress response) في نباتات أكثر تعقيداً more complex). (plants[٤، ٢٠] إن العيب الوحيد لتقنية كروموتوغرافيا الغاز، هو الحاجة الدائمة للتجهيز المسبق للعينة أو التركيز المسبق لها(sample preperation or preconcentration). ومع بطء وقت الاستجابة (slow time response) للتقنية فإنهما يحدان من الإجراء المؤقت للتحليل(temporal resolution of the analysis). إضافة إلى ذلك، فإن النظام بصفة عامة، ليس أتوماتيكيا (غير آلي (not automatic)).

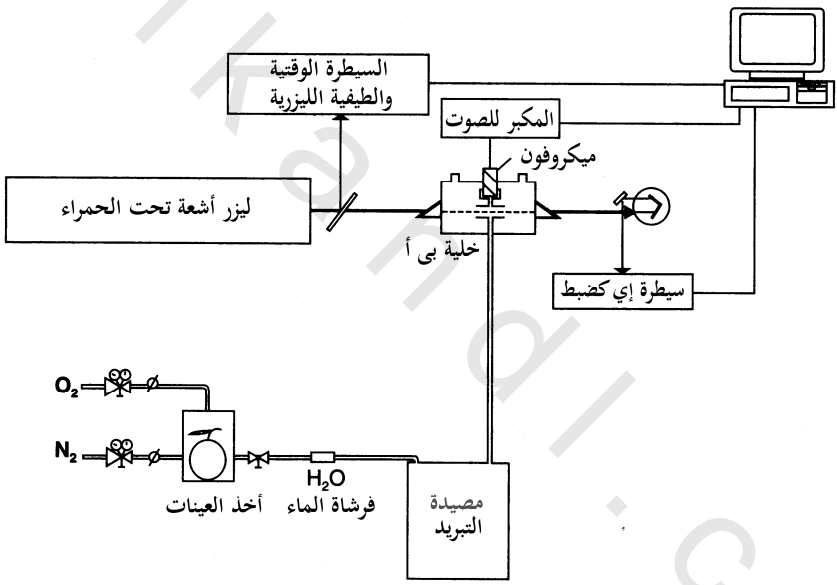
تعتمد تقنية المطيافية بصفة عامة، (التحليل الطيفي باستخدام المطياف الضوئي) على قياسات الامتصاص (absorption measurements) خاصة في حقل الطول الموجي للأشعة تحت الحمراء. استخدمت أجهزة الأشعة تحت الحمراء لتحليل الغازات IR gas) (analysers ذات المصادر الحرارية عريضة أشرطة الإشعاع broad band thermal sources) (of radiation في بحوث جزيئات النباتات الدفاعية، ولكن بصفة عامة هذه أجهزة تحليل صناعية وقد تم تصميمها لكشف غاز محدد (معين) وحيد (single particular gas). وبناء على ذلك، لا يمكن إجراء قياسات متزامنة لغازات مختلفة، وهذا أمر مهم في دراسة كثير من العمليات النباتية. إن توافر مصادر ضوئية ليزرية قابلة للمؤالفة tunable laser) (light sources ساعد على تطور الكثير من التقنيات المطيافية، ومن بينها مطيافية الامتصاص البصري التفريقي differential optical absorption spectroscopy) (DOAS)[٢١-٢٣] والكشف الضوئي وأحكام المدى Light detection and ranging) (LIDAR[٢٣-٢٦] ومطيافية الأشعة تحت الحمراء التحويلية لفورير Fourier tranform IR) (spectroscopy[٢٧-٢٩] ومطيافية امتصاص ليزر الصمام الثنائي القابل للمؤالفة tunable) (diode laser .absorption spectroscopy (TDLAS))[٣٠،٣١] وقد استخدمت هذه التقنيات في الكشف عن المركبات العضوية الطيارة وتحليلها، خاصة في التطبيقات

والاستخدامات البيئية (enviromental applications) ولكن لكل منها عيوب فيما يتعلق بالكشف عن الجزيئات الدفاعية الطبيعية في النباتات، وخاصة لافتقارها للحساسية و/أو الانتقائية (selectivity).

وأكثر التطورات إثارة للاهتمام فيما يتعلق باكتشاف المركبات الطيارة التي تفرزها النباتات والتي حدثت أثناء السنوات القليلة الماضية، ما عرف بالمطيافية الضوئية الصوتية/ السماعية الليزرية (laser photoacoustic spectroscopy (LPAS) والتي مكنت من تحديد كثير من الجزيئات المفتاحية (الأساسية) وأزالت الإرباك والتشويش الموجود حول إشارات الآليات الدفاعية للنبات (unravelling of signalling plant defence mechamims) . تعتمد هذه التقنية (وكما هو موصوف أدناه) على الأثر الضوئي الصوتي(photoacoustic effect) أي، توليد موجات صوتية كتبعة أو نتيجة لامتصاص الضوء كما أفاد أ. جراهام بيل(A. Graham Bell) مبكراً في عام ١٨٨٠م.[٣٢] الوصف الشامل للأسس الفيزيائية التي تعتمد عليها تقنية المطيافية الضوئية الصوتية الليزرية (LPAS)، خارج نطاق هذا الفصل، وقد يوجد هذا الوصف في مكان ما آخر[٣٣-٣٥]، وعليه هنا، نستعرض فقط تفسيراً أو شرحاً أساسياً(basic explanation) .

إن الأثر يتولد بامتصاص فوتونات(photons) لها أطوال موجات مناسبة وامتصاص جزيئات الغاز للطاقة، والتي من ثم تصبح مستثارة(excited) إلى حالة تجوال(rovibrational state). ويتم تجاهل التضاؤل الإشعاعي التلقائي (spontaneous radative decay)، تحويل الطاقة الممتصة عن طريق التصادم الداخلي للجزيئات فيما بينها(Inter molecular collisions) إلى طاقة مترجمة(translational energy)، ومنها إلى حرارة. وعند جمع عينة غاز في خلية مغلقة(closed cell)، فسيُنْتِج تسخين جزيئات (ذرات) الغاز زيادة في ضغط الخلية (cell pressure). وبتعديل كثافة الضوء (modulating

(light intensity) (بتشغيل مصدر الضوء وقفله) تحدث فروقات في الضغط والتي تخلق موجات صوتية قابلة للاكتشاف بواسطة ميكرفون حساس (sensitive microphone). يوضح الشكل رقم (١٢,٢) رسماً أو شكلاً تخطيطياً(schematic view) لنظام المطيافية الضوئية الصوتية الليزرية التجريبية(LPAS experimental system).



الشكل رقم (١٢,٢). رسم تخطيطي لماكينة/جهاز المطيافية الضوئية السمعية الليزرية (LPAS) لكشف الابتعاثات النباتية الطيارة.

تعتمد إشارة الميكرفون على ما يلي: ١- عدد الذرات الامتصاصية (absorbing motecules) الموجودة في الغاز. ٢- قوة امتصاص الجزيئات (الذرات) عند تردد ضوئي محدد (specific light frequency) و ٣- كثافة الضوء. عليه، للكشف عن آثار الغاز عملياً (practical trace gas detection)، يجب أن يستوفي مصدر الضوء

شرطين أساسيين هما: أن يكون شريطه ضيقا (نحيلا، narrow-banded) وأن يكون قابلاً للمؤالفة (tunable)، وذلك، من أجل الوصول إلى الطول الموجي المحدد للجزيء وكما يجب أن يكون ذا كثافة عالية لأن إشارة الامتصاص تتناسب معه (proportional to it).

وإذ إن عمليات الامتصاص المهمة ترتبط بالتجوال التحويلي (rovibrational transitions) فمن الضروري العمل في منطقة الأشعة تحت الحمراء، حيث يكون لكل غاز جزيئي (molecular gas) طيف امتصاص ذو بصمة (fingerprint absorption spectrum) خاصة به، والذي قد تختلف قوته بدرجة كبيرة عبر فترات فاصلة لأطوال موجية (wave length intervals)، وبالتحديد يتراوح المدى المفضل لاستخدامات المطيافية بين٣ و٢٠ ميكرومتر(μm). وبالرغم من استخدام لمبة مستمرة عالية الكثافة كمصدر للأشعة تحت الحمراء، (high intensity continous lamp)[٣٦، ٣٧] في بعض الحالات، إلا أن ليزر الأشعة تحت الحمراء يوفر كلا من الكثافة العالية والضوء القابل للمؤالفة ذا الشريط الضيق، ولذا يكون مثالياً لتقنية الكشف الضوئي الصوتي (PA detection techniques). يُستخدم ليزر ثاني أُكسيد الكربون وليزر أول أُكسيد الكربون (Co_2 & Co laser) بشكل شائع، كمصدرين للضوء في الكشف الضوئي الصوتي للغازات، [٣٨، ٣٩] ذلك لأنهما يوفران قوى موجات عالية مستمرة (continous wave CW)، نموذجياً ١٠٠ واط (100w) و٢٠ واط، على التوالي، عبر منطقة الطول الموجي هذه. أيضاً، استخدمت مصادر الليزر النبضي (pulsed laser sources) لأبحاث الـLPAS ولكن تقل الأعمال المنشورة عن المطيافية الضوئية الصوتية النبضية، كثيرا.[٤٠]

إن العيب الأساسي لمصادر الـ CO_2 والـ CO لليزر هو أن قابليتها للمؤالفة متوسطة. وهي فقط قابلة للمؤالفة خطياً (Line tunable) ولذلك فقد تسبب مشاكل تداخل (interference problems) مع تباعد كبير بين خطوط الليزر والغطاء والمدى القصير نسبياً للأطوال الموجية. وقد اقترحت عدة بدائل للتغلب على هذه المعوقات: استخدام النظائر المشعة لثاني أُكسيد الكربون(CO_2 isotopes) أو ليزر ثاني أُكسيد الكربون عالي الضغط(high pressure CO_2 laser) للمطيافية الضوئية الصوتية الليزرية لثاني أُكسيد الكربون(CO_2 – LPAS) وليزر النبضة التوافقية لأحادي أُكسيد الكربون(CO overtone laser) للمطيافية الضوئية الصوتية الليزرية لأول أُكسيد الكربون (CO-LPAS) هي المقترحات المناسبة بدرجة كبيرة والأكثر تناسباً. زيادة على ذلك، فقد استخدمت مصادر ليزر أخرى من أجل استخدام مصدر واسع/كبير القابلية للمؤالفة ذي شريط ضيق في الأنظمة الضوئية الصوتية(PA systems)، وخاصة مع التقدم السريع لليزر الحالة الصلبة (solid state lasers) ومن بينها ليزرات الصمام الثنائي القابل للمؤالفة - [١١] (tunable 111-V diode lasers) و ليزرات الصمام الثنائي مع الحالة الصلبة (diode pumped solid state lasers)، وقد مكنت ليزرات الصمام الثنائي مع الحالة الصلبة أو ليزرات الصمام الثنائي رجعية التغذية الموزعة (distributed feadback diode lasers) من تطور ليزر الأشعة تحت الحمراء القابلة للمؤالفة المدمج (compact tunable laser radiations) مع استخدامات مختلفة في المطيافية الضوئية الصوتية الليزرية. [٤١، ٤٢] أخيراً، ذكرت عدة مجموعات[٤٣- ٤٥] عدة استخدامات للمطيافية الضوئية الصوتية الليزرية باستخدام نظام تقييسي ضوئي متذبذب (optical parametric oscillator system)، وبالتأكيد فإن هذه التقنيات واعدة بل الأكثر وعداً بتحسين القدرة على المؤالفة للأنظمة الضوئية الصوتية والقابلية لها.

وبالرغم من العيب المذكور، لا تزال ليزرات ثاني أُكسيد الكربون وأول أُكسيد الكربون هي الأكثر شيوعاً واستخداماً كمصادر ضوئية للأشعة تحت الحمراء في المطيافات الضوئية الصوتية. ومن أجل إظهار براعات هذا الجهاز وظواهره الرئيسة، يوضح الجدول رقم (١٢,١) حدود الكشف (limits of detection (LoD) لكثير من المركبات التي تحققها تقنية المطيافية الضوئية الصوتية الليزرية (LPASTECH) في قسم فيزياء الليزر والفيزياء الجزئية (department of molecular & laser physics) بجامعة نيجمياجين (University of Nijmegen).[٤٦]

يعطي الجدول رقم (١٢,١) فكرة واضحة للاستخدامات المتعددة للLPAS فيما يتعلق بالكشف والتحليل المعوَّل عليه (الموثوق) للمركبات العضوية الطيارة في حقول كثيرة، مثل الكيمياء البيئية(envirnomental chemistry),[٤٧- ٥١] وبالرغم من أن الاستخدامات الرئيسة للـLPAS تبقى في حقل علوم النبات[٥٢- ٥٥]، وذلك نتيجة للمتطلبات المحددة التي ذكرت أعلاه. وبالتحديد، استخدمت تقنية الـLPAS بصورة واسعة في مراقبة وتتبع المركبات الدفاعية الطيارة التي تفرزها النباتات.[٥٦- ٦٣]

الجدول رقم (١٢,١). حدود كشف المطيافية الضوئية الصوتية الليزرية.

المركب	حدود الكشف، LoD (جزء من البليون)
أول أُكسيد الكربون CO	٠,٠١
دايسلفايد الكربون (carbon disulphide CS_2)	٠,١
الاسيتالديهايد (A cetaldehyde CH_3 CHO)	٠,١
ماء (بخار) H_2O (Water (Vapour)	٠,١
دايأُكسيد النيتروجين (Nitrogen dioxide NO2)	٠,١

obeikandi.com

تابع الجدول رقم (١٢,١).

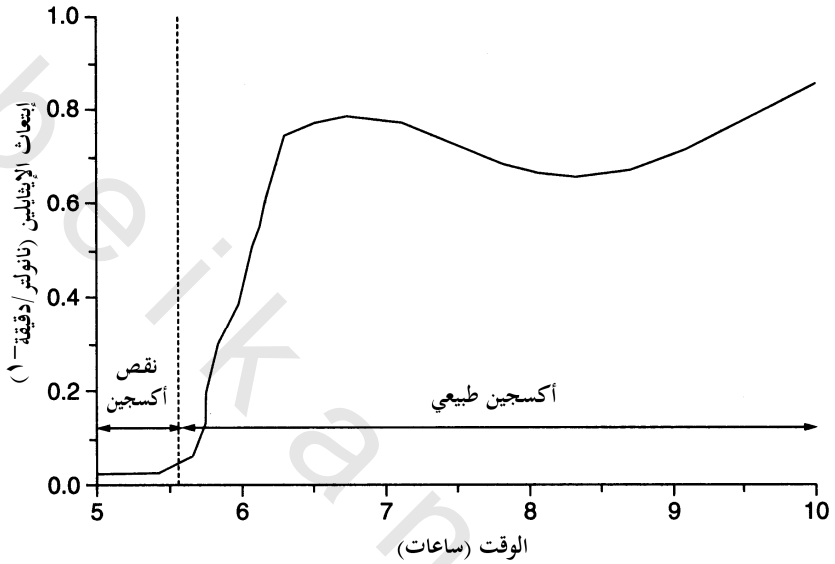
المركب	حدود الكشف، LoD (جزء من البليون)
دايأُكسيد الكبريت (sulpher dioxide NO2)	١
نيتروس أُكساید (Nitrous oxide N_2O)	١
أسيتايلين (Acetylene $C_2 H_2$)	١
نايتريك أُكساید (Nitric oxide NO)	١
اسيتايلين (Acetylene $C_2 H_2$)	١
إيثان (Ethane $C_2 H_6$)	١
إثايلين (Ethylene $C_2 H_4$)	١
ميثين (Methone C H_4)	١
دايميثايل سلفياد (Dimethylsuphide S (CH_3))	١
أمونيا (نشادر) (Amonia NH_3)	١
ترايميثايل أمين (Trimethylamine (CH_3))	١
إثانول (Ethanol $Ch_3 CH_{20}H$)	٣
بينتين (Pentane $CH_3 (CH_2)_3 CH_3$)	٣
ميثين ثايول (Methane thiol CH_3 5H)	١٠
هايدروجين سلفايد (Hydrogen sulphide H_2 S)	١٠٠٠
ثاني أُكسيد الكربون (Carbon dioxide CO_2)	١٠٠٠
أمونيا (نشادر) (Amonia NH_3)	٠,٠٠٥
أوزون (Ozone O_3)	٠,٠٢

obeikandi.com

تابع الجدول رقم (١٢,١).

المركب	حدود الكشف، LoD (جزء من البليون)
إثايلين (Ethylene $C_2 H_4$)	٠,٠١
هايدروجين سلفايد (Hydrogen sulphide)	٠,٠٤

وكما جاء في مقدمة هذا الفصل، يلعب الإثايلين دوراً مهماً في عدد من عمليات النبات الفسيولوجية. وثبت أن تقنية الـLPAS توفر طريقة يعول عليها في الكشف عن هذا الهرمون النباتي بمستويات جزء في التريليون[٣٥، ٦٤] بنمط فوري ومستمر؛ وكنتيجة، هناك كثير من بحوث الـLPAS المتعلقة بابتعاث الإثايلين من الفواكه والنباتات تحت ظروف بيئية مختلفة.[٦١، ٦٥- ٧٠] يوضح الشكل رقم (١٢,٣) تطور ابتعاث الإثايلين من ثمرة طماطم تحت ظروف مختلفة.[٦٨] تبدأ التجربة تحت ظروف لاهوائية وعند وقت (ت، (t)) = ٥,٦ ساعة وتحفظ أحوال أكسجين طبيعية (normoxic conditions)، والتي تنتج زيادة مفاجئة وكبيرة في ابتعاث الإثايلين خلال فترة ٤٥ دقيقة، تقريباً. مقدرة هذه التقنية على تتبع العملية في الوقت الحقيقي (يتم تسجيل البيانات كل دقيقتين) مع درجة حساسيتها العالية (يمكن اكتشاف أو كشف الفروقات بمستوى قليل من البيكوليترات (picolitres) في الدقيقة) من الخصائص الملحوظة (لهذه التقنية).

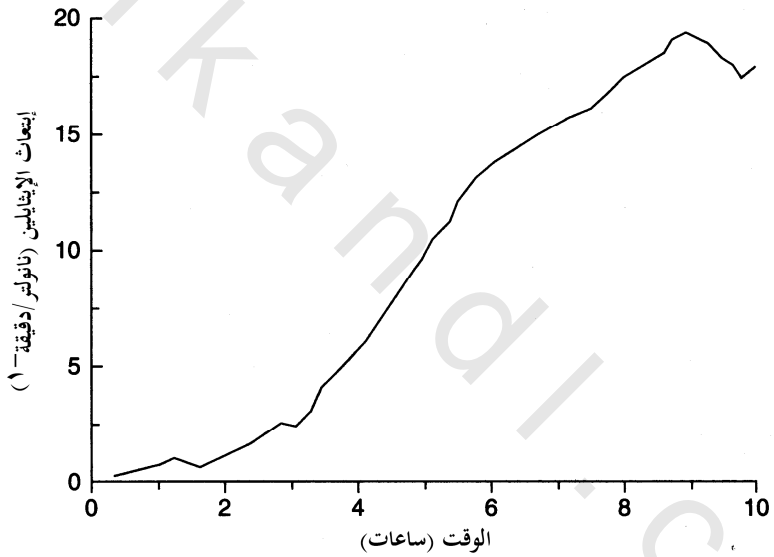


الشكل رقم (١٢,٣). ابتعاث الإثايلين من ثمرة الطماطم تحت ظروف لاهوائية مختلفة كما قيس بتقنية المطيافية الضوئية الصوتية الليزرية. سرعة استجابة النبات ومقدرة التقنية في تتبعها جديرة بالملاحظة (الشكل مأخوذ من Vries et al[٦٨]).

استخدمت تقنية الـ LPAS استخداماً واسعاً مكثفاً في كشف الايثانول والاسيتيلدهايد لدراسة معدل التخمر الكحولي (alcoholic fermentation) في أنسجة النبات أثناء معالجات الأنوكسيا/نقص الأكسجين (anoxic treatment) في كثير من الفواكه المحصودة.[٦٩، ٧١- ٧٣]

توفر مراقبة آثار الغازات(trace gases) التي تفرزها الفواكه والخضراوات المخزنة معلومات عن العمليات الأيضية التي تحدث في المحاصيل (سرعة/معدل التخمر، مرحلة النضج... إلخ) وهذه المراقبة مهمة لتعديل أحوال وظروف التخزين ووضعها في

أمثل حال. وعلى سبيل المثال، يوضح الشكل رقم (١٢,٤) معدل إنتاج الإثانول من الكمثرى المخزنة مقاسة بتقنية الـ LPAS[٧٤]. فتحت هذه الدراسات طرقاً جديدة لفهم وتحسين الآليات الدفاعية الطبيعية للفواكه المخزنة كما سيرى بتفصيل أكثر في القسم (١٢,٦).



الشكل رقم (١٢,٤). معدلات ابتعاث الإثانول والاسيتالديهايد من الكمثرى المخزنة، مقاسة بتقنية الـ LPAS (مأخوذ من المرجع ٧٤).

obeikandl.com

(١٢,٤) كشف إجهاد/ضغوط النبات على خط الإنتاج:المركبات غير الطيارة
On-line Detection of Plant Stress: Non-Volatile Compounds

إحدى المشاكل العصيبة في هذا الحقل، وخاصة في حالة عينات الفواكه والخضراوات هي مشكلة كشف وتحديد المركبات العضوية غير الطيارة الموجودة بتركيزات منخفضة، كما هي حالة معظم الفايتواليكسينات التي تنتجها النباتات.

إن تطوير طرق التحليل الجديدة المعتمدة على كل من المطيافية الكتلية والمطيافية الليزرية أمر بالغ الأهمية والتشويق[٧٥- ٧٨] في هذا الحقل لحظة تأليف هذا الكتاب. وبالرغم من استخدام المطيافية الكتلية بشكل واسع في تحليل هذه المركبات مع توفير تحديد فعلي للكتلة إلا أن هناك صعوبة في جعل العينة متطايرة (volatisation of the sample) في المرحلة الغازية (gas phase) قبل الحقن في جهاز التحليل. يمثل هذا المتطلب الأولي(متطلب الخطوة الأولي)، مشكلة محددة وبصفة خاصة للعينات غير المتحملة للحرارة(thermally labile) التي سرعان ما تتحلل (decompose) عند التسخين.

لمعالجة هذه المشكلة أو احتوائها، تم تطوير مدًى واسع من التقنيات لتحليل المركبات غير الطيارة، ونوجه القارئ إلى استعراض[٧٩] المزيد من تفاصيل ونقاش هذه التقنيات الجديدة. تشمل التقنيات التي استخدمت التفجير السريع للذرة (fast atom bombardment (FAB)[٨٠- ٨٢] والادمصاص الحقلي (field desorption (FD) وادمصاص الليزر (Laser desorption (LD)[٨٤، ٨٥] وقياس المطيافية الكتلية بادمصاص البلازما (plasma desorption mass spectrometry (PDMS)[٨٦، ٨٧] والمطيافية الكتلية الأيونية الثانوية (secondary ion mass spectrometry (SIMS).[٨٨ ، ٨٩] وبالرغم من أن هذه الطرق تحقق تحسناً ملحوظاً واستخداماً موسعا ممتداً، إلا أنها كلها تعاني من نفس المعوق وهو أن كلا من الادمصاص والتأين لا يمكن جعلهما في الوضع الأمثل بشكل منفصل، الأمر الذي يشكل صعوبة في كثير من الاستخدامات والتطبيقات الحقيقة.

وقد تم تطوير طرق ادمصاص الليزر والتي يتم فيها الفصل بين جعل العينة متطايرة والتأين، وبذلك يتم تحقيق حساسية عالية للعينات. وبينما تشترك كل الطرق في خطوة ادمصاص الليزر، إلا أنها تختلف في طريقة التأين ومن الأمثلة القليلة: (أ) ادمصاص الليزر زائداً تأين شعاع الإليكترون (electron beam ioniation) (ب) التأين الكيميائي تحت ظروف تفريغchemical ionisation under vacuum conditions) (ج) التأين الكيميائي تحت ظروف الجو العادي (الغلاف الجوي) (under atmosphnc condition) (د) تأين الفوتونات المتعددة الليزري (laser multiphoton ionisation) مع المطيافية الكتلية السريعة (time-of–flight mass spectroscopy (TOFMS) وبصفة خاصة تأين الفوتونات المتعددة المحفز بالرنين- المطيافية الكتلية السريعة (resonance enhanced multiphoton ionisation (REMPI- time-of–flight mass spectroscopy (TOFMS)) والتي تعتبر واحدة من أقوى الطرق لتحليل المكونات الدقيقة(trace components) في نسيج معقد(complex matrix).

إن الانتقائية العالية للـTOFMS- REMPI تتحقق بالجمع بين الكشف الانتقائي الكتلي(mass selective detection) مع عملية التأين الرنينية (resonant ionisation process)، وينتج التأين بالامتصاص المتتالي(successive absorption) لاثنين أو أكثر من فوتونات الليزر. عليه، من أجل التأين الفعال. يجب أن تكون طاقة الفوتون الأول رنينية مع إحدى الحالات الإليكترونية الحقيقة (one of real electronic states) في الذرة (الجزيء) (التحفيز الرنيني (resonance enhancement)). تعطي هذه الحالة انتقائية ثانية للتقنية: تأين انتقائي بالطول الموجي الليزري(Laser wavelength selective ionisation). زيادة على ذلك، من المميزات الواضحة الأخرى للـ REMPI-TOFMS، الحساسية الممتازة والانحلال (resolution) وكفاءة التأين الرئيس (major ionisation efficiency)

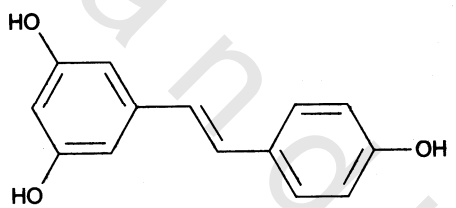
وسهولة ضبط السيطرة على التشظي الجزيئي (molecular fragmentation) وكثافة الليزر(laser intensity) وإمكانية التحليل المتزامن للمكونات المختلفة الموجودة في النسيج. وكنتيجة، أصبحت هذه التقنية جيدة التأسيس والثبات للتحليل الطيفي (spectroscopic analysis) إما للأبحاث الأولية الأساسية (fundamental research) [٩٠- ٩٤] أو للاستخدام عندما تكون هناك حاجة للتحليل الحساس للمكونات الدقيقة في النسيج المعقد أو حاجة لتحليل متزامن لعدد كبير من المكونات عبر مدى واسع من التركيزات.[٩٥- ١٠٠]

وكمثال، فإن تطور استخدام تقنية الليزر التي صممت خصيصاً لإجراء تحاليل مباشرة وسريعة للمركبات غير الطيارة في الفواكه والخضراوات، خاصة الترانس ريسفيراترول في العنب وأوراقه (vine leaves)، قد تم استعراضها هنا. اعتمدت الطريقة على الجمع بين ادمصاص الليزر (LD) ويتبعها الكشف بتأين الفوتونات المتعددة المحفز بالرنين والمطيافية الكتلية السريعة(REMPI-TOFMS). يمكن تصنيف الطريقة التحليلية هذه من بين المجموعة دي(d) المذكورة أعلاه ولكنها لا تستخدم شعاعاً عالي التردد فوق الصوتي (supersonic beam). وقد أعدت واعتبرت للانحلال الكتلي الوسطي (Intermediate mass resolution) (حوالي آر١٠ ^{٣}) (around R 10^3) بمستوى متوسط من البساطة التقنية (technical simplicity).

الـ ٣، ٥، ٤ ترايهايدروكسي استلبين 3, 5, 4 Trihydroxystilbene (*الترانس*- ريسفيراترول) مركب مضاد للأكسدة ينتج طبيعياً في عدد كبير من النباتات بما فيها العنب، وينتج كفايتواليكسين، ويوضح الشكل رقم (١٢,٥) الصيغة البنائية لهذا المركب. في أنواع الفيتيس Vitis spp يتجمع *الترانس*- ريسفيراترول في أوراق الكرمة وقشرة العنب استجابة لكائنات فطرية(fungal organisms) مختلفة، واستجابة للأشعة

Obeikandi.com

فوق البنفسجية(UV radiation) أو للكيميائيات[١٠١، ١٠٢] وقد وجد في النبيذ بتراكيزات تعتمد على ممارسات زراعة الكروم وصناعة الخمور (viticultural and enological practices).[١٠٣، ١٠٤] السبب الأول للاهتمام بتحليل *الترانس*- ريسفيراترول هو خصائصه الطبيعية المضادة للآفات(natural pesticide properties). كمياً، المكون الرئيس في استجابة فايتواليكسين الكرمة(grapevine phytoalexin response) هو *الترانس*- ريسفيراترول، والذي عرف أو تم توضيح أنه بتركيزات فسيولوجية مسمم للفطر(fungitoxic) ضد *البوتريتيس سينيريا* (*B. cenerea*)،[١٠٥] الفطر المسبب للعفن الرمادي(grey mould) أحد الممرضات الرئيسة للعنب.



الشكل رقم (١٢,٥). الصيغة البنائية للريسفيراترول.

بصفة عامة، يتم إجراء تحليل *الترانس*-ريسفيراترول بالطرق الكروماتوغرافية، طرق الفصل الكهربائي(Chromatographic methods) كروموتوغرافيا الغاز(GC)[١٠٦، ١٠٧] وكروموتوغرافيا السائل عالية الأداء (high performance liquid chromatography (HPLC)[١٠٨- ١١١] أو الفصل بالتفريد الكهربائي الشعيري (capillary electrophoresis (CE)[١١١،١١٢]. بصرف النظر عن تقنية الفصل(separation technique)، فإن تحليل الريسفيراترول في العنب والخمور يتطلب استخدام التركيز المسبق (previous concentration) و/أو الاستخلاص بمذيبات متعددة (multisolvent extraction) ، ذلك بسبب تعقيدات الأنسجة وانخفاض تركيز المادة المحللة(analyte). والتقنيات المستخدمة

بصفة عامة، هي الاستخلاص بالسوائل(liquid extraction) باستخدام المذيبات العضوية أو الاستخلاص بالوجه (الطور) الصلب(solid phase extraction).

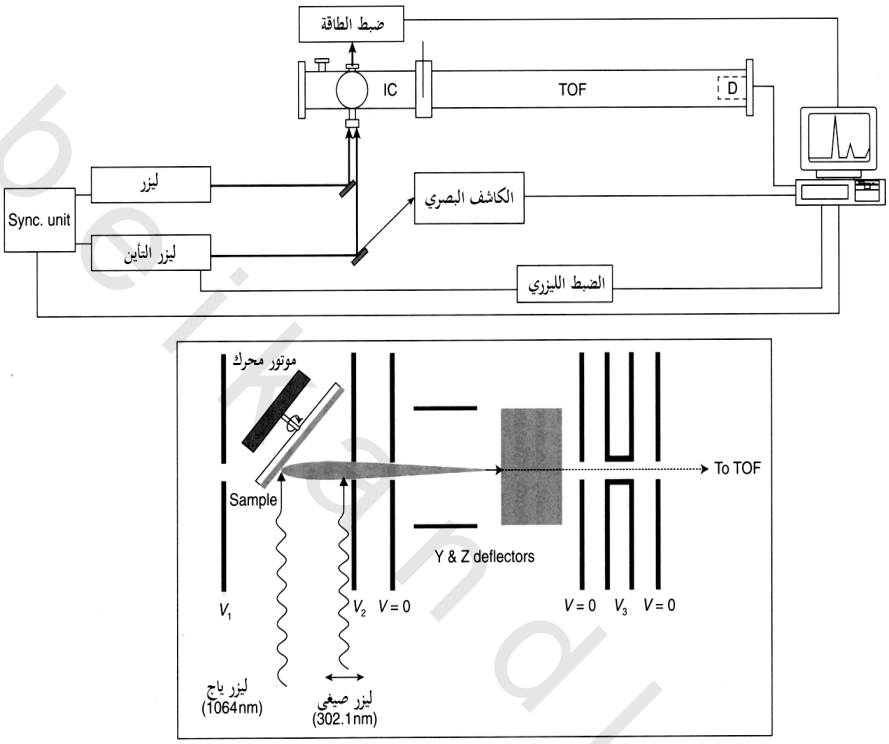
من المقبول بصفة عامة، أن تحضير العينة هو الخطوة الأساسية (المحددة للنجاح) في تحليل الريسفيراترول، ليس فقط بسبب الحاجة لعمليات تشغيل مكلفة ومحتاجة لوقت طويل، ولكن بسبب مصادر الخطأ التي تتولد أثناء هذه العمليات. وقد خلق هذا الوضع بعض الجدل والمناظرات بين مختلف المختبرات حول تقنيات تحضير العينات لدى كل منها.[١١٣- ١١٥] وقد أظهرت مراجعات متعددة لبعض طرق تحليل *الترانس*- ريسفيراترول[١١٦- ١١٨] اختلافات/فروقات كبيرة في القيم المنشورة وقد أرجع الاختلاف إلى إمكانية حدوث تناظر(isomerisation) أثناء عملية الاشتقاق (derivatisation) والفواقد المهمة التي تسببها الأكسدة والتناظر أو التحلل بالماء (hydrolysis) أثناء عمليات الاستخلاص والفصل، ووجود بعض مشتقات الريسفيراترول التي قد تتداخل مع النتائج المتحصل عليها. تمت مراجعة عدة طرق تحضير عينات استخدمت في تقدير *الترانس*–ريسفيراترول بكروماتوغرافيا السائل عالية الأداء[١١٩] (HPLC)، وقد شملت المراجعة مقارنة السمات أو الظواهر الأساسية لهذه الطرق.

في حالة عينات النبيذ(wine) وعصير العنب، تم تطوير عدة طرق[١١٥، ١٢٠- ١٢٢] لتحليل *الترانس*–ريسفيراترول بالحقن المباشر في نظام الـHPLC، ولكن في معظم الحالات يؤدي ذلك إلى الحصول على كروماتوغرامات (رسوم بيانية كروماتوغرافية) تظهر فيها قمم تمثل قمم وصول المواد المفصولة في عمود الكروماتوغرافيا (chromatograms) وتكون معقدة جداً، والتي لا تُمكِّن أحياناً، من التحديد و/أو التقدير الكمي للقمم، بصورة يُعوَّل عليها (موثوقة).[١١٩] لقد تم إجراء التحليل المباشر لـ *لترانس*- ريسيفيراترول في النبيذ بواسطة الفصل الكهربائي الشعيري الحركي/الكهربائي الميسيلي (الاستحلابي) (micellar electrokinetic capillary

(electrophoresis مع عدم وجود حساسية وبشكل واضح والذي يعزى وفقا للكاتب إلى الحاجة إلى تقنيات التركيز المسبق.[١٢٣]

إن الجمع بين ادمصاص الليزر (LD) المتبوع بكشف تأين الفوتونات المتعددة المحفز بالرنين REMPI والمطيافية الكتلية السريعة TOFMS قد يتغلب على مصادر الخطأ هذه كما أشير لذلك أدناه. لقد تم وصف التصميم التجريبي الموضح تخطيطيا في الشكل رقم (١٢,٦) مسبقا في مكان ما،[١٢٤] وعليه يقدم فقط، تقريراً مختصراً هنا.

بالضرورة، يتكون (تصميم التجربة الموضح في الشكل رقم ١٢,٦) من غرفتين مستقلتين/منفصلتين مفرغتين تفريغا عالياً. تستخدم الغرفة الأولى لكل من الادمصاص الليزري والتأين المسبق الليزري للعينة، يتبع ذلك تسريع الأيونات (ion accleration) نحو الغرفة الثانية، بصفة أساسية وحدة تسريع الوقت (time-of flight unit) مع كاشف لوحي ذي قناتين دقيقتين (two–microchannel plate detector). تستخدم قليل من النبضات الليزرية النانو ثانية (nano second laser pulses) من الابتعاث الأولي لليزر الـ ND:YAG لادمصاص العينة. ومن ثم، يستخدم ليزر التردد مزدوج الصبغة (frquency doublded dye laser) انتقائيا، لتأين المتعادل المدمص (desorbed neutral) بتأين الفوتونات المتعددة المحفز بالرنين (REMPI). إلى هذا الحد، يتم المسح الطولي الموجي الليزري النشط بدرجة مؤالفة (tunability) تتراوح من ٢٣٠ نانومتر إلى ٣٦٥ نانوميتر. وبالإضافة إلى التأين الانتقائي بسبب الـ REMPI، يتم توفير انتقائية إضافية باستخدام المطياف الكتلي، أي، توفير تعرف/تحديد كتلي (mass identification) وذلك، لجعل التقنية أكثر حساسية وشمولاً (more sensitive and universal).



الشكل رقم (١٢,٦). منظر/شكل تخطيطي للنظام التجريبي لتقنية إدمصاص الليزر.

إن الفصل بين كل من عمليتي الادمصاص والتأين ميزة مهمة في هذا التنظيم، لأن ذلك يُمَكِّنُ من دراسة الوضع الأمثل (Optimisation) لكل من العمليتين بشكل مستقل لكل منهما. وبالتالي، يتم تفادي بعض المعوقات، على سبيل المثال، تفادي الانحلال القمي للكتلة المنخفضية (low mass peak resolution) للادمصاص التأيني الليزري التقليدي المحفز بالنسيج convertional matrix assissted laser desorption/ionisation (MALDI).[٥٤] في الحالة المحددة؛ أي تحليل *الترانس-*

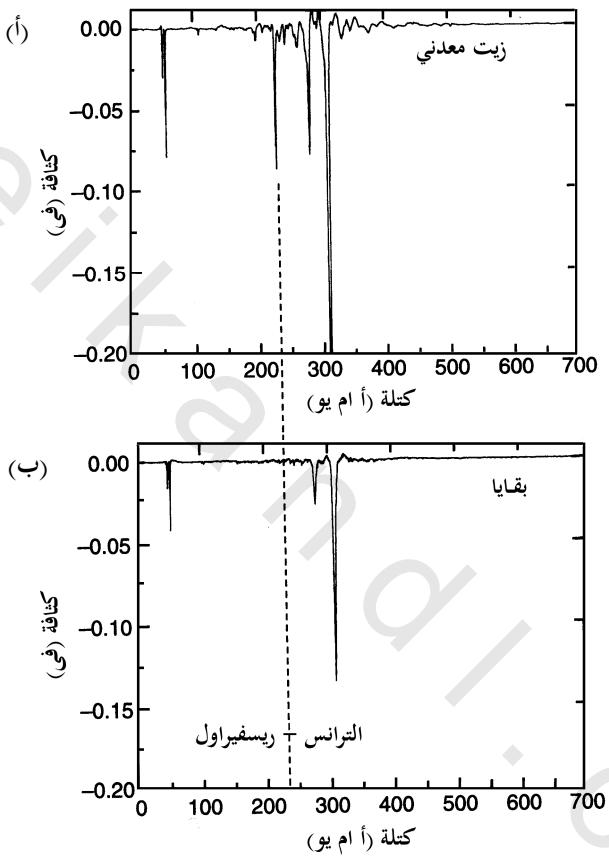
ريسفيراترول تضمن هذا التوضيع[١٢٥]: (١) تحفيز (تحسين) بمقدار ٢٠ ضعف (20- fold enhancement) في ناتج الادمصاص بخلط (المادة) المحللة analyte ببودرة الزنك Zn) powder) (الادمصاص المحفز ببودرة إم إي تال *ME*tal powder Enhanced desorption)، (٢) تقدير/تحديد أن *الترانس*–ريسيفراترول قد تم تأينه من خلال عملية لون–واحد وفوتنين (one-color–two–photons process)، (٣) منطقة تأين رنين (resonance ionisation region) بين ٣٠٢,٥ – ٣٠٧,٥ نانوميتر مع حد أقصى ١ عند ٣٠٢,١ نانوميتر، وهذا هو الطول الموجي الأمثل لتحليل *الترانس*–ريسفيراترول في العينات المعقدة.

المظاهر/الخواص الأساسية لهذه التقنية هي (١) عدم وجود لأي طريقة فصل لتحضير العينة، يستخلص *الترانس*–ريسفيراترول من العينة كليا (قشر العنب أو أوراق الكرمة) فقط بالضغط على البارد (cold–pressing) باستخدام ضاغط هايدروليكي(hydrolic press). (٢) يتم ناتج الادمصاص المحفز بخلط المادة المحللة مع بودرة معدن و(٣) انحلال عالٍ وحساسية عالية وحد كشف منخفض (low detection limit) يسببها كشف تأين الرنين الليزري وكشف المطياف الكتلي. عليه، فإن الجمع بين ادمصاص الليزر يتبعه كشف الـREMPI-TOFM يتغلب على مصادر الخطأ الرئيسة الموجودة في طريقة الكروماتوغرافيا المستخدمة بصفة شائعة لتحليل الريسفيراترول.

أثبتت الطريقة الحالية قدرتها على التحليل السريع الصحيح والمعول عليها *للترانس*–ريسفيراترول في العينات الزراعية(agricultural sample)، وبصفة محددة العنب وأوراقه، وكما أثبتت حدود كشف تصل إلى جزء في البليون.[١٢٦] و ذكر سابقاً أعلاه، بأنه أساساً، يتجمع *الترانس*–ريسفيراترول في قشرة العنب، ويُسهِّل هذا

التجمع الانتقائي (selective accumulation) التحليل ؛ إذ إنه يعمل كطريقة طبيعية للتركيز المسبق *للترانس*–ريسفيراترول. تحضر عينات العنب بتقشير الجلد (القشرة) والضغط على البارد بواسطة ضاغط هايدروليكي. سابقاً، اثبت بأن *الترانس*– ريسفيراترول يستخلص كلياً وبالتمام بهذه الطريقة السهلة.

يتم تقشير دفعة من عشرة حبات عنب ويضغط للحصول على ٠,٥ مل من الزيت الأساسي (essential oil) و ٥٨٠ ملجرام من بقايا الجلد (القشرة). ويوضح الشكل رقم (١٢,٧) الطيف المتحصل عليه تحت نفس ظروف التجربة في الحالتين. وبينما يوضح الشكل رقم (١٢,٧أ) المتحصل عليه من الزيت الأساسي لقشر العنب، إشارة مهمة *للترانس*–ريسفيراترول، لا تظهر إشارة مهمة معنوية في الطيف الموضح في الشكل رقم (١٢,٧ ب) ، أي المقابل لبقايا القشر. كل من الطيفين ذوي خلفية أعلى(noisier) من المعتاد نتيجة لحقيقة أن ظروف التجربة قد فرضت (ما يصل إلى ٥٥ مليجول نبضة لطاقة الادمصاص) من أجل التأكد من أن *الترانس*–ريسفيراترول قد بقي في البقايا. تؤكد هذه النتيجة موثوقية طريقة تحضير العينة لتحليل *الترانس*– ريسفيراترول بالادمصاص الليزري- تأين الفوتونات المتعددة المحفز بالرنين(REMPI-TOFMS) في العنب.



الشكل رقم (١٢,٧٢ (أ)). طيف تسريع الوقت (time of flight spectrum) لعينة زيت أساسي تم الحصول عليها بالضغط على البارد على جلد(قشر) ١٠ حبات عنب(٠,٥ مـــل). (ب) طيف تسريع الوقت تحت نفس الظروف التجريبيـــة للبقايـــا الـــتي تم الحصول عليها من هذه العينة بعد الضغط (٥٨٠ ملجرام)

obeikandl.com

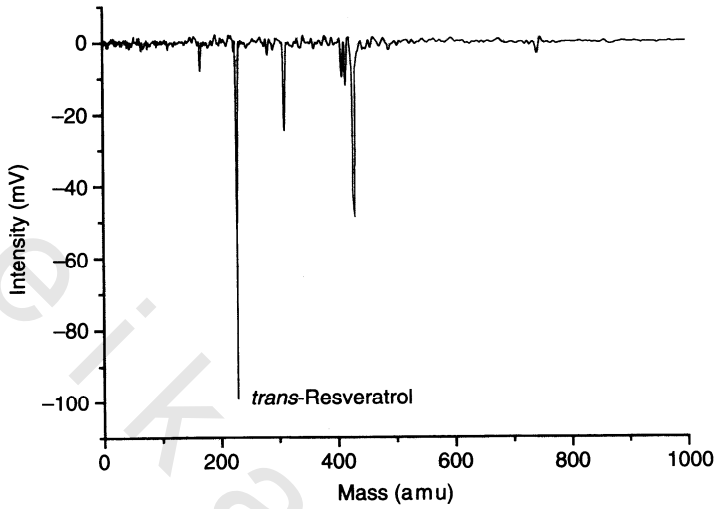
يعرض الشكل رقم (١٢,٨) طيف تسريع الوقت (time of flight spectrum) المتحصل عليه من عينة أوراق كرمة باستخدام نفس طريقة تحضير العينة. وتحت ظروف التجربة المعتادة، وكالسابق، فقد تأكد بأنه لم يتبقى أي *ترانس*-ريسيفراترول في بقايا الأوراق بعد الضغط على البارد. كانت قمة الريسفيراترول واضحة وملاحظة بوضوح مما يظهر كيف يُمكِّن/ويُسهِّل الجمع بين التأين الانتقائي زائداً براعة مطيافية تسريع الوقت TOFMS من التحديد الواضح والتحليل لمكون واحد بدون تداخل مع بقية مكونات العينة، وهذا بالطبع، واحد من المميزات الرئيسة لهذه التقنية الموجودة حالياً.

لهذه العينة (عينة أوراق الكرمة)، فقد قدر محتواها من *الترانس*—ريسفيراترول باستخدام طريقة الإضافات القياسية(standard additions method)أي، إضافة كميات معلومة من *الترانس*—ريسفيراترول لعدة عينات متماثلة متطابقة من زيت أساسي من الأوراق؛ القيمة المتحصل عليها للانترسبت (الجزء المحصور الواقع بين خطين في رسم بياني) مع المحور إكس(X axis) يعطيان كمية المادة المحللة في العينة الصفرية (blank). يتم الحصول على ٩ ميكروجرام(µg) *ترانس*—ريسفيراترول في كل جرام من الأوراق، أي ٩ جزء في البليون *ترانس*-ريسفيراترول، وبالرغم من أن هذه القيمة تبدو منخفضة عند مقارنتها مع قيم أخرى منشورة، إلا أنها ليست كذلك إذا وضع اعتبار للتطور الطبيعي (natural evolution) لمحتوى نبات الكرمة من *الترانس*-ريسفيراترول. ينتج *الترانس*-ريسفيراترول في بداية فصل الربيع (spring) لحماية النبات ضد العدوى وينخفض المحتوى مع التطور الموسمي للنبات (seasonal evolution)؛ عليه، فإن إنتاجه مثالي(optimum) في الأوراق الصغيرة (عمراً) أثناء شهر يونيو ويوليو.[١٢٧] في العنب ينخفض *الترانس*-ريسيفراترول مع النضج ويكون محتوى الثمار الناضجة منه

صفرا.[١٢٨] في هذه الحالة، فإن التجارب تجرى في شهر ديسمبر بعد حصاد العنب، وعليه، فليس بمستغرب أن نجد تركيزاً منخفضاً *للترانس*- ريسيفراترول في أوراق الكرمة.

لقد تم حساب حد الكشف لتحليل الترانس-ريسيفراترول في أوراق الكرمة من هذا الطيف. حدود الكشف لطريقة ما، هي أقل تركيز للمادة/للمواد المحللة والذي ينتج استجابة قابلة للكشف فوق مستوى الضوضاء/الضجيج للنظام؛ وبصفة عامة أو عادة، يفترض أن يكون هذا ثلاثة أضعاف مستوى ضوضاء (النظام). ومن هنا فإن حدود الكشف الأفضل عن ٠,٠٠٢ جزء من المليون أي ما يساوي ٢ جزء من البليون *للترانس*-ريسفيراترول في أوراق الكرمة، قد تم حسابه، والذي يساوي أو يعتبر ثابتاً متماشياً ومتوافقاً مع الحد الذي وجد سابقاً لقشر العنب. هذه القيمة متوافقة مع قيم الأعمال السابقة، أيضاً مع مجموعة المؤلف، والتي ذكرت حدود اكتشاف بمقدار ٥ جزء في البليون *ترانس*_ريسفيراترول في قشر العنب،[١٢٥] ويبدو أنه متوافق مع آخر تقنيات (مهارات) التحليل الكيميائي، للمركبات غير الطيارة غير المتحملة للحرارة (thermally labile).

استخدمت هذه التقنية لدراسة إثارة، استخراج الريسفيراترول في العنب بعد الحصاد (post-harvest elicitation) بعوامل/وسائل خارجية عديدة. وبالتالي، فقط أجريت عدة تجارب تم فيها الاستخدام الخارجي للريسيفراترول في كثير من الفواكه للمحافظة على جودتها بعد الحصاد، وكما سيوضح في القسم رقم ١٢,٧.



الشكل رقم (١٢,٨). طيف تسريع الوقت (time of flight spectrum) من عينة أوراق عنب تم الحصول عليها تحت الظروف التجريبية العاديـــة E_d=٤٠ مليجول/نبضـــة علـــى ١٠٦٤ نانوميتر؛ E_i = ٨٠٠ ميكروجول/نبضة على ٣٠٢,١ نانوميتر ،

E_d=40 mJ pulse / at 1064 nm;
E_i=40 μJ /pulse at 302,1 nm

(١٢,٥) طرق تحسين المقاومة الطبيعية للفواكه

Method for Improving Natural Resistance in Fruit

سيتم استعراض دور علم أمراض النبات (plant pathology) فيما يعرف بالإدارة المتكاملة للآفات ((Integrated pest management (IPM)، في هذا الجزء.

هناك حاجة لتخزين كميات كبيرة من الفواكه لفترة قد توصف بأنها طويلة قبل أن تسوق للمستهلكين، مما يسبب فواقد كبيرة بسبب هجوم الممرضات والشيخوخة الطبيعية. لا تخلو الحلول المؤسسة جيداً لتحسين هذا الوضع والمعتمدة على استخدام مبيدات الآفات الاصطناعية(synthetic pesticides) من المشاكل، ذلك فيما يتعلق بالمخاطر المحيطة بصحة البشر والتأثيرات البيئية التي تسببها مبيدات الآفات الكيميائية(chemical pesticides).

obeikandl.com

تعتمد الإستراتيجيات الجديدة المتخذة لحل هذه المشاكل على تطوير طرق لتحسين المقاومة الطبيعية للنباتات باستخدام عملياتها الطبيعية الذاتية المثبطة للآفات من أجل السيطرة على الفساد.

لقد أجريت أبحاث كثيرة لتحديد نواتج أيض النباتات الثانوية تلك وللتعرف عليها، ولفهم التفاعلات المتداخلة بين المضيف–الطفيل (host-parasite interaction).[١٢٩- ١٣١] على سبيل المثال، منذ ١٩٩٠ نشرت كثير من الدراسات والتي تناولت تطور النباتات المعدلة/المحورة وراثياً المقاومة للمرض (disease-resistant transgenic plants).

وعلى أي حال، ما زال التحليل الوراثي الشامل للتفاعلات المتداخلة للعائل–الطفيل غير عملي(impractical)، بحيث ما زال استخدام المعالجة النباتية المرضية التقليدية (classical phytopathologic approach) لتنشيط استجابات النبات الدفاعية، مستمرا.[١٣٩، ١٤٠]

فيما سيأتي، يتم عرض أمثلة لآخر ما تم التوصل إليه (state-of-the-art) في الدراسات العلمية بعد الحصاد باستخدام معالجات مختلفة لتحسين المقاومة الطبيعية في الفواكه. وسيتم تغطية الموضوعات التالية:

١- الطرق المتولدة بالضغوط(stress-induced methods): طرق معالجات إنقاص الأُكسجين في الأنسجة وطرق أخرى (anoxic & other treatments).

٢- الاستخدامات المباشرة الخارجية للفايتواليكسينات النباتية كمبيدات آفات طبيعية.

٣- تثبيط تحلل الفواكه (fruit decay inhibition).

٤- النباتات المحورة وراثياً المقاومة للمرض.

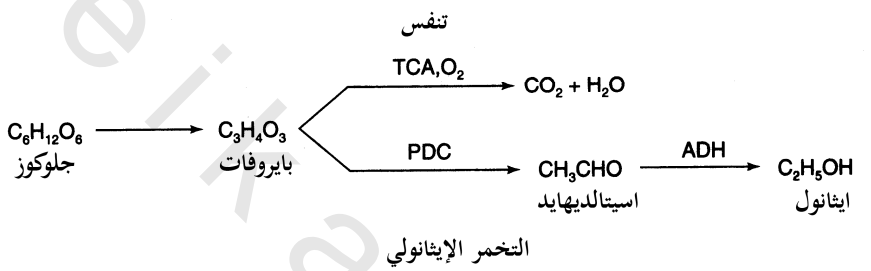
obeikandi.com

(١٢,٦) معالجات إنقاص الأُكسجين وغيرها
Anoxic and Other Treatments

أحد الحلول المستخدمة لتقليل فواقد ما بعد الحصاد، التخزين في جو متحكم فيه(controlled atmosphere storage)؛ تخزن محاصيل معينة تحت ظروف مختلفة (تركيزات أُكسجين منخفضة، درجة حرارة منخفضة، تركيزات ثاني أُكسيد كربون عالية... إلخ) لإبطاء العمليات الأيضية مثل الإنضاج. مع هذا المشهد، من المهم مراقبة الاستجابات الأيضية للمحاصيل المحصودة تحت هذه الظروف من أجل تطوير أنظمة تخزين جيدة.

إحدى العمليات تحت الدراسة هي الموازنة بين التنفس والتخمر الكحولي، الذي يعتمد على أحوال تركيزات الأُكسجين.[٧١، ١٤١، ١٤٢] في الظروف الهوائية الطبيعية (٢١٪ أُكسجين) تنتج النباتات الطاقة من خلال التنفس بأكسدة البايروفات(oxidation of pyruvate)، من خلال دورة كربس(tricarboxylic acid cycle (TCA)) والفسفرة التأكسدية(oxidative phosphorylation) في وجود أُكسجين الجو(O_2 atmospheric)، إلى ثاني أكسيد كربون وماء. تحت ظروف عوز(عدم وجود/نقص) الأُكسجين(anoxic conditions)، على النبات أن ينتج الـ ATP (الأدينوزين ترايفوسفات (Adenosine triphosphate) بدون استهلاك أُكسجين بعمليات تخمر مختلفة؛ هذه الظاهرة شائعة في الطبيعة (common in nature)، على سبيل المثال، تحت ظروف الفيضانات (flooding) والثلوج (ice-encasement) فقد طورت النباتات مسارات تخمر(fermentation pathways) مختلفة والتي تلعب دوراً مهماً في البقاء أثناء الأوقات الطويلة لعوز الأكسجين. وأحد مسارات التخمر الأكثر شيوعاً هو التخمر الإثانولي (الكحولي ethanolic fermentation) والذي فيه تتم إزالة مجموعة الكاربوكسيل (de carboxylated) من البيروفات وتحويله إلى أسيتالديهايد بواسطة

أنزيم البيروفات ديكاربوكسيليز ((pyruvate decarboxylase(PDC)، والذي من ثم يتم اختزاله إلى إثانول بفعل إنزيم الكحول الديهايدروجينيز (alcohol dehydrogenase (ADH)). ويوضح الشكل رقم (١٢,٩) كلا من العمليتين تخطيطاً.



الشكل رقم (١٢,٩). عمليات التنفس والتخمر الإثانولي (الكحولي).

وإذ إن التوازن بين العمليتين يعتمد على تركيز الأُكسجين، فإن دراسة المقاييس التي تقدر التنفس للتخمر أمر مهم جداً من أجل توضيح تخزين المحصول عند تركيز أُكسجين منخفض. لهذا السبب، فإن الابتعاث وتأثيرات الإثانول والاسيتالديهايد تحت ظروف نقص الأُكسجين(anoxic conditions) أمر بالغ الأهمية والتشويق.[١٤٣- ١٤٥]

بصفة عامة، الأسيتالديهايد سام (مسمم) لخلايا النباتات، ذلك بسبب شدة تفاعله(high reactivity). وقد أجريت عدة بحوث حول تأثيراته في عمليات النضج بالاستخدام الخارجي المباشر له و/ أو استخدام الإثانول.[١٤٦] في الطماطم، تم توضيح أن التركيز المنخفض للأسيتالديهايد يثبط النضج، ولكن تعتمد النتائج على النضج الأولي للثمرة(initial fruit ripening) وعلى التركيز المستخدم وعلى فترة التعرض؛ في المقابل يُسرع الأسيتالديهايد شيخوخة الكمثرى والأويسة (عنب الدب).

عامل مهم يجب أن نتذكره عند تخزين المحاصيل في جو منخفض الأُكسجين متحكم فيه ؛ هو معدل استعادة الظروف اللاهوائية. وبعد فترة استنزاف الأُكسجين(oxygen deprivation) ، قد تسبب إعادة التعرض(re-exposure) للهواء تحطيم (إتلاف) أنسجة النبات ، وفي بعض الأحوال يكون ذلك أكثر ضرراً من عدم توفر الأُكسجين نفسه.(١٤٧)

إن العامل المسبب للخطر الحادث في أنسجة النبات ما بعد عوز الأُكسجين(post-anoxic) ، هو الأسيتالديهايد. أثناء عوز الأُكسجين ، يحصل النبات على طاقة من خلال التخمر الكحولي وبالتالي يتجمع الإثانول في الأنسجة. وعندما يعاد تعرضه للأُكسجين ، يتأكسد الإثانول إلى الأسيتالديهايد ، والذي يعتقد بأنه مسئول عن أذى ما بعد عوز الأُكسجين. يحدث ابتعاث الأسيتالديهايد بعد دقائق قليلة من استعادة(recuperation) الحالة الطبيعية للأُكسجين(normoxic condition) كما تم توضيحه ، أن إثباته في الفلفل الأحمر (red peppers) ،(١٩) وهذه إشارة واضحة إلى أن أكسدة الإثانول سببها التكون السريع لأنواع الأُكسجين النشطة (active oxygen species (AOS)) مثل فوق أُكسيد الهايدروجين (الهايدروجين بيروكسايد hydrogen peroxide).(١٤٨، ١٤٩)

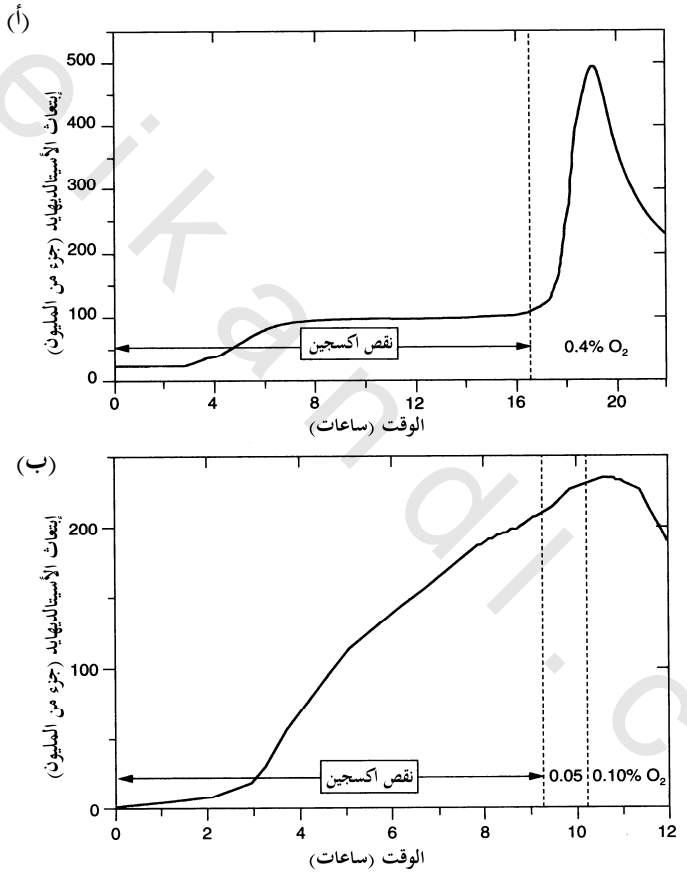
وقد تم توضيح أن الاستعادة المتدرجة لأحوال الأُكسجين الطبيعي قد تقلل الآثار الضارة لاستعادة التهوية (reaeration). وقد أثبت هذا الأمر ، وعلى سبيل المثال ، في فلفل الريد بيل (الشطة صنف الريد بيل red bell pepper) بقياس ابتعاث الأسيتالديهايد ما بعد عوز الأُكسجين كدالة لمعدل/ سرعة استعادة تركيز الأُكسجين (function of the restoration rate of the O_2 concentration) ،(٦٠) وكما يرى في الشكل رقم (١٢,١٠).

يوضح الشكل رقم (١٢,١٠ أ) ابتعاث الأسيتالديهايد في الفلفل (صنف الريد بيل) تحت ظروف عوز الأُكسجين، تتم ملاحظة بدء التخمر بوضوح بالقمة البالغة حوالي٣,٥ساعة بعد إدخال الثمار في بيئة عوز الأُكسجين(anoxic environment). وكما تمت الإشارة إليه أعلاه، فإن التحول المباشر إلى جو طبيعي الأُكسجين (normoxic) atmosphere يؤدي إلى ارتفاع مفاجئ في تركيز الأسيتالديهايد ؛ وفي هذا المثال، تمت محاولة تثبيط الأسيتالديهايد بإضافة ٠,٤٪ أُكسجين ما بعد عوز الأُكسجين (post-anoxic addition)، ولكن حتى هذا التركيز البسيط للأُكسجين أنتج إفرازاً عالياً للأسيتالديهايد واستمر إفرازه لمدة حوالي ٢٠ دقيقة، كما هو موضح بجلاء في الشكل رقم (١٢,١٠ أ). وفي تجارب تالية (الشكل رقم ١٢,١٠ ب)، استخدمت تركيزات أُكسجين منخفضة في تهوية عينة فلفل الريد بيل. وبعد حوالي ٩ ساعات تحت ظروف عوز الأُكسجين تم إدخال ٠,٥٪ أكسجين في الكيوفيت(cuvete)، مما أدى إلى زيادة بنسبة ٢٠٪ في ابتعاث الأسيتالديهايد في مدة ساعة ؛ من هذه النقطة، أدت زيادة محتوى الأُكسجين تدريجياً، إلى انخفاض (بطيء) في إنتاج الأسيتالديهايد.

فتح هذا الاكتشاف الطريق لأبحاث متتالية في موضوع توضيع/تهيئة الأحوال/الظروف التي فيها يستعاد الجو الطبيعي للأُكسجين في مخازن جوها، جو أُكسجين منخفض متحكم فيه (low oxygen CA storage facilities)، بهدف تثبيط الأسيتالديهايد، وبالتالي، تثبيط ضرر (إتلاف) الفواكه والخضراوات ما بعد عوز الأكسجين. وفي دراسات لاحقة لنفس المجموعة، لم يستطع الباحثون منع الارتفاع المفاجيء للأسيتالديهايد في فاكهة الأفوكادو بالاستعادة البطيئة للوضع الطبيعي للأكسجين بعد عوزه.[١٥٠] ومن الواضح، هناك حاجة لمزيد من الأبحاث لتصميم طرق عامة لتثبيط أذى (إتلاف) ما بعد عوز الأُكسجين للنباتات.

لقد درست معالجات عوز الأكسجين في مختبر المؤلف بهدف استخراج *الترانس*- ريسيفراترول فايتواكسين في العنب بعد الحصاد. أوضحت النتائج المتحصل عليها أن هناك زيادة في محتوى الريسفيراترول مع المعالجات التي تصل إلى ٢٤ ساعة،

ولكـن أوضـح مسـار (طـول) وقـت التطـور بـأن المحافظـة علـى المحتـوى العـالي للريسـفيراترول تتحقـق بشـكل أفضـل مـع معالجـات نقـص الأكسـجين القصـيرة (الـتي تستغرق وقتاً قصيراً حوالي ٦ ساعات).



الشكل رقم (١٢,١٠) (أ). إفراز الأسيتالديهايد في الفلفل الأحمر صنف الريد بيل تحت أحوال أكسجين مختلفة. سبب الارتفاع المفاجيء للأسيتالديهايد بعد عوز الأكسجين إدخال فقط، ٠,٤ أكسجين والملاحظ بشكل واضـح. (ب) تثبـيط الارتفـاع المفـاجيء للأسيتالديهايد بعد عوز الأكسجين في الفلفل الأحمر صنف الريد بيل بالاستعادة التدريجية لتركيز الأكسجين٠مأخوذ من المرجع رقم(٦٠ (Oomens et al.,).

أخيراً، يستخدم التطور الذي حدث في آثار إحداث إجهاد في الفواكه (بالتحديد العنب) الأشعة فوق البنفسجية (UV) على الفواكه.[١٥١- ١٥٥] والمثال الجيد لهذه الطريقة هو الطريقة التي طورها كانتوس وآخرون،[١٥٦] والتي فيها تحققت زيادة في محتوى الريسفيراترول بمقدار ١١ ضعف تشعيع العنب لوقت قصير جداً (٣٠ ثانية) عند طول موجة ٥٣٤ نانوميتر(λ = 534nm)، مع بقاء الخواص الحسية للفاكهة بدون تغيير. في الجانب الآخر، تم توضيح أن الأشعة فوق البنفسجية قد تقلل عفن عنب الطاولة (table-grapes) بعد الحصاد.[١٥٧]، [١٥٨] وقد بحثت الدراسات اللاحقة فقط، وقت تطور العنب المتلف ولم يتم إجراء أي تحليل كيميائي. وعلى أي حال، فقد تم إثبات الارتباط بين تحسين المقاومة الطبيعية الملاحظة للعنب، وانتزاع محتوى الريسفيراترول بجلاء، في المراجع ١٥١-١٥٦. وكما تم توضيح المثال على هذا الارتباط، في القسم التالي.

(١٢,٧) استخدام الفايتوالكسينات النباتية

Application of Plant Phytoalexins

كما أشير مبكراً، وللحظة كتابة هذا الكتاب تم التعرف على عشرات الآلاف من نواتج أيض النبات الثانوية وهناك براهين تشير إلى أن معظم هذه المركبات تشترك في الآليات الدفاعية للنباتات، وبذلك تمثل مخزوناً كبيراً لمبيدات الآفات الطبيعية التي تستخدم لمكافحتها.[١٥٩] في الحالة المحددة لنبات الكروم، أحد أهم آليات مقاومتها للأمراض الفطرية تتضمن تصنيع *الترانس*-ريسيفراترول كاستجابة للعدوى.[١٦٠- ١٦٢]

أجريت معظم الأبحاث في خاصية السمية الفطرية (fungi toxic character) للريسيفراترول حول دوره ضد *البوتریاتیس سینیریی (Botrytis cinerea)*، ولكن قد تم توضيح أن الريسيفراترول يحسن مقاومة نبات الكروم لأنواع أخرى مثل *الرايزوبس*

استونيفر (Rhizopus stonifer).[١٥٥] *والبلازموبارا فيتيكولا (plasmopara viticola)*[١٦٣] *والفوموبيسيس فيتيكولا (phomopsis viticola)*[١٦٤]. تجعل الخاصية المضادة للفطر غير المحددة نوعاً ما والتجمع الانتقائي *للترانس*-ريسفيراترول في قشر العنب تجعل من *الترانس*-ريسيفراترول مبيد آفات طبيعيًّا جيدًا ضد هجمات الممرضات، وكذلك لتحسين مقاومة العنب الطبيعية للعدوى الفطرية.

من أجل إثبات هذه الإمكانية، تم غمر عدة عناقيد عنب في محلول مائي للريسيفيراترول (٦ر١× ١٠ ⁻ ٤ إم، 1.6×10^{-4}m). وتم غمر عدد مماثل من العناقيد في ماء مقطر تقطيراً ثنائيًّا (مرتين، bidistilled water) لنفس الوقت. بعد هذه المعاملة قصيرة الوقت، حفظت الثمار في الهواء الطلق(open air) على درجة حرارة الغرفة. يوضح الشكل رقم (١٢,١١) النتائج المتحصل عليها للعنب الأبيض صنف الأليدو (Aledo variety).[١٦٥، ١٦٦] ثم الحصول على الصورة بعد عشرة أيام من المعاملة وقد تمت ملاحظة وجود فروقات معنوية في مجموعتي العناقيد؛ فبينما حفظت العناقيد المعاملة بالريسيفراترول شكلها الفيزيائي (الطبيعي) بدون علامات فواقد أو تدهور، جفت العناقيد التي لم تعالج أو تعامل وليس ذلك فقط، بل أصيبت بالعدوى بشكل واضح وتدهورت مع تطور موضعي للفطريات.

فتحت هذه النتيجة الطريق لبحوث متتالية لفواكه أخرى. وفي الحقيقة، فإن الفطر النباتي الممرض(phyto pathogenic) الـ *B. cinerea* قد يعدى مدى واسعاً من النباتات العائلة بدون تخصص واضح (apparent specialization) [ثمار العناب (berry fruits) وخضراوات بستانية (horticultural vegetables) ونباتات أحادية الفلقة (monocotyledons) والخضراوات البصلية (bulbs) ونباتات الزينة (ornamentals).... إلخ] وأنه قادر على عدوى أكثر من ٢٣٥ من أنواع نباتات محددة.[١٦٧] بالإضافة لذلك، قد

نقلت جينات عنب الكرمة (نبات معترش من الفصيلة الكرمية ثماره حلوة معروفة) التي ترمز(encoding) للريسيفراترول سينثيز (resveratrol synthase)، إلى النباتات التي عادة، لا تنتج هذا المركب مثل التبغ(tobacco)، [١٣٥، ١٣٦] والأرز[١٣٧] والطماطم[١٣٨] مع نتائج مرضية، وقد نقلت النشاط المضاد للفطريات *للترانس*-ريسيفراترول إلى الأنسال الجينية (الوراثية) المحورة (transgenic line)، والحصول على مزيد من النباتات المقاومة.

ومن أجل إثبات قدرات الريسفيراترول كمبيد آفات طبيعي، أجريت بحوث متتالية في استخداماته في فواكه أخرى غير العنب، وقد حصلت على نتائج مشابهة، باستثناء وقت التعفن. وقد تم الحصول على نتائج رئيسة للتفاح والطماطم والأفوكادو والفلفل. ويفتح هذا الكشف الجدير بالاهتمام، الطريق نحو المحافظة على جودة الفواكه بعد الحصاد بالاستخدام الخارجي للريسيفراترول (exogenous application of resveratrol).

ومن المثير للاهتمام والمشوق أن نذكر أنه بالرغم من ادعاء بعض الكتاب/ المؤلفين بأن المخاطر الصحية للإنسان والمرتبطة باستهلاك الكيميائيات الطبيعية الموجودة في الأغذية، قد تكون حتى أكبر من مخاطر بقايا مبيدات الآفات، [١٦٨، ١٦٩] فقد أثبتت عدم سمية الريسيفراترول، مسبقاً. ومن الفعاليةً، أن أحد المراحل الرئيسة لتطور مبيدات الآفات الطبيعية الجديدة هي مرحلة دراسة الخواص السمية والبيئية(toxicological and environmental properties) للمركب المراد استخدامه.[١٥٩] عوامل السيطرة البيولوجية (الحيوية) هي بعض البدائل المثيرة للاهتمام، فيما يتعلق باستخدام مبيدات الآفات الكيميائية الضارة، ولكن لابد من إثبات مأمونيتها فيما يتعلق باستهلاك الإنسان. في حالة الريسيفراترول ركزت أعداد كبيرة من البحوث في الوقت الحالي، على الفوائد الصحية لاستهلاك الريسفراترول (انظر المراجع

١٧٠-١٧٣ للاستعراضات التي تناولت هذا الموضوع)، وكما أعطت استهلاك الريسيفراترول قيمة مضافة كمبيد آفات طبيعي.

(١٢,٨) المعاملة (المعالجة) الحرارية قبل التخزين
Prestorage Heat Treatment

استخدمت المعاملة الحرارية، منذ سنوات عديدة، للسيطرة على أمراض المنتجات المحصودة ولمقاومة عدوى الحشرات(insect disinfection) في الخضراوات والفواكه. وبالرغم من أن المعاملة الحرارية شائعة بالحجم التجاري منذ بدايات القرن العشرين، إلا أن هذا الاستخدام قد ترك مع تطور مبيدات الآفات الاصطناعية والكيميائية. في الوقت الحاضر، ومع تزايد وعي المستهلك حول مخاطر استخدام الكيميائيات الزراعية(agrochemicals)، وكما أشير إليه مسبقاً، فقد كان هناك اهتمام متولد ومنبعث، بالمعاملة الحرارية بعد الحصاد(post-harvest heat treatment)، وهي إحدى المعالجات غير الكيميائية الأكثر وعداً فيما يتعلق بالحفظ و/أوالمحافظة على جودة المنتجات البستانية.[١٧٤]

بصفة عامة، يمكن تقسيم المعاملة الحرارية التقليدية إلى معاملة لوقت قصير (لمدة ٦٠ دقيقة في الماء على ٤٥- ٦٠°م) أو معاملة لوقت طويل، وما يعرف بمعاملة التقديد (curing treatment) (لمدة ١٢ ساعة إلى ٤ أيام في بخار أو هواء جاف على ٣٨- ٤٦°م).[١٧٥] وبالرغم من أن معاملات التقديد هي الأولى (السابقة) استخداماً وآثارها المفيدة فيما يتعلق بخفض تعفن المحاصيل وتحسين (تمديد) فترة الصلاحية قد أثبتت بدرجة كبيرة، إلا أن هذه التقنية صعبة التنفيذ على المستوى التجاري، وذلك نتيجة لتكاليف تسخين أحجام كبيرة من الفواكه لفترات طويلة. ولقد أثبتت الآثار المفيدة لغمر كثير من الفواكه والخضراوات قبل التخزين (prestorage hot water dipping).[١٧٦]

التقنية المنفذة/المستخدمة في هذا الحقل طريقة للغسيل والتعقيم المتزامنين، للمنتجات الطازجة المحصودة، وهي معاملة الشطف بالماء الساخن والفرش لوقت قصير ((short hot water rinse and brushes treatment (HWRB)).[١٧٧] تشتمل المعاملة المصممة لتكون جزءاً من خط الفرز الذي يستخدمه المُنْتِج (product sorting line)، على وضع المحاصيل على فرش مدورة (rotating brushes) وشطفها بالماء الساخن (عند درجات حرارة متغيرة اعتماداً على نوع الفاكهة) لوقت قصير جداً (نموذجياً ١٠-٣٠ ثانية).[١٧٤]

أحد الآثار الرئيسة للمعاملة الحرارية بما في ذلك الشطف بالماء الساخن والفرش لوقت قصير(HWRB)، التعقيم. يتم تثبيط عفن المحصول بالفعل المباشر للغسيل بالماء(direct cleaning action) زائداً الفعل القاتل للحرارة على المرضات على سطوح الفواكه؛ ويمكن تحفيز الفعل الأخير هذا، بإضافة مبيدات الفطريات في الماء المستخدم في المعاملة، وبذلك تحسين أداء المركب الكيميائي الزراعي، وبالتالي تقليل الجرعات المطلوب استخدامها.[١٧٨-١٧٩] وعلى أي حال، لا يفسر التعقيم بذاته تثبيط العفن الملاحظ، إذ إنه غير كاف لمنع المزيد من العدوى أثناء التخزين، وقد وجد أنه قد يكون للمعاملة الحرارية أثر غير مباشر من خلال توليد استجابات دفاعية من الفواكه المعاملة.[١٨٠-١٨٢]

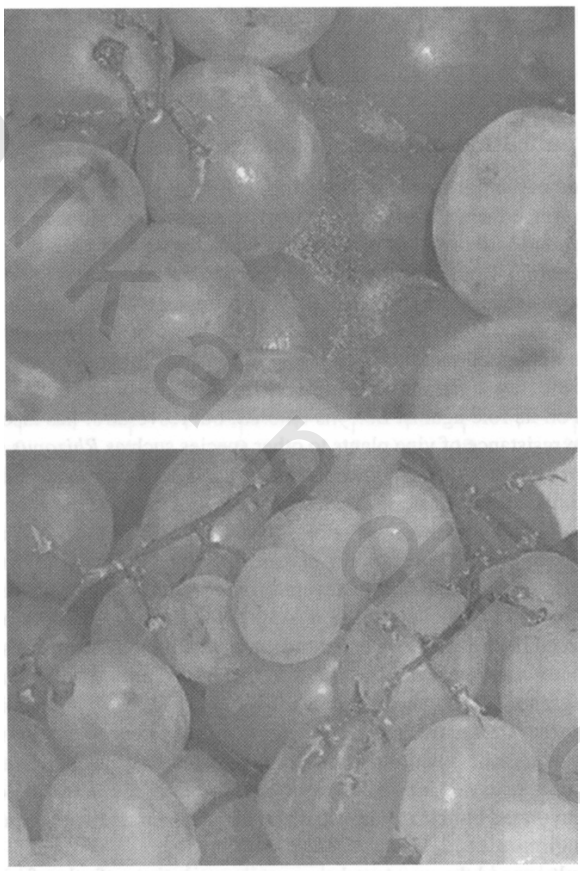
جزء مهم من المقاومة المحفزة هذه، هو تحسن في التئام/ برء الجراح (wound healing). تُذيب الحرارة شموع القشرة الخارجية (epiticular waxes) وتملأ شقوق الطبقة الشمعية(cracks in the cuticle) لتفادي استخدامها كمواقع اختراق من قبل المرضات. زد على ذلك، يتم تغليف الجراثيم النابتة في هذه الجروح الصغيرة الدقيقة وتثبيطها بفعل الشمع المذاب(molten wax).[١٧٧، ١٨٣] وفضلاً عن هذا الأثر الفيزيائي، فقد وصفت بعض الاستجابات الفسيولوجية في الفواكه بعد المعاملة الحرارية؛ ومنها توليد بروتينات ذات علاقة بالمرضات (PR) مثل الشيتينيز (chitenase) أو بيتا - ١، ٣- جلوكانيز B-1. 3- glucanase؛ وتثبيت الأغشية الخلوية (stabilisation of cell

(membranes ؛ بعث/استخراج المركبات المضادة للفطريات ؛ وتثبيط تصنيع الإنزيمات المحللة للجدران (wall hydrolytic enzymes) (البوليجلاكتيورونيزات، polygalacturonases) ؛ و/أو تأخير معدل هدم المركبات المضادة للفطريات سابقة التكوين الموجودة في الفاكهة غير الناضجة.[١٧٤، ١٨٤]

يجب ضبط الظروف المثلى لمعاملة الشفط بالماء الساخن والفرش (HWRB) لتناسب كل محصول على حدة، لأن القياسات المستخدمة (بالتحديد الوقت ودرجة الحرارة) تعتمد على نوع الفاكهة أو الخضراوات المعالجة. ويوضح الشكل رقم (١٢,١٢) مثالين.

يوضح الشكل رقم (١٢,١٢ أ) تأثيرات (المقاسة بنسبة حدوث العفن) معاملة الشطف بالماء الساخن والفرش لمدة ١٥ ثانية وعلى خمس درجات حرارة مختلفة، على ثمار التفاح (التفاح الذهبي اللذيذ Golden delicious)[١٨٥] ؛ تجرى المعاملات فوراً بعد الحصاد ويقاس العفن بعد ٤ أشهر من التخزين على ١° م زائداً ١٠ أيام على ٢٠°م. يزيد تثبيط العفن مع ارتفاع درجة الحرارة حتى ٥٥°م، حيث تم حفظ الفاكهة بنسبة ٧٠٪ زيادة عن ما تحقق من حفظ للمجموعة المرجعية (غير المعاملة). على درجات حرارة أعلى، أدت المعاملة لتحطيم/إتلاف حراري(heat damage) للفاكهة وكان العفن حتى، بدرجة أكبر مما في المجموعة المرجعية. يوضح الشكل رقم (١٢,١٢ب) تأثيرات كل من درجة الحرارة والوقت بإثبات حدوث التعفن في الفلفل الحلو بعد معاملة الشطف بالماء الساخن والفرش HWRB على ثلاث درجات حرارة مختلفة ٥٠ و٥٥ و٦٠°م) ومرتين عند كل درجة حرارة (عند الثانية١٢ والثانية ٢٨).[١٧٧] أعطت معاملات الـ١٢ ثانية نتائج مشابهة للنتائج المتحصل عليها من التفاح ؛ وجد أن درجة الحرارة المثلى هي ٥٥°م مما يمكّن من حفظ الفاكهة بزيادة تصل إلى ٧٣٪ أكثر مما تحقق من حفظ للعينات المرجعية (التي غسلت بفرش جافة، فقط). في المقابل أعطت عينات الـ ٢٨ ثانية نتائج سالبة في كل الحالات والتي سببها الأساسي (النتائج السالبة) هو الإتلاف الحراري للفاكهة والناتج من طول فترة

المعاملة. وهذا هو الحال تحديداً، للعينات المعاملة بـ ٥٥ و٦٠°م، والتي يبلغ الإتلاف فيها نسبة ٥٪ و٤٠٪، على التوالي.



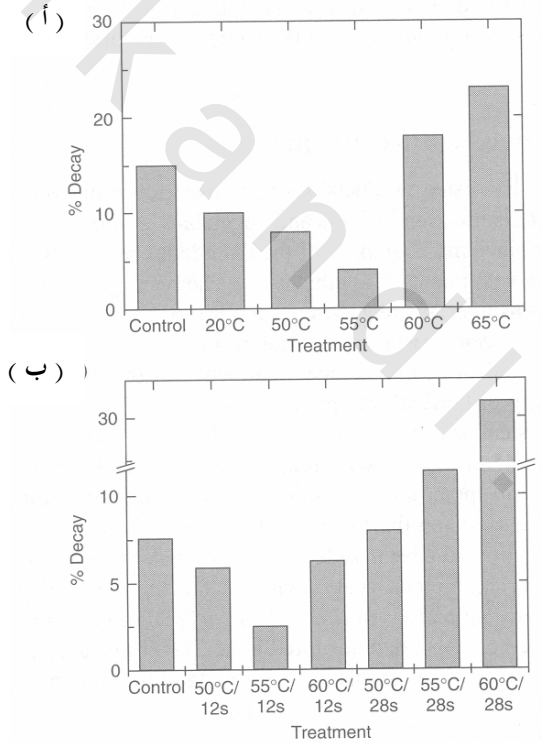
(أ)

(ب)

الشكل رقم (١٢,١١) (أ). عنقود عنب صنف الأليدو(Aledo) مغمور لمدة ٥ ثوانٍ في ماء مقطر ثنائي التقطير بعد ١٠ أيام من التخزين على درجة حرارة الغرفة. (ب) عنقود عنب من صنف الأليدو(Aledo) مغمور لمدة ٥ ثوانٍ في ١٠ x١,٦$^{-٤}$ مولر (M) ريسفيراترول ومخزن تحت نفس الظروف. حالتهما الصحية المختلفة واضحة.

نسبة التعفن ليست هي القياس الوحيد الذي يجب إعطاؤه اعتباراً عند تقييم فعالية معاملة الشطف بالماء الساخن والفرش لوقت قصير لمحصول معين؛ وقد درست

قياسات أخرى مثل قياسات جودة الفواكه (الصلابة واللون والإشراق (اللمعان) والجوامد الذائبة الكلية والحموضة المعايرة (titrable acid) والإتلاف الحراري، ... الخ) والتنفس (إنتاج ثاني أُكسيد الكربون) وابتعاث الإثايلين وتأثير معاملة الفواكه بعد تلقيحها (inoculation) بالأمراض الأكثر شيوعاً وهكذا. في الوقت الحالي استخدمت التقنية في الفلفل[١٧٧] والبطيخ melons[١٨٦] والمانجو[١٨٧] وثمرة الليشي litchis[١٧٨] والقريب فروت المنمى/المنتج عضوياً (organically grown grape fruit)[١٨٣] والتفاح[١٨٥].



الشكل رقم (١٢,١٢) (أ) تأثير معاملات الشطف بالماء الساخن والفرش لمدة قصيرة(HWRB) على درجات حرارة مختلفة على حوادث تعفن ثمار تفاح القولدن دليشص، الذهبي اللذيذ، بعد ٤ شهور من التخزين على ١ ْم، ولـ١٠ أيام على ٢٠ ْم (مأخوذ من Fallik et al.,[185]). (ب) تأثير معاملة الشطف بالماء الساخن والفرش بمختلف درجات الحرارة والوقت على حدوث التعفن في الفلفل الحلو، بعد ١٤ يوماً من التخزين على ٧ ْم و٣ أيام على ٢٠ ْم (مأخوذ من Fallik et al.,[177]).

(١٢,٩) النباتات المحوَّرة وراثياً المقاومة للأمراض
Disease-Resistant Transgenic Plants

تتمثل مزيد من المعالجة لخفض فواقد ما بعد الحصاد على المستوى العالمي (global post-harvest losses) التي تسببها الممرضات، في إدخال الجينات المقاومة للأمراض في الزراعة. بالتحديد، الجينات النباتية المقاومة (plant resistant genes) (التي يرمز لها عادة –بالجينات–آر R-genes) هي التي استخدمت استخداماً مكثفاً لتطوير النباتات المحورة وراثياً المقاومة للأمراض.[١٨٩] ومنذ إثبات مقاومة الأمراض المحفزة للنباتات المحورة وراثياً في بدايات التسعينيات (early, 1990s)، أجريت كثيرٌ من الدراسات في تصنيع مئات الجينات–آر (الجينات النباتية المقاومة) بهدف إيجاد الظروف المثلى للمقاومة التي أحدثتها الجينات–آر (R-gene) بواسطة التحوير الهندسي الوراثي (genetic engineering)،[١٣١- ١٣٨، ١٩٠، ١٩١] وأنه خارج نطاق هذا الفصل التعامل مع أو مخاطبة المعالجة الجينية (الوراثية) أو معاجة تطور النباتات المحورة جينياً (وراثياً) (genetically modified plants) المحفزة المقاومة للتعفن (القراء المهتمون يمكنهم الرجوع إلى الاستعراضات في هذا الموضوع).[١٩٢- ١٩٤] ومع ذلك، لا بأس من تعليقات قليلة والتي بالضرورة ترتبط بإنتاج النباتات المحورة وراثياً التي قد تساعد في تطوير طرق فيزيائية، خاصة طرق الكشف المعتمدة على الليزر، وبالتالي قد تساهم في البروتوكولات الجديدة لتحسين مقاومة المحاصيل بعد الحصاد.

مثال جيد لهذه الإستراتيجية نجده في تطور النباتات المحورة وراثياً والتي غيرت خواص الابتعاث المتطايرة(volatile emission). وفي اتجاه خط البحوث هذا، طورت مجموعة الكوهليمير (kuhlemeier group) في بيرن (Berne) نباتات طماطم محورة وراثياً والتي أظهرت إنتاجاً محسناً للمركب الطيار؛ الاسيتالديهايد. أشار التحليل المقارن لمثل هذا الابتعاث الطيار من الطماطم المحورة وراثياً ومصابة بالعدوى، والطماطم البرية (wild tomatoes)، والتي أجريت بطريقة المطيافية الضوئية السمعية الليزرية(LPAS)، وبجلاء فإن ابتعاث الأسيتالديهايد في الثمرة المحورة وراثياً أخذ وقتاً أقل مقارنة

بالابتعاث من الطماطم البرية. يمكن فهم هذا الانخفاض في الوقت، باعتبار إمكانية أن الثمار المحورة وراثياً تستخدم هذا المكون فوراً وبدرجة أكبر وبكفاءة أكثر بعمليات أخرى أثناء التفاعل مع المرض/ الممرض، وبمعنى آخر، تتحكم تفاعلات أخرى في آليات الدفاع ضد الممرضات. ولذلك، فهذا بيان جيد للتفاعل(interplay) بين المعالجات الجينية والفيزيائية المساهمة في التحديد الواضح للأسيتالديهايد كمضاد حيوي واعد لتحسين المقاومة النباتية للإمراضية/المرض(pathogenesis).

(١٢,١٠) الاستنتاجات والاتجاهات المستقبلية
Conclusions and Future Trends

إن هدف هذا الفصل هو إعطاء فكرة عامة للمفاهيم الحالية لآليات الدفاع الموجودة في النباتات واستخدام هذه المعرفة لتحسين المقاومة الطبيعية في الفواكه. تعتمد دراسة آليات الدفاع النباتية على مدخلين، معالجتين مؤسستين جيداً ومتداخلتين: المعالجة الفيزيوكيميائية [الكلاسيكية (التقليدية (classical)) والجينية (الوراثية). بدأ القرن العشرين باكتشاف أن النباتات قادرة على إنتاج مواد محددة مضادة للفطريات كاستجابة لهجوم الفطريات، وانتهى بتطور النباتات المحورة وراثياً المقاومة للأمراض. وقد أجريت أعداد كبيرة من الأبحاث حول طبيعة تفاعلات العائل–المضيف، وتحديد/معرفة نواتج أيض النبات الثانوية وخواصها المحددة فيما يتعلق ويتربط بصحة النبات، وفي تطور النباتات المحورة وراثياً المقاومة للمرض كما جاء في المراجعة والاستعراض هنا.

وعلى أي حال، في وقت كتابة هذا الكتاب، ما زالت فواقد المحاصيل مستمرة في تسبيب انخفاض في المحاصيل الأساسية على نطاق العالم، بنسبة ٢٠٪. إن متطلبات الزراعة الحديثة أكثر تقييداً (more restrictive) مما كانت عليه في الماضي، بالتحديد، الضغوط الديموغرافية التي لا تلين(inexorable demographic pressure) والحاجة لمبيدات آفات أكثر مأمونية بيئياً ومن ناحية السمية (environmentally and toxicologically safe pesticides). وبالرغم من أن التقنية الزراعية (agrotechnology) الجديدة المعتمدة على

الهندسة الوراثية (genetic engineering) واحدة من أكثر الفروع ديناميكية للتكنولوجيا الحيوية(biotechnology) الحديثة، إلا أن التداخلات والتفاعلات بين النباتات والممرضات معقدة جداً، وفي كثير من الأحيان، محددة أو تخص جمعاً معين بين النبات- الممرض. عليه، فإن التحليل الجيني (الوراثي) الشامل لتداخلات العائل- الممرض يكون في كثير من الحالات غير عملي، بحيث سيستمر استخدام معالجة نباتية مرضية(phytopathologic) تقليدية بدرجة أكبر، من أجل تنشيط استجابات النبات الدفاعية.

كان لتطور التقنيات الجديدة المعتمدة على الليزر آثار بالغة وكبيرة على علوم الدفاع النباتي(plant defense science) وبالتالي على تحسين المقاومة الطبيعية في الفواكه. وحقاً، إن الحلول الكبيرة لهذه التقنيات مع قدرتها على العمل على خط الإنتاج، قد مكنت من دراسة النباتات لمعرفة نواتج الأيض الثانوية، بحساسية غير مسبوقة. وهذا، بدوره، قد مكَّن ليس فقط من تصنيف أو تمييز النباتات المحورة وراثياً ذات المقاومة المحسنة للتعفن، ولكن أيضاً، مكَّن من الدراسة وفي الوقت الحقيقي للفسيولوجياً والديناميكيات وراء تفاعلات النبات- الممرض. لقد عرضت أمثلة جيدة لنوعي الاستخدام هنا، وبالتحديد الطماطم المحورة وراثياً التي تظهر ابتعاثات مضادة حيوية للأسيتالديهايد، وفي المقابل، مراقبة الريسيفراترول في العنب المصاب بعدوى *البوتريباتيس* (*Botrytis*).

ومن الواضح، أن مثل هذا الحجم من المعرفة قد تطور طبيعياً إلى معالجات وبروتوكولات جديدة والتي قد تستخدم تجارياً حتى، ذلك من أجل تحسين الحالة الصحية للفواكه بعد الحصاد. الاستخدام الخارجي *للترانس*- ريسيفراترول في العنب والشطف بالماء الساخن والفرش لمدة قصيرة(HWRB) لمختلف المحاصيل أمثلة ممتازة لهذه المعرفة(know- how) في المعالجة ما بعد الحصاد.

وبوضـــوح ، فــإن التفاعــل بــين مــا يعــرف بالمعالجــة الوراثيــة والمعالجــات الفيزيوكيميائية سيقود إلى تطورات نشطة قوية في البيولوجيا (الحيويـة) الحديثة ، وأكثر تحديداً في علوم ما بعد الحصاد(post-harvest science) في المستقبل القريب.

المراجـــــع (١٢,١١)

References

(1) ABELES F B, MORGAN P W and SALTVEIT JR M E, *Ethylene in Plant Biology,* London, Academic Press, 1992.

(2) YANG S F and HOFFMAN N E, 'Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants', *Annu Rev Plant Physiol,* 198435 155-89.

(3) DE VRIES H S M, WASONO M A J, HARREN F J M, WOLTERING E J, VAN DER VALK H C P M and REUSS J, 'Ethylene and CO2 emission rates and pathways in harvested fruits investigated, in situ, by laser photothermal deflection and photoacoustic techniques', *Postharvest Bioi Technol,* 1996 8 1-10.

(4) LUND S T, STALL R E and KLEE H J, 'Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato', *Plant Cell,* 1998 10371-82.

(5) GRICHKO V P and GLICK B P, 'Ethylene and flooding stress in plants', *Plant Physiol Biochem,* 200 1 39 1-9.

(6) DEIKMAN J, 'Molecular mechanisms of ethylene regulation of gene transcription', *Physiol Plant,* 1997 100 561-6.

(7) O'DONELL P J, CALVERT C, ATZORN R, WASTERNACK C, LEYSER HMO and BOWLES D J, 'Ethylene as a signal mediating the wound response in tomato plants' , *Science,* 1996274 1914-17.

(8) MORGAN P W and DREW M C, 'Ethylene and plant responses to stress', *Physiol Plant,* 1997 100 620--30.

(9) PAXTON J D, 'Phytoalexines - a working redefinition', *Phytopathology,* 1981 101 106-209.

(10) GRAYER R J and KOKUBUN T, 'Plant fungal interaction: the search for phytoalexxins and other antifungal compounds from higher plants', *Phytochemistry,* 2001 56 253-63.

(11) HAMMERSCHMIDT R, 'Phytoalexins: what have we learned after 69 years?', *Annu Rev Phytopathol,* 1999 37 285-306.

(12) KUK J, 'Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants', *Annu Rev Phytopathol,* 199533275-97.

(13) PURKAYASTHA R P, 'Progress in phytoalexin research during the past 50 years', in *Handbook of Phytoalexin Metabolism and Action,* eds Daniel M and Purkayastha R P, New York, Dekker, 1995 1-39.

(14) HEEN N T, 'Evaluation of the role of phytoalexins', in *Plant Disease Control,* eds Staples R C and Toenniessen G H, New York, Wiley, 1981, 155-77.

(15) HAHN M G, 'Elicitors and their receptors in plants', *Annu Rev Phytopathol,* 199634 387-412.

(16) EBEL J and COSIO E G, 'Elicitors of plant defence molecules', *Int Rev Citol,* 1994148 1-36.

Obeikandi.com

(17) BENHAMOU N, 'Elicitor-induced plant defence pathways', *Trends Plant Sci*, 19962 233-40.
(18) SANDERMANN JR H, ERNST D, HELLER W and LANGEBARTELS C, 'Ozone: an abiotic elicitor of plant defence reactions', *Trends Plant Sci*, 1998347-50.
(19) ZUCKERMANN H, HARREN F J M, REUSS J and PARKER D H, 'Dynamics of acetaldehyde production during anoxia and post -anoxia in red bell peppers studied by photoacoustic techniques', *Plant Physiol*, 1997 113 925-32.
(20) PHAM-TUAM H, VERCAMMEN J, DEVOS C and SANDRA P, 'Automated capillary gas chromatographic system to monitor ethylene emitted from biological materials', *J Chromatogr A*, 2000868249-59.
(21) GASMI T, ZEAITER H, ROPERO G and GONZALEZ URENA A, 'Excess traffic effects on Madrid urban atmospheric pollution: featuring ozone dynamics by infrared DIAL technique in DOAS mode of operation', *J Optics A*, 2000 2 565-8.
(22) PLATT U, 'Modem methods of the measurement of atmospheric trace gases', *Phys Chern-Chern Phys*, 1999 1 5409-15.
(23) 23 MENARD T, NOMINE M, TATRY V and GODET Y, 'Technical evaluation of optical remote detection instruments: DOAS and LIDAR', *Analusis*, 199826 M55-M59.
(24) CEROVIC Z G, SAMSON G, MORALES F, TREMBLAY Nand MOYA I, 'Ultraviolet-induced fluorescence for plant monitoring: present state and prospects', *Agronomie*, 1999 19 543-78.
(25) SAITO Y, SAITO R, NOMURA E, KAWAHARA T D, NOMURA A, TAKARAGAKI S, IDA K and TAKEDA S, 'Performance check of vegetation fluorescence imaging lidar through in vivo and remote estimation of chlorophyll concentration inside plant leaves', *Optical Rev*, 19996 155-9.
(26) SNOOK R, 'Laser techniques for chemical analysis', *Chern Soc Rev*, 199726319-26.
(27) WORKMAN J J, 'Review of process and non-invasive near-infrared and infrared spectroscopy, 1993-1999', *App Spect Rev*, 199934 1-89.
(28) SASAKI T A and WILKINS C L, 'Gas chromatography with Fourier transform infrared and mass spectral detection', *J Chromatogr A*, 1999842341-9.
(29) GRONAUER A, DEPTA G, STEGBAUER B, NESER S, BECHER S C, STANZEL H and SCHON H, 'Emission rate analysis of agricultural sources with Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy', *Agrobiol Res*, 199851 13-25.
(30) CARDENAS L M, BRASSINGTON D J, ALLAN B J, COB H, ALICKE B, PLATT U, WILSON K M, PLANE J M C and PENKET S A, 'Intercomparison of formaldehyde measurements in clean and polluted atmospheres', *J Atm Chern*, 200037 53-80.
(31) ZAATAR Y, BECHARA J, KHOURY A, ZAOUK D and CHARLES J P, 'Diode laser sensor for process control. and environmental monitoring', *Appl Energy*, 2000 65 107-13.
(32) BELL A G, 'Upon the production of sound by radiant energy', *Phil Mag J Sci*, 1880 510-28.
(33) THONY A and SIGRIST M W, 'New developments in COz-Iaser photoacoustic monitoring of trace gases', *Infrared Phys Technol*, 1995 36585-615.
(34) HARREN F and REUSS J, 'Photoacoustic spectroscopy', in *Encyclopedia of Applied Physics*, ed Trigg G L, Weinheim VCH, 1997 volume 19,413-35.
(35) HEKKERT S T, STAAL M J, NABBEN R H M, ZUCKERMANN H, PERSIJN S, STAL L J, VOESENEK LAC J, HARREN F J M, REUSS J and PARKER D H, 'Laser photoacoustic trace gas detection, an extremely sensitive technique applied in biological research' , *Instrum Sci Technol*, 199826 157-75.

(36) NEBIKER P W and PLEISCH R E, 'Photoacoustic gas detection for fire warning', *Fire Safety J*, 2001 36 173-80.
(37) MCQUEEN D H, WILSON R and KINNUNEN A, 'Near and mid-infrared photoacoustic analysis of principal components of foodstuffs', *Trends Anal Chern*, 1995 14482-92.
(38) HARREN F J M and REUSS J, 'Applications in plant physiology, entomology and microbiology; gas exchange measurements based upon spectral selectivity', in *Progress in Photothermal and Photoacoustic Science and Technology*, eds Mandelis A and Hess P, volume 3 in the series 'Life and Earth Science', Bellingham, SPIE, 1997 83-127.
(39) SIGRIST M W, *Air Monitoring by Spectroscopic Techniques*, New York, John Wiley & Sons, 1994.
(40) SCHAFER S, MIKLOS A, PUSEL A and HESS P, 'Absolute measurement of gas concentrations and saturation behavior in pulsed photoacoustic', *Chern Phys Lett*, 1998285 235-9.
(41) WOLFF M and HARDE H, 'Photoacoustic spectrometer based on a DFB-diode laser', *Infrared Phys Technol*, 2000 41 283-6.
(42) ARNOTT W P, MOOSMULLER H, ROGERS C F, JIN T and BRUCH R, 'Photoacoustic spectrometer for measuring light absorption by aerosol: instrument description', *Atmos Environ*, 1999 33 2845-52.
(43) KUHNEMANN F, SCHNEIDER K, HECKER A, MARTIS A A E, URBAN W, SCHILLER S and MLYNEK J, 'Photoacoustic trace-gas detection using a cw single-frequency parametric oscillator', *Appl Phys B*, 199866741-5.
(44) KINARD W F, HUNTER D B and CLARK S B, 'Applications of laser photo acoustic spectroscopy using an optical parametric oscillator to the study of complexation equilibria in dilute aqueous solutions', *J Radioanalyt Nuclear Chern*, 1998 235 1116.
(45) BOHREN A and SIGRIST M W, 'Optical parametric oscillator based difference frequency laser source for photoacoustic trace gas spectroscopy in the 3/.Jm mid- IR range', *Infrared Phy Technol*, 1997 38423-35.
(46) http://www.sci.kun.nl/tracegasfac/
(47) SIGRIST M W, BOHREN A, VON-LERBER T, NAGEL M and ROMANN A, 'Environmental applications of laser based photoacoustic spectroscopy', *Anal Sci*, 2001 17 S511S514.
(48) ZELINGER Z, STRIZfK M, KUBAT P and CIVIS S, 'Quantitative analysis of trace mixtures of toluene and xylenes by CO2 laser photoacoustic spectrometry', *Ann Chim Acta*, 2000 422 179-85.
(49) CHOPPIN GR and WONG P J, 'The chemistry of actinide behavior in marine systems' , *Aquatic Geochem*, 1998477-101.
(50) AGEE V B G, KATAEV M YU and SAPOZHNIKOVA V A, 'Photoacoustic detection of xylenes', *Atmos Oceanic Optics*, 19969 (3) 195-8.
(51) GONDAL M A, 'Laser photoacoustic spectrometer for remote monitoring of atmospheric pollutants', *Appl Optics*, 1997203195-201.
(52) YAHYAOUI W, HARNOIS J and CARPENTIER R, 'Demonstration of thermal dissipation of absorbed quanta during energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence in photosynthetic membranes', *FEBS Lett*, 27 November 1998440 (1) 59-63(5).

(53) ACOSTA-AVALOS D, ALVARADO-GIL J J, VARGAS H, FRIAS-HERNANDEZ J, OLALDEPORTUGAL V and MIRANDA L C M, 'Photoacoustic monitoring of the influence of arbuscular mycorrhizal infection on the photosynthesis of com *(Zea mays* L)', *Plant Sci,* 1996 119 183-90.

(54) DA SILVA W J, PRIOLI L M, MAGALHAES A C N, PEREIRA A C, VARGAS H, MANSANARES A M, CELLA N, MIRANDA L C M and ALVARADO-GIL J, 'Photosynthetic O2 evolution in maize inbreds and their hybrids can be differentiated by open photoacoustic cell technique', *PlantSci,* 1995104177-81.

(55) NAGELE M and SIGRIST M W, 'Mobile laser spectrometer with novel resonant multipass photoacoustic cell for trace gas sensing', *Appl Phys B,* 200070895-901.

(56) MARTIS A A E, BUSCHER S, KUHNEMANN F and URBAN W, 'Simultaneous ethane and ethylene detection using a co-overtone laser photoacoustic spectrometer: a new tool for stress/damage studies in plant physiology' , *Instrum Sci Technol,* 1998 26 177-87.

(57) http://www.ucm.es/info/ffresca/index.html

(58) LEPRINCE O, HARREN F J M, BUITINK J, ALBERDA M and HOEKSTRA F A, 'Metabolic dysfunction and unabated respiration precede the loss of membrane integrity during dehydration of germinating radic1es', *Plant Physiol,* 2000 122597-608.

(59) AGEEV B G, PONOMAREV Y N and SAPOZHNIKOVA V A, 'Laser photoacoustic spectroscopy of biosystem gas exchange with the atmosphere', *Appl Phys B,* 1998 67 467-73.

(60) OOMENS J, ZUCKERMANN H, PERSIJN S, PARKER D H and HARREN F J M, 'CO-laserbased photoacoustic trace-gas detection: applications in post-harvest physiology', *Appl Phys B,* 199867459-66.

(61) VOESENEK LAC J, BANGA M, RIJNDERS J H G M, VISSER E J W, HARREN F J M, BRAILFORD R W, JACKSON M B and BLOM C WPM, 'Laser-driven photoacoustic spectroscopy: what we can do with it in flooding research', *Ann Bot,* 19977957-65.

(62) AGEEV B G, ASTAFUROVA T P, PONOMAREV Y N, SAPOZHNIKOVA V A, ZAITSEVA T A and ZOTIKOVA A P, 'Dark respiration under low pressure and increased ethylene', *J Plant Physiol,* 1996 148237-42.

(63) AGEEV B G, ASTAFUROVA T P and SAPOZHNIKOVA V A, 'The photoacoustic method in measuring CO2 evolution by leaves and needles of woody plants under hypobaria', *Atmos Oceanic Optics,* 1997 1022-4.

(64) HARREN F J M, REUSS J, WOLTERING E J and BICANIC D D, 'Photoacoustic measurements of agriculturally interesting gases and detection of ethylene below the ppb level' , *Appl Spectrosc,* 1990 44 1360-8.

(65) DA SILVA M G, LIMA J A P, STHEL M S, MARIN E, GATTS C E N, CARDOSO S L, CAMPOSTRINI E, PEREIRA M G, CAMPOS A C, MASSUNAGA M S O and VARGAS H, 'Ethylene and CO2 emission rates in tropical fruits investigated by infrared absorption techniques', *Anal Sci,* 2001 17 S534-S537.

(66) VOESENEK LAC J, HARREN F J M, DE VRIES H S M, SIKKENS C A, HEKKERT S T L and BLOM C WPM, 'Photoacoustic and photothermal detection of the plant hormone ethylene', *Plant Hormone Protocols,* 2000 141 67-91.

(67) LESHEM Y Y and PINCHASOV Y, 'Plants and the environment Non-invasive photoacoustic spectroscopic determination of relative endogenous nitric oxide and ethylene content stoichiometry during the ripening of strawberries *Fragaria anannasa* (Duch.) and avocados *Persea americana* (Mill.)', *J Exp Bot,* 200052 1471-3.

(68) DE VRIES H S M, HARREN F J M and REUSS J, 'In situ, real-time monitoring of wound-induced ethylene in cherry tomatoes by two infrared laser-drive systems', *Post-Harvest BioI Technol*, 1995 6 275-85.

(69) BESSLER B, SCHMITGEN S, KUHNEMANN F, GABLER R and URBAN W, 'Light-dependent production of ethylene in *Tillandsia usneoides* L.', *Planta*, 1998205 140-4.

(70) DE VRIES H S M, MARTIS A A E, REUSS J, PARKER D H, PETRUZZELLI L and HARREN F J M, 'Ethylene evolution of germinating peas exposed to ozone', *Progress in Natural Sci*, 19966 S550-S553.

(71) OOMENS J, PERSIJN S T, PARKER D H and HARREN F J M, 'The onset of fermentation: real time measurements and model calculation of ethanol and acetaldehyde emission', *Acta Horticulturae*, 2001 553505-6.

(72) TOMAS S A and HARREN F J M, 'Kinetics of ethanol and acetaldehyde production in fermenting wheat dough by laser-based trace gas detection', *Food Sci Technol Int*, 2001 7 307-16.

(73) BIJNEN F G C, ZUCKERMANN H, HARREN F J M and REUSS J, 'Multicomponent trace gas analysis by three photoacoustic cells intracavity in a CO-laser; observation of anaerobic and post-anaerobic emission of acetaldehyde and ethanol in cherry tomatoes', *Appl Optics*, 1998373345-53.

(74) http://www.sci.kun.nl/tracegasfac/fruithtm

(75) BOESL U, 'Laser mass spectrometry for environmental and industrial chemical trace analysis', *J Mass Spectrom*, 2000 35 289-304.

(76) ZIMMERMANN R, BOESL U, HEGERM H J, ROHWER E R, ORTNER E K, SCHLAG E W and KETTRUP A, 'Hyphenation of gas chromatography and resonance-enhanced laser mass spectrometry (REMPI-TOFMS): A multidimensional analytical technique', *J High Res Chromatogr*, 199720461-70.

(77) GOOIJER C and MANK A J G, 'Laser spectroscopy in analytical chemistry: light on the next millennium', *Anal Chim Acta*, 1999400281-95.

(78) LEDINGHAM K W D and SINGHAL R P, 'High intensity laser mass spectrometry - A review', *Int J Mass Spectrom Ion Proc*, 1997 163 149-68.

(79) MONTERO C, BESCOS B, OREA J M and GONZALEZ URENA A, 'Food chemical analysis by laser desorption and resonant ionization mass spectrometry', *Rev Anal Chern*, 2000 19 1-29.

(80) BARBER M, BORDOLL R S and SEDGWICK R D, 'Fast atom bombardment mass spectrometry', in *Soft Ionization Biological Mass Spectrometry*, ed Morris H R, Heyden Press, Philadelphia, FA, 1980.

(81) MA Y L, CUYCKENS F, VAN-DEN-HEUVEL H and CLAEYS M, 'Mass spectrometric methods for the characterisation and differentiation of isomeric O-diglycosyl flavonoids', *Phytochem Anal*, 2001 12 159-65.

(82) STOBIECKI M, 'Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides', *Phytochem*, 200054237-56.

(83) GROSS J H, VEKEY K and DALLOS A, 'Field desorption mass spectrometry of large multiply branched saturated hydrocarbons', *J Mass Spectr*, 2001 36 522-8.

(84) ALOMIRAH H F, ALLI I and KONISHI Y, 'Applications of mass spectrometry to food proteins and peptides', *J Chromatogr A*, 2000893 1-21.

(85) HARVEY D J, 'Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates', *Mass Speer Rev*, 1999 18349-450.

(86) PILIPENKO V V, SUKHODUB L F, AKSYONOV S A, KALINKEVICH A N and KINTIA P K, 'Plasma desorption mass spectrometric study of interactions of steroid glycosides with amino acids', *Rapid Comm Mass Spectr,* 2000 14 819-23.

(87) DA-CUNHA K D, PEREIRA JAM and LEITE C V B, 'FIXE and PDMS methods applied to aerosols analysis', *Aerosol Sci Technol,* 200032453-64.

(88) PLASMAN V, PLEHIERS M, BRAEKMAN J C, DALOZE D, DE-BISEAU J C and PASTEELS J M, 'Chemical defense in *Platyphora kollari* Baly and *Leptinotarsa behrensi* Harold (Coleoptera: Chrysomelidae). Hypotheses on the origin and evolution of leaf beetles toxins', *Chemoecology,* 2001 11 107-12.

(89) BUGAY D E, 'Characterization of the solid-state: spectroscopic techniques', *Adv Drug De/iv Rev,* 2001 48 43-65.

(90) MAO D M, HU X K, SHI Y J and LIPSON R H, 'Evidence of orbital mixing for KrXe and ArXe excited states in the vacuum ultraviolet', *Phys Chern-Chern Phys,* 2001 3 4258-61.

(91) ZHAO W, KIM C, WHITE J M and KIM S K, 'Photodissociation dynamics of tefl-butyl nitrite on Ag(111): Characterization of translationally and internally excited NO fragments', *J Phys Chern A,* 2001105 2234-9.

(92) BESCOS B, OREA J M, MONTERO C, GONZALEZ URENA A, WEICKHARDT C, BOELS U and SCHLAG E W, 'REMPI spectroscopy of carbendazim in UV region', *Chern Phys Lett,* 1998287371-8.

(93) PHILIS J G and KOSMIDIS C, '(3sf-n) REMPI of jet-cooled acetaldehyde using two laser beams', *J Mol Struct,* 2001 56399-103.

(94) BESCOS B, OREA J M and GONZALEZ URENA A, 'Laser desorption dynamics of carbendazim on a glass surface', *Laser Chern,* 2000 18219-37.

(95) HEGER H J, ZIMMERMANN R, DORFNER R, BECKMANN M, GRIEBEL H, KETTRUP A and BOESL U, 'On-line emission analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons down to pptv concentration levels in the flue gas of an incineration pilot plant with a mobile resonance-enhanced multiphoton ionization time-of-flight mass spectrometer', *Anal Chern,* 19997146-57.

(96) GARNICA R M, APPEL M F, EAGAN L, MCKEACHIE J R and BENTER T, 'AREMPI method for the ultrasensitive detection of NO and NO2 using atmospheric pressure laser ionization mass spectrometry', *Anal Chern,* 200072 5639-46.

(97) OSER H, COGGIOLA M J, FARIS G W, YOUNG S E, VOLQUARDSEN B and CROSLEY DR, 'Development of a jet-REMPI (resonantly enhanced multiphoton ionization) continuous monitor for environmental applications', *App Optics,* 2001 40 859-65.

(98) COLLUM B M, SHEALY S K and ANGEL S M, 'Fibre-optic resonance-enhanced multiphoton ionization probe for in situ detection of aromatic contamination', *Appl Spectrosc,* 199953 1646-50.

(99) BUCHELLI T D, HAEFLIGER 0 P, DIETIKER R and ZEN OBI R, 'Analysis of water contaminants and natural water samples using two-step laser mass spectrometry', *Anal Chern,* 200072 3671-7.

(100) BESCOS B, OREA J M, MONTERO C, URENA A, VALVERDE A and AGUILERA A, 'Study of agricultural samples by laser desorption coupled with resonance-enhanced multiphoton ionization and time-of-flight mass spectrometry: Application to carbendazim analysis in pepper', *Laser Chern,* 1998 1835-49.

(101) JEANDET P, BESSIS R, SBAGHI M and MEUNIER P, 'Production of the phytoalexin resveratrol by grapes as a response to *Botrytis* attack under natural conditions', *J Phytopathol,* 1995 143 135-9.

(102) LANGCAKE P and PRYCE R J, 'The production of resveratrol by *Vilis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury', *Physiol Plant Pathol*, 1976977-86.
(103) JEANDET P, BESSIS R, MAUME B F, MEUNIER P, PEYRON D and TROLLAR P, *J Agric Food Chern*, 1995 43 316-19.
(104) SOLEAS G J, DAM J, CAREY M and GOLDBERG D M, 'Toward the fingerprinting of wines: cultivar-related patterns of polyphenolic constituents in Ontario wines', *J Agric Food Chern*, 199745 3871-80.
(105) ADRIAN M, RAJAEI H, JEANDET P, VENEAU J, BESSIS R, 'Resveratrol oxidation in *Botrytis cinerea* Conidia', *Phytopathol*, 1998 88472-6.
(106) SOLEAS G J, DIAMANDIS E P and KARUMANCHIRI A, 'A multiresidue derivatization gas-chromatographic assay for fifteen phenolic constituents with mass selective detection', *Anal Chern*, 1997694405-9.
(107) JEANDET P, BESSIS R, MAUME B F, MEUNIER P, PEYRON D and TROLLAR P, 'Effect of enological practices on the resveratrol isomer content of wine', *J Agric Food Chern*, 1995 43 316-19.
(108) JUAN M E, LAMUELA-RAVENTOS R M, DE LA TORRE BORONAT M C and PLANAS J M, 'Determination of trans-resveratrol in plasma by HPLC', *Anal Chern*, 1999 71 747-50.
(109) SOBOLEV V S and COLE R J, 'trans-Resveratrol content in commercial peanuts and peanut products', *J Agric Food Chern*, 199947 1435-9.
(110) JEANDET P, BREUIL A C, ADRIAN M, WESTON L A, DEBORD S, MEUNIER P, MAUME G and BESSIS R, 'HPLC analysis of grapevine phytoalexins coupling photodiode-array detection and fluorimetry', *Anal Chern*, 1997 69 5172-7.
(111) BERZAS NEVADO J J, CONTENTO SALCEDO A M and CASTANEDA PENALVO G, 'Simultaneous determination of *cis*- and *trans-resveratrol* in wines by capillary zone electrophoresis', *Analyst*, 1999 12461-6.
(112) ARCE L, TENA M T, RIOS A and VALCARCEL M, 'Determination of trans-resveratrol and other polyphenols in wines by a continuous flow sample clean-up system followed by capillary electrophoresis separation', *Anal Chirn Acta*, 1998 359 27-38.
(113) PAZOUREK J, GONZALEZ G, REVILLA A L and HAVEL J, 'Separation of polyphenols in Canary Islands wine by capillary zone electrophoresis without preconcentration', *J Chrornatogr A*, 2000874 111-19.
(114) GODBERG D M, NG E, KARUMANCHIRI A, YAN J, DIAMANDIS E P and SOLEAS G J, 'Assay of resveratrol glucosides and isomers in wine by direct-injection high-performance liquid chromatography', *J Chrornatogr A*, 199570889-98.
(115) PEZET R, PONT V and CUENAT P, 'Method to determine resveratrol and pterostilbene in grape berries and wines using high-performance liquid chromatography and highly sensitive fluorimetric detection', *J Chrornatogr A*, 1994663 191-7.
(116) GOLDBERG D M, TSANG E, LEVESQUE M and SOLEAS G J, 'Method-dependent bias in the quantitation of *cis*- and trans-resveratrol glucosides by high-performance liquid chromatography', *J Liquid Chrornatogr Related Technol*, 199922 1843-55.
(117) SOLEAS G J, GOLDBERG D M, NG E, KARUMANCHIRI A, TSANG E and DIAMANDIS E P, 'Comparative evaluation of four methods for assay of *cis*- and *trans-resveratrol'* , *Arn J Enol Vitic*, 1997 48 169-76.

(118) ROGGERO J P, ARCHIER P and COEN S, in *Wine, Nutritional and Therapeutic Benefits*, ed Watkins T R, ACS Symposium Series, No. 661, American Chemical Society, Washington DC, 1997 6-11.

(119) MALOVANA S, GARCIA MONTELONGO F J, PEREZ J P and RODRIGUEZ DELGADO M A, 'Optimisation of sample preparation for the determination of trans-resveratrol and other polyphenolic compounds in wines by high-performance liquid chromatography', *Anal Chirn Acta*, 2001 428245-53.

(120) ROMERO PEREZ A I, IBERN-GOMEZ M, LAMUELA-RAVENTOS R M and DE LA TORREBORONAT M C, 'Piceid, the major resveratrol derivative in grape juices', *J Agric Food Chern*, 199947 1533-6.

(121) GOLDBERG D M, TSANG E, KARUMANCHIRI A, DIAMANDIS E P, SOLEAS G J and NG E, 'Method to assay the concentrations of phenolic constituents of biological interests in wine', *Anal Chern*, 199668 1688-94.

(122) MCMURTREY K D, MINN J, POBANZ K and SCHULTS T P, 'Analysis of wines for resveratrol using direct injection high-pressure liquid chromatography with electrochemical detection', *J Agric Food Chern*, 1994422077-80.

(123) CHU Q, O'DWYER M and ZEECE M G, 'Direct analysis of resveratrol in wine by micellar electrokinetic capillary electrophoresis', *J Agric Food Chern*, 1998 46 509-13.

(124) OREA ROCHA J M, BESCOS B, MONTERO C and GONZALEZ URENA A, 'Analysis of carbendazim in agricultural samples by laser desorption and REMPI-time of flight-mass spectrometry', *Anal Chern*, 199870491-7.

(125) MONTERO C, OREA J M, MUNOZ M S, LOBO R F and GONZALEZ URENA A, 'Non-volatile analysis in fruits by laser resonant ionization spectrometry: application to resveratrol in grapes', *App Phys B*, 200071601-5.

(126) OREA J M, MONTERO C, JIMENEZ J B and GONZALEZ URENA A, 'Analysis of transresveratrol by laser desorption coupled with resonant ionisation spectrometry. Application to trans-resveratro1 content in vine leaves and grape skin', *Anal Chern*, 2001 735921-9.

(127) STEIN U and BLAICH R, 'Investigations on the production of stilbenes and susceptibility to *Botrytis* of *Vitis* spp', *Vilis*, 1985 2475-87.

(128) JEANDET P, BESSIS R and GANTHERON B, 'The production of resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) by grape berries in different developmental stages', *Arn J Enol Vitic*, 1991 4241-6.

(129) KUTCHAN T M, 'Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism', *Plant Physiol*, 2001 125 58-60.

(130) KEEN N T, 'A century of plant pathology: A retrospective view on understanding host-parasite interactions', *Annu Rev Phytopathol*, 2000 38 31-48.

(131) BAKER B, ZAMBRYSKI P, STASKAWICZ B and DINESH-KUMAR S P, 'Signaling in plant-microbe interactions', *Science*, 1997 276 726-33.

(132) TADEGE M, BUCHER M, STAHLI W, SUTER M, DUPUIS I and KUHLEMEIER C, 'Activation of plant defense responses and sugar efflux by expression of pyruvate decarboxylase in potato leaves', *Plant J*, 1998 16661-71.

(133) MARTIN G B, BROMMONSCHENKEL S H, CHUNWONGSE J A, FRARY A, GANAL M W, SPIVEY R, TIYUN W, EARLE E D and TANKSLEY S D, 'Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato', *Science*, 1993 262 1432-6.

(134) BROGLIE K, CHET I, HOLLIDAY M, CRESSMAN R, BRIDDLE P, KNOWLTON S, MAUVAIS C J and BROGLIE R, 'Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani'*, *Science,* 1991 254 1194-7.
(135) HAIN R, BIESELER B, KINDL H, SCHRODER G and STOCKER R, 'Expresion of a stilbene synthase gene in *Nicotiana tabacurn* results in synthesis of the phytoalexin resveratrol', *Plant Mol BioI,* 1990 15 325-35.
(136) HAIN R, REIF H J, KRAUSE E, LANGE BARTELS R, KINDL H, VORNAM B, WIESE W, SCHMELZER E, SCHREIER P H, STOCKER R H and STENZEL K, 'Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant', *Nature,* 1993 361 153-6.
(137) STARK-LORENZEN P, NELKE B, HANSSLER G, MUHLBACH and THOMZIK J E, 'Transfer of a grapevine stilbene synthase gene to rice *(Oryzae sativa* L)', *Plant Cell Rep,* 1997 16668-73.
(138) THOMZIK J E, STENZEL K, STOCKER R, SCHREIER P H, HAIN R and STAHL D J, 'Synthesis of a grapevine phytoalexin in transgenic tomatoes *(Lycopersicon esculentum* Mill.) conditions resistance against *Phytophthora infestans', Physiol Molec Plant Pathol,* 1997 51 265-78.
(139) HUTCHESON S W, 'Current concepts of active defence in plants', *Annu Rev Phytopathol,* 1998 36 59-90.
(140) COOK R J, 'Advances in plant health management in the twentieth century', *Annu Rev Phytopathol,* 20003895-116.
(141) SALISBURY F B and ROSS C w, *Plant Physiology,* 4th edition, Wadsworth, Belmont, CA, 1992.
(142) TADEGE M, DUPUIS I and KUHKEMEIER C, 'Ethanolic fermentation: new functions for an old pathway', *Trends Plant Sci,* 19984320-5.
(143) PERATA P and ALPI A, 'Ethanol induced injuries to carrot cells', *Plant Physiol,* 1991 95 748-52.
(144) TADEGE M, BRANDLE R and KUHLEMEIER c, 'Aerobic fermentation during tobacco pollen development', *Plant Molec BioI,* 1997 35 343-54.
(145) KNEE M, 'Fruit metabolism and practical problems of fruit storage under hypoxia and anoxia', in *Plant Life under Oxygen Depravation; Ecology, Physiology and Biochemistry,* eds Jackson M B, Davis D D and Lambers H, The Hague, SPB Academic, 1990229-43.
(146) BEAULIEU J C, PEISER G and SALTVEIT M E, 'Acetaldehyde is a causal agent responsible for ethanol-induced ripening inhibition in tomato fruit', *plant Physiol,* 1997 113 431-9.
(147) CRAWFORD R M N, 'Oxygen availability as an ecological limit to plant distribution',
(148) *Adv Ecol Res,* 19922393-185. 148 BARTOSZ G, 'Oxidative stress in plants', *Acta Physiol Plant,* 1997 1947-64.
(149) BIEMELT S, KEETMAN U and ALBRECHT G, 'Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings', *Plant Physiol,* 1998 116651-8.
(150) PERSIJN S T, PARKER D H, HARREN F J M and VELTMAN R H, 'On-line laser-based detection of trace gas emission by avocado under changing atmospheric conditions' , *Acta Horticulturae,* 2001 553505-6.
(151) ADRIAN M, JEANDET P, DOUlLLET-BREUlL A C, TESS ON L and BESSIS R, 'Stilbene content of mature *Vilis vinifera* berries in response to UV-C elicitation', *J Agric Food Chern,* 2000486103-5.

(152) CANTOS E, GARCIA-VIGUERA C, DE-PASCUAL-TERESA S and TOMAS-BERBERAN F A, 'Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of cv. Napoleon table grapes', *J Agric Food Chern,* 2000484606-12.

(153) BAIS A J, MURPHY P J and DRY I B, 'The molecular regulation of stilbene phytoalexin biosynthesis in *Vitis vinifera* during grape berry development', *Aust J Plant Physiol,* 2000 27 425-33.

(154) DOUlLLET-BREUlL A C, JEANDET P, ADRIAN M and BESS IS N, 'Changes in the phyto alexin content of various *Vilis* spp. in response to ultraviolet C elicitation', *J Agric Food Chern,* 1999474456-61.

(155) SARIG P, ZUTKHI Y, MONJAUZE A, LISKER N and BENARIE R, 'Phytoalexin elicitation in grape berries and their susceptibility to *Rhizopus stolonifer', Physiol Mol Plant Pathol,* 1997 50337-47.

(156) CANTOS E, ESPIN J C and TOMAS-BARBERAN F A, 'Postharvest induction modeling method using UV irradiation pulses for obtaining resveratrol-enriched table grapes: A new "functional" fruit?', *J Agric Food Chern,* 2001 49 5052-8.

(157) NIGRO F, IPPOLITO A and LIMA G, 'Use of UV-C light to reduce *Botrytis* storage rot of table grapes', *Postharvest BioI Technol,* 1998 13 171-81.

(158) D'HALLEWIN G, SCHIRRA M, PALA M and BEN-YEHOSHUA S, 'Ultraviolet C irradiation at 0.5 kJ.m2 reduces decay without causing damage or affecting post-harvest quality of star ruby grapefruit', *J Agric Food Chern,* 2000484571-5.

(159) 159 DUKE S 0, 'Natural pesticides from plants', in *Advances in New Crops,* eds Janick J and Simon J E, Timber Press, Portland, 1990 511-17.

(160) SOLEAS G J, DlAMANDlS E P and GOLDBERG D M, 'Resveratrol: a molecule whose time has come? and gone?', *Clin Biochem,* 1997 30 91-113.

(161) ADRIAN M, JEANDET P, VENEAU J, WESTON L A and BESSIS R, 'Biological activity of resveratrol, a stilbenic compound from grapevines, against *Botrytis cinerea,* the causal agent for gray mold', *J Chern Ecol,* 1997 23 1689-702.

(162) LANGCAKE P, 'Disease resistance of *Vitis* spp. and the production of the stress metabolites resveratrol, epsilon-viniferin, alpha-viniferin and pterostilbene', *Physiol Plant Pathol,* 1981 18213-26.

(163) DAI G H, ANDARY C, MONDOLOT-COSSON L and BOUBALS D, 'Histochemical studies on the interaction between three species of grapevine, *Vitis vinifera, V. rupestris* and *V. rotundifolia* and the downy mildew fungus, *Plasmopara viticola', Phys Mol Plant Pathol,* 1995 46 177-88.

(164) HOOS G and BLAICH R J, 'Influence of resveratrol on germination of conidia and mycelial growth of *Botrytis cinerea* and *Phomopsis viticola', J Phytopathol,* 1990 129 102-110.

(165) 165 GONZALEZ URENA A, OREA J M, MONTERO C and JIMENEZ J B, 'Improving post harvest resistance in fruits: application to grapes', Submitted for publication.

(166) MONTERO c, *Desarrollo de Tecnicas de espectroscopia Laser y su Aplicaci6n al Analisis Quimico de Alimentos,* Doctoral Thesis, Universidad Complutense de Madrid, 2002.

(167) ALEU J and GONZALEZ COLLADO I, 'Biotransformation by *Botrytis* species', *J Mol Cat B,* 2001 13 77-93.

(168) PIMENTEL D, CULLINEY T W and BASHORE T, 'Public health risks associated with pesticides and natural toxins in foods', in *The Radcliffes's IPM World Textbook*, eds Radcliffe E B and Hutchison W D, University of Minnesota, St. Paul, MN 1996.

(169) SWIRSKY GOLD L, SLONE T H and AMES B N, 'Prioritization of possible carcinogenic hazards in food', in *Food Chemical Risk Analysis*, ed Tennant D R, New York, Chapman and Hall, 1997 267-95.

(170) CASSIDY A, HANLEY B and LAMUELA-RAVENTOS R M, 'Isoflavones, lignans and stibene - origins, metabolism and potential importance to human health', *J Sci Food Agric*, 2000 80 1044-62.

(171) GERMAN J B and WALZEM R L, 'The health benefits of wine', *Annu Rev Nutr*, 2000 20561-93.

(172) PARR A J and BOLWELL G P, 'Phenols in the plant and in the man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile', *J Sci Food Agric*, 200080985-1012.

(173) SOLEAS G J, DlAMANDlS E P and GOLDBERG D M, 'Resveratrol: A molecule whose time has come? and gone?', *Clin Biochem*, 1997 30 91-113.

(174) SCHIRRA M, D'HALLEWIN G, BEN-YEHOSHUA S and FALLIK E, 'Host-pathogen interactions modulated by heat treatment', *Postharvest BioI Technol*, 2000 21 71-85.

(175) LURIE S, 'Post-harvest heat treatments of horticultural crops', *Hortic Rev*, 1998 22 91-121.

(176) FALLIK E, GRINGBERG S, ALKALAI S and LURIE S, 'The effectiveness of post-harvest hot water dips on the control of gray and black moulds in sweet red pepper *(Capsicum annuum)', Plant Pathol*, 199945644-9.

(177) FALLIK E, GRINGBERG S, ALKALAI S, YEKUTIELI 0, WISEBLUM A, REGEV R, BERES H and BAR-LEV E, 'A unique rapid hot water treatment to improve storage quality of sweet pepper', *Postharvest BioI Technol*, 1999 1525-32.

(178) SMILANICK J L, MARGO SAN D A and JENSON D J, 'Evaluation of heated solutions of sulfur dioxide, ethanol and hydrogen peroxide to control postharvest green mold of lemons', *Plant Disease*, 199579742-7.

(179) CABRAS P, SCHIRRA M, PIRISI F M, GARAU V L and ANGIONI A, 'Factors affecting imazail and thiabendazole uptake and persistence in citrus fruits following dip treatments', *J Agric Food Chern*, 1999473352-4.

(180) 180 PORAT R, PAVONCELLO D, PERETZ J, WEISS B, DAUS A, COHEN L, BEN-YEHOSHUA S, FALLIK E, DROBY S and LURIE S, 'Induction of resistance to *Penicillium digitatum* and chilling injury in 'star ruby' grapefruit by a short hot water rinse and brushing treatment' , *J Hortic Sci Biotechnol*, 2000 75 428-32.

(181) LURIE S, FALLIK E, HANDROS A and SAPHIRA R, 'The involvement of peroxidase in resistence to *Botrytis cinerea* in heat treated fruit', *Physiol Mol Plant Pathol*, 1997 50 141-9.

(182) BEN-YEHOSHUA S, RODOV V, FANG D Q and KIM J J, 'Preformed antifungal compounds of citrus fruit: Effects of postharvest treatments with heat and grown regulators', *J Agric Food Chern*, 199543 1062-6.

(183) PORAT R, DAUS A, WEISS B, COHEN L, FALLIK E and DROBY S, 'Reduction of postharvest decay in organic citrus fruit by a short hot water brushing treatment' , *Postharvest BioI Technol*, 2000 18 151-7.

(184) BEN-YEHOSHUA S, PERETZ J, RODOV V, NAFUSSI B, YEKUTIELI 0, WISEBLUM A and REGEV R, 'Postharvest application of hot water treatment in citrus fruits: the road from the laboratory to the packing-house', *Acta Horticulturae*, 2000518 19-28.

(185) FALLIK E, TUVIA-ALKALAI S, FENG X and LURIE S, 'Ripening characterization and decay development of stored apples after a short pre-storage hot water rinsing and brushing', *Innov Food Sci Emerging Technol*, 2001 2 127-32.

(186) WISEBLUM A, REGEV R, FALLIK E, AHARONI Y, CaPEL A, RODOV V, TUVIA-ALKALAI S, HOREV B and YEKUTIELI 0, 'Reduction of postharvest losses of Galia melon by a short hot-water rinse', *Plant Pathol*, 2000 49 333-8.

(187) PRUSKY D, FUCHS Y, KOBILER I, ROTH I, WEKSLER A, SHALOM Y, FALLIK E, ZAUBERMAN G, PESIS E, AKERMAN M, YKUTIELY 0, WEISBLUM A, REGEV R and ARTES L, 'Effect of hot water brushing, prochloraz treatment and waxing on the incidence of black spot decay caused by *Alternaria alternata* in mango fruits', *Postharvest BioI Technol*, 1999 15 165-74.

(188) LICHTER A, DVIR 0, ROT I, AKERMAN M, REGEV R, WIESBLUM A, FALLIK E, ZAUBERMAN G and FUCHS Y, 'Hot water brushing: an alternative method to SOl fumigation for color retention of litchi fruits', *Postharvest BioI Technol*, 2000 18 235-44.

(189) ROMMENS C M and KISHORE G M, 'Exploiting the full potential of disease-resistance genes for agricultural use', *Curr Opinion Plant BioI*, 2000 11 120-5.

(190) FEYS B J and PARKER J E, 'Interplay of signaling pathways in plant disease resistance', *TIG*, 2000 16 449-55.

(191) HAMMOND-KOSACK K E and JONES J D G, 'Plant disease resistance genes', *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol BioI*, 199748575-7.

(192) UZOGARA S G, 'The impact of genetic modification of human foods in the 21st century: a review', *Biotech Adv*, 2000 18 179-206.

(193) MARTIN G B, 'Functional analysis of plant disease resistance genes and their downstream effectors', *Curr Opinion Plant Biol*, 19992273-9.

(194) TENGERDY R P and SZAKACS G, 'Perspectives in agrobiotechnology', *J Biotechnol*, 1998 6691-9.