



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PALERMO

Dottorato in Agro-Ecosistemi Mediterranei

XXIII ciclo (2009-2012)

S.S.D. – AGR02

Dipartimento dei Sistemi Agro-Ambientali

(SAGIA)

**STUDI FITOCHEMICI E AGRONOMICI SU
ARTEMISIA ARBORESCENS L. (ASTERACEAE)
DELLA FLORA SPONTANEA SICILIANA
E ATTIVITÀ BIOCIDIA DEGLI OLI ESSENZIALI**

PhD student

Dott. MARCELLO MILITELLO

Tutor

Prof.ssa ALESSANDRA CARRUBBA

Coordinatore del dottorato

Prof.ssa ADRIANA BONANNO



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PALERMO

Dottorato in Agro-Ecosistemi Mediterranei

XXIII ciclo (2009-2012)

S.S.D. – AGR02

Dipartimento dei Sistemi Agro-Ambientali (SAGA)

STUDI FITOCHIMICI E AGRONOMICI SU
ARTEMISIA ARBORESCENS L. (ASTERACEAE)
DELLA FLORA SPONTANEA SICILIANA
E ATTIVITÀ BIOCIDA DEGLI OLI ESSENZIALI

PhD student:

DOTT.MARCELLO MILITELLO

TUTOR

PROF.SSA ALESSANDRA CARRUBBA

Coordinatore del dottorato

PROF.SSA ADRIANA BONANNO

INDICE

ABSTRACT	I-IV
RESUMEN	V-VIII
SINTESI	IX-XIII
INTRODUZIONE	
1. GLI OLI ESSENZIALI	PG. 1
1.1. MODALITA' D'ESTRAZIONE	
1.2. ANALISI CHIMICA	
1.3. FATTORI DI VARIAZIONE DELLA COMPOSIZIONE CHIMICA	
2. ATTIVITÀ BIOCIDA DELLE PIANTE	PG. 7
3. LA FLORA SPONTANEA SICILIANA D'INTERESSE BIOCIDA (<i>COMPOSITAE</i>)	PG. 7
4. IL GENERE <i>ARTEMISIA</i>	PG. 8
4.1. BOTANICA, MORFOLOGIA E DISTRIBUZIONE	
4.2. IL GENERE <i>ARTEMISIA</i> TRA MITO E FOLKLORE	
4.3. USI FARMACOLOGICI E INDUSTRIALI	
5. <i>ARTEMISIA ARBORESCENS</i> L.	PG. 11
5.1. BOTANICA, MORFOLOGIA E DISTRIBUZIONE	
6. SCOPO DELLA RICERCA E ARTICOLAZIONE DEL LAVORO	PG. 12
FITOCHEMICA	
7. COMPOSIZIONE CHIMICA DELL' OLIO ESSENZIALE	PG. 13
7.1 INTRODUZIONE	
7.2 MATERIALI E METODI	
7.3 RISULTATI E DISCUSSIONE	
ASPETTI AGRONOMICI	
8. PROPAGAZIONE GAMICA – GERMINABILITÀ DEL SEME	PG. 23
8.1. INTRODUZIONE	
8.2. MATERIALI E METODI	
8.3. RISULTATI E DISCUSSIONE	
9. PROPAGAZIONE VEGETATIVA – RADICAZIONE TALEE	PG. 29
9.1. INTRODUZIONE	
9.2. MATERIALI E METODI	
9.3. RISULTATI E DISCUSSIONE	
10. PROVA DI COLTIVAZIONE	PG. 35
10.1. INTRODUZIONE	
10.2. MATERIALI E METODI	
10.3. RISULTATI E DISCUSSIONE	

ATTIVITA' BIOCIDA

11. ATTIVITA' ANTIMICROBICA		
11.1. INTRODUZIONE	PG.	41
11.2. MATERIALI E METODI	.	
11.3. RISULTATI E DISCUSSIONE		
12. ATTIVITA' FUNGICIDA		
12.1. INTRODUZIONE	PG.	46
12.2. MATERIALI E METODI		
12.3. RISULTATI E DISCUSSIONE		
13. ATTIVITA' ERBICIDA		
13.1. INTRODUZIONE	PG.	50
13.2. MATERIALI E METODI		
13.3. RISULTATI E DISCUSSIONE		
14. ATTIVITA' INSETTICIDA		
14.1. INTRODUZIONE	PG.	54
14.2. MATERIALI E METODI		
14.3. RISULTATI E DISCUSSIONE		
CONCLUSIONI E PROSPETTIVE DI RICERCA	PG.	63
BIBLIOGRAFIA	PG.	71
ALLEGATI	PG.	85

ABSTRACT

PHYTOCHEMICAL AND AGRONOMIC STUDIES ON ARTEMISIA ARBORESCENS L. (ASTERACEAE) BY WILD FLORA OF SICILY AND BIOCIDAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS.

- **RESEARCH OBJECTIVES**

Aim of this work was to gain a deeper knowledge about the bio-agronomic behavior of *A. arborescens* as concerns its propagation and cropping techniques, chemical composition of the essential oil and potential industrial applications as a raw material with a biocidal activity.

- **MATERIALS AND METHODS**

Propagation technique.

The trial, carried out throughout October and November 2009 in the laboratories of Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura (C.R.A.), section of Bagheria (PA, Italy), was preliminarily conducted in order to identify the more suitable environmental conditions for seed germination of *Artemisia arborescens*. The germination temperatures ranging from 5 to 30° C (with intervals of 5 ° C) were compared. The effect of light on the germination process was also studied, testing the photoperiodic conditions of 18 / 6 hours (light /dark), and total darkness.

Concerning the propagation by cuttings, different harvest times, different rooting substrates (2:1, 1:1, 1:2 v/v of acid peat and perlite) and finally the addition of NAA rooting hormone, in doses of 4000 ppm, were compared, evaluating the effect of each treatment on the percentage of engraftment.

Phytochemical analysis

The area that was interested by sampling, about 100 km² wide, lies within the province of Palermo and is limited in the North by Tyrrhenian Sea and on the other three sides by mountains with variable altitudes from 600 to 1250 m asl. For the sampling of natural populations of *A.arborescens* different sites were selected. Between September 2009 and September 2010, when the plants were experiencing the phase of vegetative stasis and then in full blooming stage, plant samples were collected to start the process of steam distillation. The chemical analysis of compounds was carried out in the laboratories of Pharmaceutical Chemistry at the University of Valencia, using a gas chromatograph and a mass spectrograph.

Antimicrobial activity

The essential oil of *A. arborescens* was tested for its antibiotic activity against some bacterial strains available in the laboratories of the Department “Scienze per la Promozione della Salute” (Università degli Studi di Palermo). The selected species (*Listeria monocytogenes*, *Enterobacter* spp. and *Salmonella enterica*) are generally associated with food alterations generally associated with an improper storage.

The bacterial strains were inoculated in the growing medium and poured into Petri plates, which included discs of paper tinted with the solution of *A. arborescens* essential oil in acetone, at planned doses. The plates were stored at 37 ° C for 24 h and the inhibitory activity was termed positive when around the disk of paper an evident zone of inhibition was found.

Fungicidal activity

The capacity of the essential oil of *A. arborescens* to inhibit the growth of fungal mycelium, was evaluated in the laboratories of the CRA- C.R.A.-S.F.M. (Unità di Ricerca per il Recupero e la Valorizzazione delle Specie Floricole Mediterranee, Bagheria, PA, Italy), carrying out trials on *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthii*; *Verticillium dahliae*, *Phytophthora citrophthora* and *Botrytis cinerea*, that are fungal pathogens largely widespread in many ornamental and horticultural crops grown in greenhouses. The used growth medium consisted in a mixture of Potato broth, Agar and Dextrose (PDAs). The test was carried out in Petri plates where 20 ml of substrate were poured, and then the essential oil was put at the planned experimental doses. After the inoculation of fungal mycelium, the plates were incubated at 25 °C, with the exception of *B. cinerea*, characterized by lower thermal requirements, which was stored at 20 °C for 10 days. The radial growth of mycelium was measured after 3, 6 and 10 days after the starting of the trial. The experiment was conducted in double and the inhibitory activity was calculated as a percentage of growth compared to the growth of the untreated control. The tested oils were characterized by three different types of chemical composition; chamazulene-type, when chamazulene was found as the majority compound, β thujone-type when β -thujone was the main compound, and chamazulene / β thujone-type when the two compounds were found at the same percentage.

Herbicide activity

The experiment was conducted in the laboratories of Botany of the Instituto Agroforestal Mediterraneo at the Polytechnic University of Valencia, between March and September 2010. The target weed species were selected from a list reporting the most relevant weeds that were common to the Spanish (Valencia) and Italian (Sicily) agricultural environments, selecting among them, those showing a greater seed availability for the experiments. The seeds of the selected weeds were collected from wild plants in the dissemination phase, and after a first selection they were placed in Petri plates for germination. The test was addressed to evaluate the inhibitory ability of *A. arborescens* essential oil against the germination of these seeds; by means of calibrated micro-pipettes, carefully measured micro-quantities of essential oil were poured in soaked paper disks covering the seeds. Each experiment was repeated 5 times.

Insecticidal activity

The test was conducted in the Entomology laboratories of the Instituto Agroforestal Mediterraneo of the Polytechnic University of Valencia, between May and September 2010. Green lemons fruits were artificially infested with *Aoenidiella aurantii* by means of a specially designed device, and the insecticidal activity of *A. arborescens* essential oil was evaluated against the early development stages of the insect. The essential oil was tested as a possible additive to mineral oil, in place of the most harmful organophosphate insecticides. Hence, the comparison was made between the treatments with mineral oil alone and with mineral oil mixed to the *A. arborescens* essential oil, compared with a control with water. After the treatment the fruits were stored under controlled environmental conditions (T 28 °C, RH 70%, photoperiod 18 / 6 hours).

- RESULTS AND DISCUSSION

Propagation Technique

The test showed germination values ranging between 4 and 77.5%, with an average germination time that remained almost constant within all the considered temperature values in the seeds exposed to light (6.9 – 9.8 days), that in those exposed to the dark (7.7 – 9.5 days).

In both tests, the highest germination values were obtained at temperatures of 5 and 10 °C in light conditions, and at 5 and 15°C in when exposed to the dark conditions. From the ecological point of view, it seems to find a reason the higher possibility to find young plants of *A. arborescens* in the wild in spring and autumn, when the temperatures are ranging around 10 °C, while at higher temperature levels, that are typical of the summer periods, the emergence rush is partially inhibited.

The rooting percentage of cuttings does not appear to be significantly affected by harvest time of plant starting material, even if it seems possible to find the best collection time in the winter season, when the rooting rate gained values ranging between 20 and 40%. The mean rooting percentage was close to 20% both in cuttings prepared with rooting hormone and in the untreated ones. The use of different substrates does not appear to be crucial for the rooting process, even if the reduction of the relative amount of peat in the growth substrate gave an overall increase of the rooting rate of 15%.

Phytochemical analysis

The study of the quantitative composition of the essential oil of *Artemisia arborescens* allowed the identification of 43 compounds, corresponding to the 92-99% of the extracted oil. All studied oils are characterized by the predominance of monoterpene on the sesquiterpene fraction. β -thujone (20:51 - 55.85 %), chamazulene (15.23 - 49.41 %), camphor (1.34 - 10.71 %) and germacrene-D (2.28 to 3.43 %) were always found and prevailed in the oil extracts, and since they can adequately represent the analyzed oil, they can be identified as specific markers of *A.arborescens*.

The phenological stage significantly influenced the monoterpene fraction, that in flowering phase is quantitatively higher (69.01% vs. 61.80% obtained in the vegetative phase). The result is widely justified by the well-known physiology of the species, because in this stage most of the attractive substances emitted by plants belong to the group of volatile monoterpenes.

The distillation time is a technological variable that radically influences the production and the composition of the oil itself. About 90 % (77-94%) of total extracted oil is obtained between 60 and 120 minutes, with just a slight increase (about 6%) in the last 60 minutes. In the first minutes the oil is almost entirely composed from the more volatile fraction, namely monoterpenes, while as the process goes on, the sesquiterpene fraction (heavier), and especially chamazulene, becomes more relevant.

The survey, carried out in order to evaluate the effect of the plant component on oil characters, did not show any significant difference in quality traits between leaves and flowers, while the oil yield was much higher in the last botanical fraction.

Antimicrobial activity

The antibacterial activity of the essential oil of *A. arborescens* showed a very good inhibition spectrum in *Listeria* (34 of 44 test strains were inhibited in growth), with a variable degree of sensitivity between the different strains.

The experiment conducted on the most common bacterial species (*Enterobacter*, *Salmonella* and *L. monocytogenes*) responsible of food alteration, allowed to obtain some interesting information: Gram-negative species (*Salmonella* spp. and *Enterobacter* spp.) showed to be unaffected by the treatment with *Artemisia arborescens* essential oil, while a greater degree of sensitivity was observed on Gram-positive species (*Listeria* spp.).

The above mentioned potential of the essential oil of *A. arborescens* suggests a possible industrial application; due to the strong aromatic characteristics of the product, however, it is still to ascertain the response of the consumers from the organoleptic point of view.

Fungicidal activity

The fungal species that showed the highest sensitivity to the essential oil of *A. arborescens* was *Fusarium*, that experienced a maximum inhibition level of 40 – 43 %, although *Verticillium* reached an inhibition value

of 63% but only with one chemical oil type (chamazulene-type). *Fusarium* was always inhibited with values higher than 20% when the maximum oil dose was used.

Especially interesting, and deserving further studies, is the suggested relationship between fungal inhibition and chemical oil composition: the chamazulene-type oil seems to show always a higher degree of inhibition compared to β thujone-type; this last one demonstrates, in some cases, to have an inhibitory effect even lower than that of the oil in which both compounds are present.

Herbicidal activity

The herbicidal activity of the essential oil of *A. arborescens* was studied against *Portulaca oleracea*, *Conyza australis* and *Araujia sericifera*, but it showed some effect only in the last two cases.

Among the tested doses (0.125, 0.250, 0.5 and 1 ppm), only the highest showed an effect on the germination activity, bringing to a complete inhibition of seeds germination; at the dose of 0.25 ppm, a 50 % inhibition rate was instead obtained, and the control action was maintained only up to 3 days after the starting of the trial. Very interesting was the result on *Araujia sericifera*, that represents a real threat to citrus crops in Spain.

Insecticidal activity

After 15 days from the execution of treatments, the mortality of 50 individuals of cochineal per fruit was detected, and it was termed dead each individual that had not completed the transition from the first to second development stage. Generally speaking, the addition of *A. arborescens* essential oil seems to improve the effect of treatment with mineral oils: the statistical analysis shows an highly significant ($P \leq 0.001$) increase of the mortality level (in average, from 75.8 % to 93.2 %) after the addition of Artemisia essential oil to mineral oil. The experiment has allowed to enhance the effectiveness of the formulation obtained with the minimum dose of mineral oil, in which the essential oil of *A. arborescens* seems to represent an effective substitute for the organophosphate products. As a matter of fact, this mixture has proved more effective (+23.2%) than the administration of only mineral oil in the lowest dose (0.5%), showing a not significantly different effect from the average dose (1%).

- CONCLUSIONS

The studies carried out about *A. arborescens* have allowed us to acquire new information on the chemical composition of essential oil and the influence on it of some parameters such as the plant phenological stage, the plant part and the distillation time, allowing to conclude that the best compromise between quality and quantitative results is given by the collection of the whole plant at full bloom phase, followed by the distillation of plant biomass for 120 minutes.

The study has allowed us to provide some important guidelines for the propagation of the species, allowing to restrict the range of working temperatures at 10-15 °C, in which the seeds germinate more quickly and evenly.

The species has largely confirmed the many interesting possibilities of use suggested by the literature, revealing a wide range of biocidal activity, expressed against some Gram-positive bacteria (*Listeria monocytogenes*), some species of fungi (*Fusarium* spp.), a cochineal of citrus (*A. aurantii*) in the juvenile phase and some weeds (*Araujia sericifera*) widespread in Spanish agroecosystems. More deepened studies in each specific area of interest will help to define individual doses and methods of intervention at the accuracy level that is required by industry.

RESUMEN

ESTUDIO FITOQUIMICOS Y AGRONOMICOS SOBRE *ARTEMISIA ARBORESCENS* L. (ASTERACEAE) DE LA FLORA ESPONTANEA DE SICILIA Y ACTIVIDAD BIOCIDA DE SUS ACEITES ESENCIALES.

- OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION

El objetivo de este trabajo es profundizar el conocimiento acerca del comportamiento bio-agronómico de *A. arborescens* en lo relativo a su propagación, técnicas de cultivo, composición química de los aceites esenciales y sus potenciales aplicaciones industriales como materia prima con actividad biocida.

- MATERIALES Y METODOS

Técnicas de propagación

La experimentación, llevada a cabo entre Octubre y Noviembre de 2009 en los laboratorios del “Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura” (C.R.A.), sección de Bagheria (PA, Italia), estaba enfocada a la identificación de las condiciones ambientales más favorables para la germinación de las semillas de *Artemisia arborescens*. Se compararon intervalos de temperatura de germinación de 5°C entre los 5 y los 30°C. También se estudiaron los efectos de la luz en la germinación. Las condiciones sometidas a estudio fueron 18/6 horas (luz/oscuridad) y oscuridad total. Respecto a la propagación por esquejes, se realizaron pruebas comparativas con diferentes periodos de recolección del material vegetal y diferentes sustratos (2:1, 1:1, 1:2 v/v de turba y perlita) y por último, se comparó el efecto de la adición de la hormona de enraizamiento NAA, en dosis de 4000 ppm, sobre el porcentaje de enraizamiento.

Análisis fitoquímico.

El área de muestreo, de 100 km² de extensión, se ubica en la provincia de Palermo y limita al Norte con el mar Tirreno y al Sur, Este y Oeste con montes de altitudes variables que van desde los 600 a los 1250 m sobre el nivel del mar. Se eligieron diferentes situaciones para el muestreo de las poblaciones naturales de *A. arborescens*. Entre los meses de Septiembre de 2009 y Septiembre de 2010, cuando las plantas se encontraban en estado de estancamiento vegetativo y entonces en plena floración, se realizó la recolección de muestras para la posterior destilación al vapor. El análisis químico de los compuestos se realizó en los laboratorios de Química Farmacéutica de la Universidad de Valencia usando un cromatógrafo de gases y un espectrómetro de masa.

Actividad antimicrobiana.

La actividad antibiótica del aceite esencial de *A. arborescens* se ha probado sobre algunas cepas de bacterias disponibles en los laboratorios del departamento “Scienze per la Promozione della Salute” (Università degli Studi di Palermo). Las especies seleccionadas (*Listeria monocytogenes*, *Enterobacter* spp. y *Salmonella enterica*) están generalmente asociadas con las alteraciones de ciertos alimentos derivadas de una mala conservación.

Las cepas bacterianas fueron inoculadas en el sustrato y depositadas en placas Petri, dentro de las cuales se colocaron discos de papel mojado con la disolución de aceite esencial de *A. arborescens* en acetona en dosis

en virtud del Protocolo. Las placas fueron colocadas a 37 ° C durante 24 horas y la actividad inhibitoria se evaluó como positiva cuando alrededor del disco de papel existía una zona de inhibición evidente.
Actividad fungicida.

La capacidad del aceite esencial de *A. arborescens* para la inhibición del crecimiento del micelio del hongo, se evaluó en los laboratorios de la CRA “C.R.A.-S.F.M. (Unità di Ricerca per il Recupero e la Valorizzazione delle Specie Floricole Mediterranee, Bagheria, PA, Italia)”, sobre *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthii*, *Verticillium dahliae*, *Phytophthora citrophthora* y *Botrytis cinerea*. Los cuatro hongos patógenos más comunes en los cultivos de invernadero, y la horticultura ornamental.

Se adoptó un medio de cultivo consistente en sopa de patata, dextrosa y agar (PDA). El estudio se llevó a cabo en placas petri con 20 ml de sustrato y aceite esencial a las dosis de estudio. Después de la inoculación de las placas con micelio de hongo se incubaron a 25 ° C, excepto *B. cinerea* que se incubó a 20 ° C, durante 10 días. El crecimiento radial del micelio se midió después de los días 3, 6 y 10 tras el inicio del experimento. El estudio se realizó por partida doble y la actividad inhibitoria se calcula como un porcentaje de crecimiento en referencia al crecimiento del control no tratado. Los aceites probados se caracterizaban por tres tipos diferentes de composición química, tipo camazuleno, cuando este se presentó como compuesto mayoritario, tipo β -tuyona cuando el compuesto predominante fue la β -tuyona, y por último tipo camazuleno/ β -tuyona, cuando los dos compuestos se encontraban en el mismo porcentaje.

Actividad herbicida

El experimento se realizó en los laboratorios de Botánica del Instituto Agroforestal del Mediterráneo de la Universidad Politécnica de Valencia entre Marzo y Septiembre de 2010. De una lista compuesta por las especies invasoras de interés agrícola común a los ambientes españoles (Valencia) e italiano (Sicilia), se seleccionaron aquellas que permiten una mayor disponibilidad de semillas para los experimentos. Las semillas de las especies de hierbas adventicias seleccionadas fueron recolectados de las plantas silvestres en la fase de diseminación, seleccionadas y colocadas a germinar en placas Petri. La prueba está enfocada a evaluar la capacidad inhibitoria del aceite esencial de *A. arborescens* frente a la germinación de dichas semillas. Mediante micro-pipetas calibradas, se inocularon en discos de papel absorbente cantidades cuidadosamente medidas de aceite esencial, que se colocaron sobre las semillas. Cada experimento se realizó 5 veces.

Actividad insecticida

La prueba se realizó en los laboratorios de Entomología del Instituto Agroforestal Mediterráneo de la Universidad Politécnica de Valencia, en el período comprendido entre mayo y septiembre de 2010.

En frutos de limón verde, artificialmente infestados con un dispositivo especialmente diseñado, se evaluó la actividad insecticida del aceite esencial de *A. arborescens* en las primeras fases de desarrollo de *Aoenidiella aurantia*.

El aceite esencial fue probado como posible complemento de insecticidas más nocivos, como los organofosforados.

Los tratamientos con aceite mineral y aceite mineral mezclado fueron comparados con los tratamientos con aceite esencial de *A. arborescens* y con un control con agua. Después del tratamiento los frutos se colocaron en condiciones óptimas para el desarrollo (28 ° C, humedad relativa del 70%, fotoperiodo 18 / 6 horas).

Después de 15 días se contabilizaron los individuos que se encontraban en el segundo estadio de desarrollo como sobrevivientes y los otros como muertos.

- RESULTADOS Y DISCUSION

Técnica de propagación

La prueba mostró valores de germinación que oscilan entre 4 y 77.5 %, con un tiempo medio de germinación casi constante para todos los rangos de temperatura considerados en las semillas expuestas a la luz (7.7 a 9.5

días) y en las que están sometidas a oscuridad (7.7 a 9.5 días).

En ambas pruebas, los mayores valores de germinación se obtuvieron a temperaturas incluidas entre de 5 y 15 ° C en condición de luz, mientras de 5 y 15°C en condiciones de oscuridad.

Desde el punto de de vista ecológico, parece que esta es la razón del hecho de que en la naturaleza las plantas jóvenes de *A. arborescens* se encuentren en mayor número en primavera y otoño, que es cuando las temperaturas son alrededor de 10 ° C, mientras que a temperaturas más altas, típicas del verano, los flujos de emergencia se inhiben parcialmente.

El porcentaje de enraizamiento de los esquejes no parece verse afectado significativamente por la fecha de cosecha dl material vegetal, aunque el mejor tiempo parece ser en la temporada de invierno con porcentajes que oscilan entre el 20 y el 40% de enraizamiento. El enraizamiento fue cercano al 20% tanto en estacas tratadas con hormona de enraizamiento como en las no tratadas. El uso de diferentes sustratos no parece ser fundamental para el proceso de enraizamiento, aunque la reducción de la fracción de turba provocó un aumento total de la tasa de enraizamiento del 15%.

Análisis fitoquímico

El estudio de la composición cuantitativa del aceite esencial de *Artemisia arborescens* condujo a la identificación de 43 compuestos, lo que corresponde al 92 a 99% de los aceites extraídos. Todos los aceites estudiados se caracterizaron por el predominio de los monoterpenos en la fracción sesquiterpénica. Siempre se encontraron, y prevalecen, compuestos como el β -tuyona (20,51 - 55,85%), camazuleno (15,23 a 49,41%), alcanfor (1,34 a 10,71%) y germacreno-D (02:28-3:43%). Estos compuestos fueron identificados como marcadores específicos de *A. arborescens*, ya que representan suficientemente los aceites analizados.

El estado fenológico parece afectar significativamente a la fracción de monoterpenos, que en la floración es cuantitativamente superior (69,01% frente al 61,80% registrado en la fase vegetativa). El resultado es ampliamente justificado por la conocida fisiología de la especie, ya que, en esta fase, la mayoría de las sustancias atrayentes emitidas por las plantas pertenecen al grupo de los monoterpenos volátiles.

El tiempo de destilación es una variable tecnológica que influye de manera radical en la producción y la composición del aceite. Aproximadamente el 90% (77-94%) del aceite extraído se obtiene entre los 60 y 120 minutos, con un ligero aumento (sólo el 6%) en los últimos 60 minutos. En los primeros minutos del proceso, el aceite obtenido está compuesto casi en su totalidad por la fracción más volátil, es decir, monoterpenos, mientras que conforme avanza la extracción, la fracción sesquiterpénica (más pesada) y el camazuleno ganan importancia.

El estudio realizado sobre la influencia de la fracción botánica en las características del aceite no muestra diferencias significativas entre las hojas y flores, mientras que el rendimiento es mucho mayor en esta última fracción botánica.

Actividad antimicrobiana

La actividad antibacteriana del aceite esencial de *A. arborescens* ha presentado un buen espectro de inhibición de *Listeria arborescens* (en 34 de 44 cepas probadas se inhibió el crecimiento), con un grado de sensibilidad variable entre las diferentes cepas seleccionadas.

El estudio realizado sobre las especies bacterianas responsables de la alteración de los alimentos más comunes (*Enterobacter*, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*), permite obtener datos de interés: las especies Gram-negativas (*Salmonella* spp y *Enterobacter* spp) se han mostrado insensibles al tratamiento con *Artemisia arborescens*, mientras que se observó un mayor grado de sensibilidad en las especies Gram-positivas (*Listeria* spp.).

El potencial mencionado del aceite esencial de *A. arborescens* permite plantear la hipótesis de una posible aplicación industrial. Dadas las características aromáticas fuertes del producto, queda comprobar la respuesta de los consumidores desde el punto de vista organoléptico.

Actividad fungicida.

Las especies que han mostrado más sensibilidad al aceite esencial de *A. arborescens* son *Fusarium*, con una inhibición máxima del 40 al 43%, aunque *Verticillium* presentan una inhibición del 63%, pero sólo con un tipo químico del aceite (tipo camazuleno). *Fusarium* se inhibió con valores siempre superiores al 20% cuando se utiliza la dosis máxima de aceite.

Particularmente interesante y digno de estudio es la posible relación entre la inhibición fúngica y la composición química del aceite: el aceite tipo camazuleno parece tener siempre un grado de inhibición mayor que el tipo β -tuyona. Este último, en algunos de los casos, tiene un efecto inhibidor más bajo, incluso que los aceites que presentan ambos compuestos.

Actividad herbicida

La actividad herbicida del aceite esencial de *A. arborescens* se ha estudiado en *Portulaca oleracea*, *Conyza australis* y *Araujia sericifera*, pero sólo en los dos últimos mostró efectos.

Entre las dosis en prueba (0,125, 0,250, 0,5 y 1 ppm), sólo mostró actividad inhibidora sobre la germinación la dosis mayor, obteniendo una inhibición completa, en lugar de una inhibición del 50% como la que se obtuvo con 0,25 ppm. El control se mantuvo un máximo de 3 días tras el inicio de la prueba.

El resultado de *Araujia sericifera* resultó ser muy interesante, ya que representa una verdadera amenaza para los cultivos de cítricos en España.

Actividad insecticida

Después de 15 días tras la ejecución de los tratamientos, se detectó la mortalidad de 50 individuos de cochinilla para cada fruto, contabilizando como mortalidad a los individuos que no habían completado la transición de la primera etapa a la segunda de desarrollo.

En general, la adición de aceite esencial de *A. arborescens* parece potenciar el efecto del tratamiento con aceites minerales: el análisis estadístico muestra un aumento muy significativo ($p \leq 0,001$) del nivel general de mortalidad en los tratamientos con aceite mineral sólo (en promedio 75,8%) al tratamiento con aceite esencial de *Artemisia* añadido al aceite mineral (media 93,2%).

El experimento ha permitido mejorar la efectividad de la formulación obtenida con la dosis mínima de aceite mineral, en la que el aceite esencial de *A. arborescens* parece sustituir con eficacia los productos organofosforados. Esta mezcla, de hecho, demostró ser más eficaz (+23,2%) que el uso de sólo aceite mineral en la dosis más baja (0,5%), mostrando un efecto no muy diferente a la dosis media (1%).

- CONCLUSIONES

Los estudios acerca de *A. arborescens* efectuados en el curso de esta investigación nos han permitido obtener nueva información sobre la composición química del aceite esencial y sobre la influencia de algunos parámetros como el estado fenológico, la fracción botánica y el tiempo de destilación, permitiendo concluir que el mejor compromiso entre la calidad y el rendimiento es la recolección de toda la planta en pleno florecimiento y haciendo la destilación durante 120 minutos.

El estudio nos ha permitido ofrecer algunas directrices importantes para la propagación de la especie, lo que permite restringir el rango de temperatura a 10-15 ° C que es cuando las semillas germinan con mayor rapidez y de manera uniforme, y la garantía de que la adición de hormonas exógenas no afecta al enraizamiento de estacas.

Las especies han confirmado ampliamente las interesantes posibilidades de uso sugeridas por los estudios previos, revelando un amplio rango de actividad biocida contra algunas bacterias Gram-positivas (*Listeria monocytogenes*), algunas especies de hongos (*Fusarium* spp.), una cochinilla de los cítricos (*A. aurantii*) en fase juvenil y algunas hierbas adventicias (*Araujia sericifera*), muy común en los agroecosistemas españoles. Estudios más profundos y detallados en cada uno de los campos y áreas de interés ayudarán a definir dosis específicas y métodos de actuación al nivel de detalle que requiere la industria.

SINTESI

STUDI FITOCHIMICI ED AGRONOMICI SU ARTEMISIA ARBORESCENS L. (ASTERACEAE) DELLA FLORA SPONTANEA SICILIANA E ATTIVITÀ BIOCIDA DEGLI OLI ESSENZIALI

- INTRODUZIONE

L'utilizzo degli estratti vegetali come prodotti per il controllo delle avversità biotiche dei coltivi è conosciuto da molti secoli ma solo in parte è stato approfonditamente studiato.

La bibliografia disponibile riporta studi sull'attività biocida dei diversi estratti ottenibili dalle piante (oli essenziali, macerati ed estratti con solventi organici), in massima parte concentrati su poche specie utilizzate tradizionalmente come il piretro (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) ed il neem (*Azadirachta indica*). All'interno della flora spontanea siciliana sono presenti diverse specie, appartenenti soprattutto alle famiglie botaniche delle Labiate e delle Composite, in cui è stata riscontrata attività biocida, che tuttavia non risultano adeguatamente studiate. La ridotta bibliografia presente, contrapposta all'enorme diffusione sul territorio siciliano dell'*A.arborescens* ha fatto ricadere su questa specie la scelta di studio delle possibili applicazioni biocide del suo olio essenziale.

- Obiettivi della ricerca

Scopo del lavoro è stato quello di approfondire le conoscenze sul comportamento bio-agronomico di *A. arborescens* in coltivazione, sulla tecnica di propagazione, sulla composizione chimica dell'olio essenziale e sulle sue possibili applicazioni in vari settori industriali come materia prima ad attività biocida.

- MATERIALI E METODI

Tecnica di Propagazione

La prova, effettuata nei mesi di ottobre e novembre 2009 presso i laboratori del Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura (C.R.A.), sez. di Bagheria, è stata condotta in via preliminare per individuare alcune condizioni ambientali idonee per la germinazione del seme di *Artemisia arborescens*. Sono state messe a confronto temperature di germinazione da 5° a 30 °C con scarti di 5°C. E' stato studiato anche l'effetto della luce sul processo germinativo effettuando alcune prove con fotoperiodo 18/6 ore di luce/buio , ed alcune prove in condizioni di buio totale.

Per quanto concerne la propagazione per talea sono stati messi a confronto differenti periodi di raccolta del materiale vegetale, differenti substrati di radicazione (2:1; 1:1, 1:2 v/v di torba acida e perlite) ed infine l'effetto dell'ormone radicante NAA, in dose di 4000 ppm, sulla percentuale di attecchimento.

Analisi fitochimica

L'area interessata dai campionamenti, estesa per circa 100 kmq, ricade nella provincia di Palermo e risulta limitata al Nord dal Mar Tirreno e sugli altri tre lati da montagne con altitudine variabile dai 600 ai 1250 m s.l.m. Sono stati selezionati diversi siti di prelevamento di popolazioni naturali di *A.arborescens*. Nel periodo compreso tra il settembre 2009 ed il settembre 2010 quando le piante si presentavano in fase di stasi vegetativa e successivamente in fase di piena fioritura, sono stati prelevati diversi campioni vegetali da avviare al processo di distillazione in corrente di vapore.

L'analisi chimica dei composti svoltasi presso i laboratori di chimica farmaceutica dell'Università di Valencia si è basata sull'impiego di un Gascromatografo e di uno Spettrometro di Massa.

Attività antimicrobica

L'olio essenziale di *A.arborescens* è stato testato per la sua attività antibiotica su alcuni ceppi batterici disponibili in colture apposite presso il Dipartimento "G. D'Alessandro" di Scienze per la Promozione della Salute dell'Università degli Studi di Palermo. Le specie selezionate (*Listeria monocytogenes*, *Enterobacter* spp. e *Salmonella enterica*) sono generalmente associate alle alterazioni degli alimenti determinate da una loro cattiva conservazione.

I ceppi batterici sono stati inoculati in quantità nota nel substrato di coltura e versati all'interno di piastre Petri al cui interno sono stati disposti dei dischetti di carta imbibiti con la soluzione acetoneica di olio essenziale alle dosi previste dal protocollo. Le piastre sono state poste a 37°C per 24 h e l'attività inibitoria è stata valutata positiva quando attorno al disco di carta si presentava un'evidente area di inibizione.

Attività fungicida

La capacità inibente sulla crescita del micelio fungino, dell'olio essenziale di *A. arborescens* è stata valutata presso i laboratori del C.R.A.-S.F.M. (Unità di Ricerca per il Recupero e la Valorizzazione delle Specie Floricole Mediterranee, Bagheria (PA), Italia), su *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthii*; *Verticillium dahliae*, *Phytophthora citrophthora* e *Botrytis cinerea*, quattro patogeni fungini molto diffusi nelle colture in serra, sia ornamentali che ortive. È stato adottato un mezzo di coltura costituito da Brodo di Patata, Agar e Destrosio (PDA). La prova è stata svolta in piastre Petri dove all'interno venivano versati 20 ml di substrato, e successivamente immesso l'olio essenziale nelle dosi previste dal protocollo sperimentale. Dopo l'inoculo del micelio fungino le piastre sono state poste in incubazione a 25 °C, ad eccezione di *B. cinerea*, caratterizzata da esigenze termiche inferiori, che è stata posta a 20 °C per 10 giorni. L'accrescimento radiale del micelio è stato misurato dopo 3, 6 e 10 giorni. L'esperimento è stato condotto in doppio e l'attività inibente è stata calcolata come percentuale dell'accrescimento in riferimento all'accrescimento del controllo non trattato. Gli oli in prova sono stati caratterizzati da tre tipologie differenti di composizione chimica; camazulene-tipo, quando questo si presentava come composto maggioritario, β -thujone-tipo quando il composto prevalente era il β -thujone, ed infine camazulene/ β -thujone-tipo quando nella composizione chimica dell'olio i due composti si equivalevano percentualmente.

Attività erbicida

La prova è stata svolta presso i laboratori di botanica dell'Istituto Agroforestal Mediterraneo dell'Università Politecnica di Valencia nel periodo compreso tra marzo e settembre del 2010. Le specie target per questa prova sono state selezionate all'interno di una lista costituita dalle specie infestanti di interesse agrario comuni agli ambienti Spagnoli (Valencia) e Italiani (Sicilia); tra queste sono poi state selezionate quelle che permettevano una maggior disponibilità di seme per le prove. I semi delle specie infestanti scelte sono stati raccolti da piante spontanee in fase di disseminazione, selezionati e posti a germinare in piastre Petri. La prova di inibizione della capacità germinativa è stata effettuata immettendo con micro-pipette calibrate micro-quantità prefissate di olio essenziale sul disco di carta imbevuto che copriva i semi; ogni tesi è stata replicata 5 volte.

Attività insetticida

La prova è stata svolta presso i laboratori di entomologia dell'Istituto Agroforestal del Mediterraneo dell'Università Politecnica di Valencia, nel periodo compreso tra il maggio ed il settembre 2010. Su frutti di limone verdi, infestati artificialmente mediante un dispositivo appositamente progettato, è stata valutata l'attività insetticida dell'olio essenziale sui primi stadi evolutivi di *Aoenidiella aurantii*. L'olio essenziale non è stato testato come prodotto singolo ma come coadiuvante dell'attività insetticida dell'olio minerale in sostituzione dei più nocivi insetticidi fosfoorganici. Sono stati quindi posti a confronto trattamenti con solo olio minerale e con olio minerale miscelato ad olio essenziale di *A. arborescens*, comparati con un controllo con acqua. Dopo il trattamento i frutti sono stati posti in camera termostata (T 28 °C, U.R. 70%, fotoperiodo 18/6 ore).

- RISULTATI E DISCUSSIONE

Tecnica di Propagazione

La prova ha evidenziato valori di germinabilità oscillanti tra il 4 e il 77.5%, con un tempo medio di germinazione pressoché costante entro tutti i valori di temperatura considerati nei semi esposti alla luce (6.9 – 9.8 giorni) ed in quelli esposti al buio (7.7 – 9.5 giorni).

In entrambe le prove, i valori di germinazione più elevati si sono ottenuti a temperature comprese tra i 5 ed i 15 °C, mentre a 5 e 15°C in condizioni di buio.

Dal punto di vista ecologico, sembra così trovare una motivazione il fatto che in natura le giovani piante di *A. arborescens* si ritrovano in maggior numero in primavera e in autunno, quando cioè le temperature si aggirano intorno ai 10 °C, mentre a temperature superiori, tipiche delle stagioni estiva, i flussi di emergenza vengono parzialmente inibiti.

La percentuale di attecchimento delle talee non sembra essere influenzata significativamente dal periodo di raccolta della biomassa vegetale anche se il periodo migliore sembra poter essere comunque collocato nella stagione invernale con valori oscillanti tra 20 e circa 40%. La radicazione media è stata prossima al 20% sia nelle talee trattate con ormone radicante che in quelle non trattate. Anche l'uso di differenti substrati non sembra essere determinante ai fini del processo di radicazione, anche se con la riduzione della frazione torbosa è stato ottenuto un incremento del tasso di radicazione pari al 15%.

Analisi Fitochimica

Lo studio della composizione quali-quantitativa dell'olio essenziale di *Artemisia arborescens* ha condotto all'identificazione di 43 composti, nel complesso corrispondenti al 92-99% dell'olio estratto. Tutti gli oli ottenuti sono caratterizzati dalla predominanza della frazione monoterpenica rispetto a quella sesquiterpenica. Composti quali β -thujone (20.51 - 55.85 %), camazulene (15.23 - 49.41 %), canfora (1.34 - 10.71 %) e germacrene-D (2.28 - 3.43 %) sono stati individuati come marker specifici in *A. arborescens* in quanto sempre presenti e prevalenti negli oli estratti, rappresentando adeguatamente l'olio analizzato.

La fase fenologica risulta influenzare in maniera significativa la frazione monoterpenica, che in fase di fioritura risulta quantitativamente più elevata (69.01% contro il 61.80% rilevato in fase vegetativa). Il risultato è ampiamente giustificato dalla nota fisiologia della specie, poiché in questa fase la maggior parte delle sostanze attrattive emesse dalle piante appartiene al gruppo dei monoterpeni volatili.

Il tempo di distillazione è una variabile tecnologica che influenza in maniera radicale sia il rendimento che la composizione dell'olio stesso. Circa il 90% (77-94%) dell'olio complessivamente estratto si ottiene tra i 60 ed i 120 minuti, con un leggero incremento (appena il 6%) negli ultimi 60 minuti. Nei primi minuti del processo l'olio è costituito quasi interamente dalla frazione più volatile, cioè quella monoterpenica, mentre con l'avanzamento del processo l'olio si va arricchendo della frazione sesquiterpenica (più pesante) e soprattutto di camazulene.

L'indagine effettuata sull'influenza della frazione botanica non ha evidenziato significative differenze qualitative tra foglie e fiori, mentre il rendimento risulta molto più alto in quest'ultima frazione botanica.

Attività antimicrobica

L'attività antibatterica dell'olio essenziale di *A. arborescens* ha presentato uno spettro di inibizione molto buono su *Listeria* (34 dei 44 ceppi in prova sono stati inibiti nella crescita), con un grado di sensibilità al trattamento variabile tra i diversi ceppi selezionati.

La verifica condotta sulle più diffuse specie batteriche (*Enterobacter*, *L. monocytogenes* e *Salmonella*) responsabili di intossicazioni alimentari ha consentito comunque di ricavare informazioni interessanti: le specie Gram-negative (*Salmonella* spp. e *Enterobacter* spp.) si sono mostrate insensibili al trattamento con *Artemisia arborescens*, mentre un maggior grado di sensibilità è stato osservato sulle specie Gram-positive (*Listeria* spp.).

Le sopra citate potenzialità dell'olio essenziale di *A. arborescens* permetterebbero di ipotizzarne un possibile utilizzo industriale; in considerazione delle forti caratteristiche aromatiche del prodotto, tuttavia, resta ancora da verificare la risposta del consumatore dal punto di vista organolettico.

Attività fungicida

La specie maggiormente sensibile all'olio essenziale di *A.arborescens* risulta essere stata il *Fusarium* con una inibizione massima del 40 - 43%, anche se il *Verticillium* ha presentato una inibizione del 63% ma solo con una tipologia chimica di olio (camazulene-tipo). Il *Fusarium* è stato inibito sempre con valori superiori al 20 % quando è stata utilizzata la dose massima di olio.

Particolarmente interessante e meritevole di approfondimento risulta la possibile relazione tra inibizione fungina e composizione chimica dell'olio: l'olio camazulene-tipo sembra infatti presentare un grado di inibizione sempre più alto del β -thujone-tipo; quest'ultimo risulta, in alcuni casi, dotato di un effetto inibente più basso perfino dell'olio che presenta entrambi i composti.

Attività erbicida

L'attività erbicida è stata studiata su *Portulaca oleracea*, *Conyza australis* e *Arauja sericifera* ma solo su queste ultime due l'olio essenziale di *A.arborescens* ha evidenziato effetti.

Tra le dosi in prova (0.125, 0.250, 0.5 e 1 ppm), solo le più elevate hanno mostrato efficacia sull'attività germinativa inibendo completamente la germinazione; alla dose di 0.25 ppm si è invece ottenuta una inibizione pari al 50%, ma l'azione di controllo è stata mantenuta solo fino al 3 giorno di prova.

Molto interessante appare il risultato ottenuto su *Arauja sericifera*, poiché questa rappresenta una reale minaccia per le coltivazioni agrumicole in Spagna.

Attività insetticida

Dopo 15 giorni dall'esecuzione dei trattamenti, è stata rilevata la mortalità di 50 individui di cocciniglia per ogni frutto, considerando morti gli individui che non avevano portato a termine il passaggio dal primo stadio di sviluppo al secondo. In linea generale, l'aggiunta di olio essenziale di *A. arborescens* sembra potenziare l'effetto del trattamento con oli minerali: l'analisi dei contrasti ortogonali mostra infatti un incremento altamente significativo ($P \leq 0.001$) del livello complessivo di mortalità passando dai trattamenti con solo olio minerale (in media 75.8 %) ai trattamenti con aggiunta di olio essenziale di artemisia (in media 93.2 %). L'esperimento ha consentito di attribuire un buon livello di efficacia alla formulazione costituita dalla minima dose di olio minerale, in cui l'olio essenziale di *A. arborescens* sembra poter validamente sostituire i prodotti fosfororganici. Questa miscela ha infatti rivelato un'efficacia maggiore (+23.2%) della somministrazione di solo olio minerale in dose minima (0,5%), mostrando un effetto non significativamente differente dalla dose media (1%).

- CONCLUSIONI

Gli studi effettuati su *A.arborescens* nel corso di questa ricerca hanno permesso di acquisire nuove informazioni sulla composizione chimica dell'olio essenziale e sull'influenza su questa di alcuni parametri quali la fase fenologica, la frazione botanica ed il tempo di distillazione, permettendo di giungere alla conclusione che il miglior compromesso quali-quantitativo si ottiene dalla raccolta dell'intera pianta nella fase di piena fioritura e distillando la biomassa per 120 minuti.

Lo studio ha permesso di fornire alcune importanti indicazioni operative ai fini della propagazione della specie, consentendo di circoscrivere ai 10-15 °C il range di temperatura a cui i semi germinano più rapidamente e uniformemente, e accertando l'ininfluenza dell'aggiunta di ormoni esogeni per la radicazione delle talee.

La specie ha confermato in larga parte le numerose e interessanti potenzialità suggerite dalla letteratura, rivelando un'ampia gamma di attività biocide, esplicitate nei confronti di alcuni ceppi batterici Gram-positivi (*Listeria monocytogenes*), di alcune specie fungine (*Fusarium* spp.), di una cocciniglia degli agrumi (*A. aurantii*) in fase giovanile e di alcune erbe infestanti (*Arauja sericifera*) diffuse negli agroecosistemi spagnoli. Studi di maggiore dettaglio condotti nei singoli ambiti specifici consentiranno di definire dosi e modalità di intervento con il livello di accuratezza richiesto dall'industria.

INTRODUZIONE

La crescente richiesta di nuovi prodotti di origine naturale, sia nel settore della salute umana e animale che nell'industria alimentare e cosmetica, attribuisce grande importanza allo studio delle essenze spontanee per l'individuazione di nuovi principi attivi.

Se da un lato la maggior parte delle industrie del settore dei prodotti di derivazione naturale si approvvigiona dalla raccolta dello spontaneo, dall'altro vi è sempre maggiore evidenza che la crescente pressione sugli ecosistemi porta ad un progressivo impoverimento della biodiversità, tanto che alcune specie sono ormai a reale rischio di estinzione. Oggi, uno tra i maggiori limiti dell'industria dei prodotti naturali può essere identificato proprio nella ridotta disponibilità naturale delle essenze utili; un ruolo basilare è a questo punto ricoperto dallo studio delle tecniche agronomiche per la produzione su scala medio-ampia delle più diverse specie di interesse industriale. La valorizzazione agronomica di tali specie potrebbe giocare un ruolo importante nella progettazione di linee strategiche alternative per il potenziamento economico e produttivo delle aree interne e/o svantaggiate, nel quadro della multifunzionalità che l'agricoltura oggi si propone di esercitare.

Artemisia arborescens L. è una Asteracea arbustiva largamente diffusa negli ambienti mediterranei, a cui una copiosa attività sperimentale svolta in diverse parti del mondo attribuisce numerose proprietà che ne fanno una materia prima assai interessante per numerosi settori industriali. Nel corso del triennio di dottorato è stato pertanto svolto uno studio approfondito e multidisciplinare sulle potenzialità agronomiche e industriali della specie, rivolgendo particolare attenzione alla valutazione delle sue capacità biocide.

1 GLI OLI ESSENZIALI

Il tentativo più antico di uniformare gli oli essenziali sotto un'unica definizione ufficiale risale probabilmente alla metà del XIX secolo (Orosi, 1857) quando gli oli essenziali vennero definiti come *“la parte lipofila del fitocomplesso della pianta ... costituiti da miscele complesse di sostanze organiche volatili di costituzione chimica diversa ottenuti mediante distillazione in corrente di vapore e successive separazioni da varie specie vegetali”*. Le definizioni successive si sono in realtà discostate abbastanza poco da questa, e la moderna Farmacopea Europea (EDQM, 2011) definisce gli oli essenziali come *“il prodotto della distillazione in corrente di vapore o dell'idrodistillazione, o della distillazione secca di una pianta o talune sue parti o, nel caso di prodotti agrumari, mediante opportuni processi meccanici a freddo”*. Come si vede, la definizione di olio essenziale si basa più sulla metodica adoperata per l'estrazione che sulle caratteristiche fisiche o chimiche del prodotto. La metodologia più antica sicuramente è quella che vede l'utilizzo del grasso animale come vettore per l'estrazione; pur essendo una procedura costosa e lunga, è ancora in uso per essenze molto delicate quali la rosa ed il gelsomino che si deteriorano facilmente con il calore e/o con la presenza di solventi organici aggressivi (Odello, 1990).

Anche se, a fini non farmacologici, oggi grazie alle nuove tecnologie è possibile estrarre dalla matrice vegetale una cospicua frazione di composti volatili liposolubili con altri metodi molto più performanti della distillazione in corrente di vapore, a tale frazione non può, a rigore, venire attribuito il nome di “olio essenziale” (Franz e Novak, 2010). Le estrazioni con solventi organici, fluidi supercritici, ultrasuoni e microonde, quindi, consentono di ottenere perfino da una stessa pianta miscele chimiche a volte anche molto diverse, nessuna delle quali ne costituisce in realtà l'olio essenziale (Peng et al., 2004; Pimentel, 2006; Sereshti e Samadi, 2007; Richter e Schellenberg, 2007; Cseke e Kaufman, 2006).

Dal punto di vista chimico, gli oli essenziali sono prevalentemente costituiti da prodotti terpenici (mono e sesquiterpeni) e da una piccola frazione di derivazione fenolica; in percentuale ancora inferiore si trovano

alcoli, aldeidi, chetoni, tannini ed alcaloidi; questi ultimi pur se presenti in quantità molto ridotte costituiscono la principale motivazione dell'interesse commerciale verso molte specie vegetali (Cseke e Kaufman, 2006).

I terpeni conferiscono ad ogni olio essenziale il suo tipico aroma, rappresentando frequentemente il "principio attivo" dell'olio stesso. Essi derivano dall'unione di più unità isopreniche, gruppi chimici a 5 atomi di carbonio (C5) organizzati a formare famiglie chimiche quali i monoterpeni (a 10 atomi di carbonio: C10) e i sesquiterpeni (a 15 atomi di carbonio: C15). Al primo gruppo appartengono molecole a struttura ciclica, come il β thujone e la canfora, o strutture a-cicliche come il mircene ed il linalolo. I sesquiterpeni possono invece essere alifatici, biciclici e triciclici; tra i più noti spiccano l'artemisina, che ricopre un ruolo fondamentale nella lotta alla malaria, ed il cariofillene, presente in moltissime specie, che viene considerato un ottimo anti-infiammatorio.

I fenoli sono invece composti aromatici derivati dal benzene, che conferiscono agli oli il loro colore caratteristico e ne rappresentano molte volte dei limiti tossici all'utilizzazione.

L'enorme complessità presente negli oli essenziali, costituiti da circa 100.000 composti, rende questi prodotti interessantissimi dal punto di vista industriale; su circa 3000 oli essenziali oggi conosciuti, circa il 10% sono commercializzati come prodotti per aromaterapia ed erboristeria, mentre alcuni sono utilizzati come principi attivi di prodotti farmaceutici e cosmetici o come fitofarmaci, ed altri come conservanti alimentari (Bakkali et al., 2008).

La funzione svolta dall'olio essenziale nella pianta non è del tutto chiarita; nel corso del tempo sono state formulate diverse ipotesi, secondo cui questo, costituito in massima parte da metaboliti secondari, potrebbe costituire uno strumento di difesa della pianta contro le avversità esterne, svolgendo un'azione come antibiotico, fungicida, insetticida o anche come strumento di difesa contro gli erbivori riducendo la propria appetibilità. I metaboliti secondari presenti negli oli essenziali svolgono un ruolo anche per l'attrazione degli insetti pronubi, ed infine in qualche caso sono state riscontrate anche sostanze grasse con probabile funzione di riserva (Bakkali et al., 2008; Cseke e Kaufman, 2006).

1.1 MODALITÀ D'ESTRAZIONE

Distillazione in corrente di vapore

La distillazione in corrente di vapore è la metodologia per l'ottenimento degli oli essenziali attualmente riconosciuta dalle norme ISO (International Standard Organization) ed è basata sulle diverse proprietà fisico-chimiche degli oli essenziali e dell'acqua (tabella 1.1.1).

In questo procedimento, l'acqua sotto forma di vapore costituisce il vettore in grado di trasportare le sostanze più o meno volatili costituenti l'olio essenziale che una volta condensato permette la separazione tra olio ed acqua per sedimentazione.

Le parti che costituiscono un distillatore (Fig.1.1.1), sia da laboratorio (tipo Clevenger) che per uso industriale (alambicco) sono sempre le stesse, ovvero (Odello, 1990):

Caldaia [1] : per la produzione di vapore acqueo (vettore); può essere indipendente e quindi separata oppure trovarsi inclusa nella cucurbita.

Cucurbita [2] : all'interno di questa camera viene posizionato il materiale vegetale. Se la caldaia è inclusa all'interno della cucurbita la massa vegetale viene disposta su di una griglia sotto la quale vi è dell'acqua che riscaldandosi si trasforma in vapore attraversando la sovrastante massa.

Tabella 1.1.1 - caratteristiche chimico-fisiche distintive di oli essenziali e acqua.

CARATTERISTICA	Olio essenziale	Acqua
Densità	0.8 – 1.2	1
Punto di ebollizione	60 – 300 °C	100 °C
Solubilità in acqua	0.25-0.30%	100%

Elmo o Cappello: è la parte superiore della cucurbita generalmente a forma di imbuto rovesciato o cupola. La funzione dell'elmo è di chiudere la cucurbita rendendola ermetica e raccordata al collettore.

Collettore o Collo di cigno [3]: ha la funzione di convogliare il vettore (vapore acqueo) saturo di olio essenziale nel refrigerante dove avviene la prima separazione tra vettore ed olio. Abituamente in questa parte del distillatore trova posto un termometro per monitorare la temperatura di distillazione, che rappresenta uno dei più importanti parametri del processo. Se questa dovesse essere troppo alta si andrebbe incontro alla "cottura" o "bruciatura" dell'olio con conseguente perdita di rendimento e qualità dello stesso.

Refrigerante [4]: in questa parte del distillatore il vettore saturo viene raffreddato passando attraverso un condotto mantenuto alla temperatura di circa 10°C da una serpentina esterna attraversata da acqua (nella maggior parte dei casi) o da liquidi appositamente studiati (glicole etilenico). Sempre più frequentemente il refrigerante viene integrato con il sedimentatore dell'olio.

Sedimentatore dell'olio [5]: Una volta ricondensato il vettore allo stato liquido, la separazione tra olio e acqua avviene per diversa densità.

Nel corso del processo, con l'aumento della temperatura all'interno della cucurbita la massa vegetale perde di consistenza meccanica e di turgore per effetto dell'evaporazione dell'acqua di vegetazione. In questa fase le membrane cellulari aumentano la loro permeabilità fino a rompersi, lasciando fuoriuscire gli oli essenziali che vengono quindi allontanati dal vapore sotto forma di microgocce (vapori aromatici). Nella fase di condensazione, parte di queste microgocce rimarranno nell'acqua (soprattutto i composti più pesanti) caratterizzando quelle che sono le "acque aromatiche" (Odello, 1990). Vista la grande quantità di composti differenti presenti nella matrice vegetale, è facile dedurre come il processo sia caratterizzato da flussi differenziati nel tempo delle diverse classi di composti (Atkins, 1997; Masango, 2005).

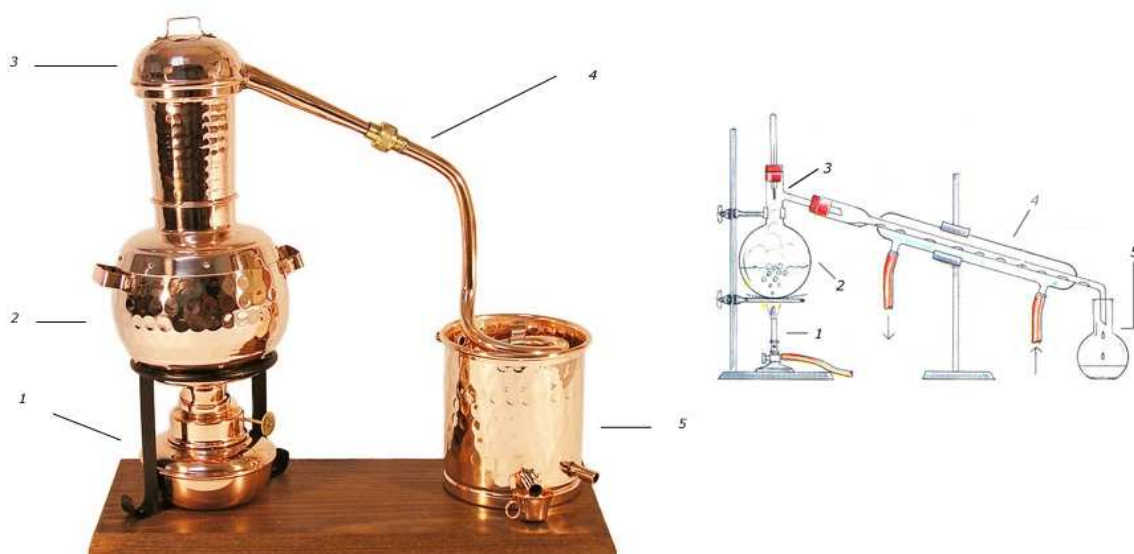


Figura 1.1.1 Schema di funzionamento di un distillatore in corrente di vapore; a sinistra un tipico alambicco da distillazione hobbistica; a destra lo schema di un distillatore da laboratorio nelle sue parti fondamentali.

I primi composti ad essere distillati sono ovviamente i più volatili (basso bollenti) e più facilmente allontanabili dalla pianta come i mono-terpeni per poi proseguire con i composti sempre più pesanti.

Questo processo viene influenzato in parte dalla struttura della pianta; è facile dedurre come nel caso della foglia di alloro (*Laurus nobilis*) il processo di rottura delle membrane cellulari sia più lento che nelle foglie di basilico (*Ocimum basilicum*) con conseguente prolungamento dei tempi di distillazione.

Il processo di distillazione inizia non appena il vapore acqueo comincia a condensarsi nel sedimentatore e termina dopo circa 3 ore, tempo in genere riconosciuto ottimale per l'estrazione delle essenze per uso galenico ma che può variare in funzione della specie vegetale utilizzata.

La durata del processo estrattivo rappresenta un parametro tecnologico non strettamente riconducibile alla pianta anche se questa può influenzare, in alcuni casi, anche consistentemente il processo.

Può quindi capitare che una sua eccessiva durata alteri la frazione volatile dell'olio essenziale, e che viceversa processi troppo brevi comportino la perdita di parte dello spettro chimico della composizione dell'olio per effetto della trattenuta meccanica da parte delle strutture vegetali (Spencer, 1992); in questi casi vengono messi in atto alcuni accorgimenti tecnici, come ad esempio la rottura meccanica delle strutture vegetali (Smallfield et al., 2001; Marotti e Piccaglia, 1992).

1.2 ANALISI CHIMICA

Gascromatografia e spettrometria di massa

Una volta ottenuto l'olio essenziale si procede alla purificazione dai residui acquosi con l'uso di solfato anidro, che ha la funzione di assorbire l'acqua presente nella soluzione e precipitare sotto forma cristallina.

Dopo l'allontanamento dal precipitato, in attesa dell'avvio del processo analitico l'olio viene conservato in frigorifero alla temperatura di 4°C ed al buio per rallentare i normali processi di decadimento qualitativo.

La Gascromatografia (GC) per la sua relativa economicità e velocità rappresenta la tecnica universalmente riconosciuta per l'analisi chimica degli oli essenziali. È una tecnica analitica che sfrutta la diversa ripartizione dei composti di una sostanza tra una fase mobile (gas carrier) ed una fissa (gel a base silicea); il gas attraversando il campione, vaporizzato da un iniettore, lo trasporta lungo la colonna capillare costituita da un sottilissimo tubo di silice fusa (fused silica open tubular columns, FSOT) di diametro pari a 0,20 millimetri e di 30 metri di lunghezza avvolto a spirale su un supporto metallico. La fase stazionaria è spalmata in maniera uniforme sulla superficie interna della colonna, dove forma un film di spessore costante che instaura dei legami di tipo secondario con i vari composti del campione riducendone la velocità.

Alla fine della colonna è posto un rilevatore che intercetta tutti i composti trasportati dal gas carrier. Esistono diversi tipi di rilevatori; uno tra i più utilizzati per l'analisi degli oli essenziali è il rilevatore a ionizzazione di fiamma (FID, Flame Ionization Detector) nel quale il gas di trasporto in uscita dalla colonna viene mescolato a idrogeno e ossigeno (aria), la cui miscela viene combusta da una fiamma; i vapori che ne scaturiscono vengono caricati elettricamente, per mezzo di un elettrodo posto all'uscita del gas, producendo ioni che vengono raccolti sulla superficie del detector (un anello di metallo sensibile); viene così generata una corrente elettrica che, amplificata, rappresenta il segnale del detector; la differenza tra il gas puro e quello contenente la sostanza separata rappresenta un picco.

Si ottiene così una rappresentazione grafica detta cromatogramma, individuata da un piano cartesiano che riporta alle ordinate una scala quantitativa in mV (milli volts) e alle ascisse il tempo (minuti) (Fig. 1.2.1).

Il primo picco riportato sul cromatogramma è sempre quello relativo al gas carrier, seguito dai composti più leggeri, generalmente i monoterpeni, e successivamente dai sesquiterpeni, vitamine e idrocarburi a lunga catena.

A causa della ridotta sensibilità del sistema, il semplice utilizzo della GC non può ritenersi soddisfacente per l'individuazione qualitativa dei composti; pertanto è necessario affiancare a questo strumento la spettrometria di massa (MS) che fornisce un'ottima analisi qualitativa anche se non quantitativa.

Questo sistema analitico si basa sui diversi rapporti tra massa e carica delle molecole di composto attraverso l'impiego di campi magnetici. Una volta magnetizzata la miscela dei composti (campione), le molecole ionizzate sono instabili e si frammentano in ioni più leggeri secondo schemi tipici in funzione della loro struttura chimica. Si ottiene così un grafico caratterizzato da diversi picchi, ognuno dei quali identifica un composto chimico (Fig. 1.2.2).

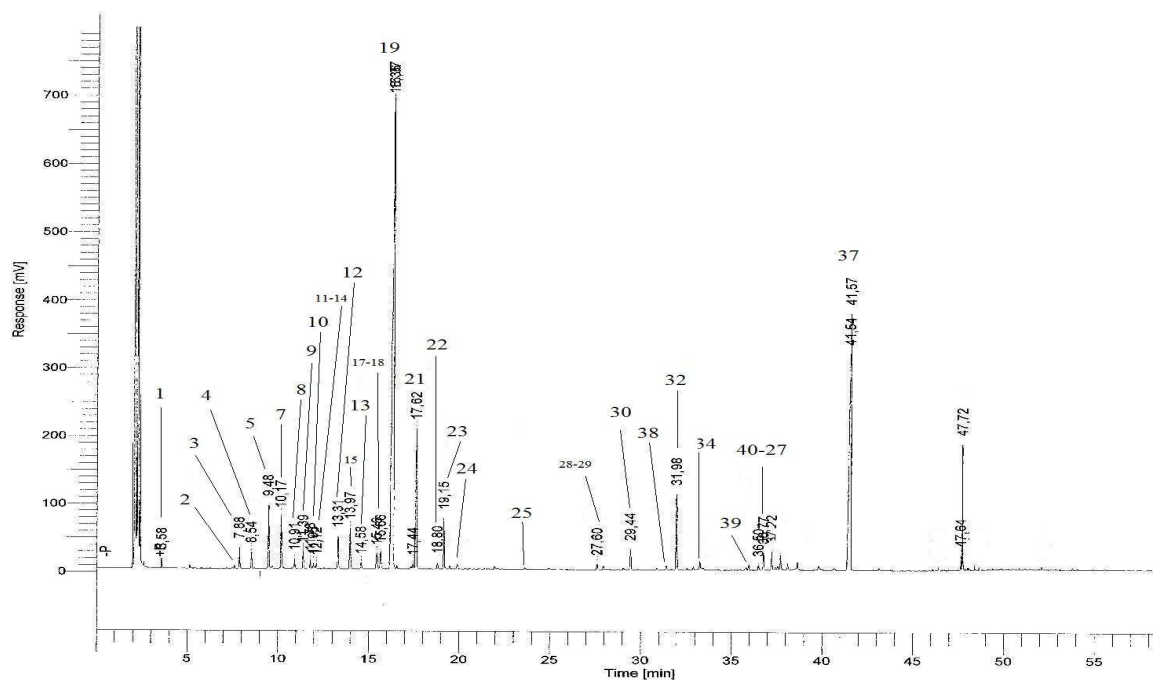


Figura 1.2.1 Gascromatogramma esemplificativo; ogni picco corrisponde al rilevamento di un composto chimico. In funzione del tempo e del posizionamento del picco nel diagramma è possibile individuare il composto chimico.

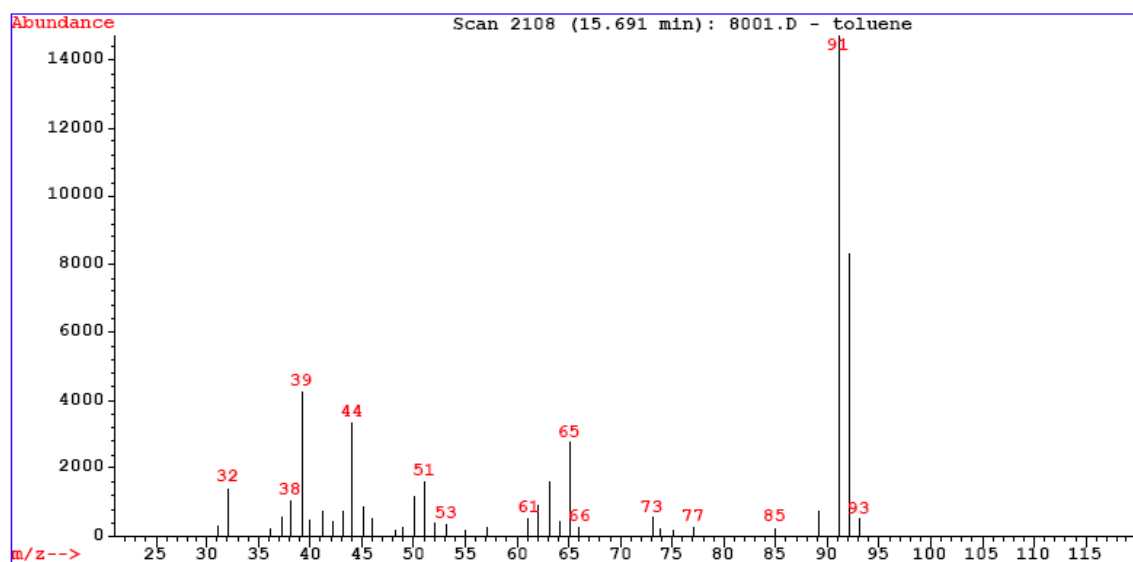


Figura 1.2.2 Spettrogramma esemplificativo. Ogni diagramma rappresenta un composto chimico riconoscibile attraverso la posizione e la dimensione di ogni picco.

1.3 FATTORI CHE INFLUENZANO LA COMPOSIZIONE CHIMICA

I fattori che possono influenzare la sintesi dei metaboliti secondari, e quindi la composizione qualitativa - quantitativa dell'olio essenziale, sono fortemente legati alle condizioni ambientali in cui la pianta vive, che si ripercuotono sulle condizioni di crescita e sviluppo, e quindi sul metabolismo secondario, della pianta stessa (Sangwan et al., 2001; Franz e Novak, 2010; Carrubba e Catalano, 2009a). Tra questi parametri troviamo per esempio l'umidità ambientale, la salinità della soluzione circolante nel suolo (Malik et al., 2009) e le temperature ambientale e del suolo. Livelli non ottimali di questi fattori possono portare la pianta a livelli di stress, in alcuni casi anche gravi, a volte tali da indurre la messa in atto di strategie adattative con chiare ripercussioni su tutto lo stato biochimico della pianta stessa (Muller-Riebau et al., 1997; Cseke e Kaufman, 2006). Soprattutto in condizioni sub-ottimali, comunque, l'ambiente di crescita gioca un ruolo poco chiaro; diversi autori hanno evidenziato la relazione tra stadio fenologico e la resa o la composizione dell'olio (Akhila et al., 1984; Chalchat et al., 1994; Gupta, 1996; Mallavarapu et al., 1999; Masotti et al., 2003; Chericoni et al., 2004; Mirjalili et al., 2007; Jerkovic et al., 2003) senza evidenziare alcun effetto dell'ambiente mentre altri confermano la relazione tra ambiente di crescita e composizione qualitativa dell'olio essenziale (Pala-Paul et al., 2001; Perez-Alonso et al., 2003; Gourine et al., 2010), individuando a volte un "polimorfismo chimico" (chemio-tipo) (Gourine et al., 2010, Salido et al., 2004).

Un altro fattore che influenza la composizione chimica è costituito dal tipo di cellule che effettuano la sintesi e di tessuti nel quale l'olio viene immagazzinato. Vari autori hanno evidenziato le differenze di composizione nell'olio essenziale delle diverse parti botaniche (Pooter et al., 2006; Fiorini et al., 1997; Velickovic et al., 2002; Nath et al., 1996; Kuate et al., 1999; Cseke e Kaufman, 2006), e sembra ormai accertato che una delle caratteristiche più importanti nell'accumulo dell'olio essenziale nella pianta è costituita dall'età e dalla tipologia del tessuto di accumulo (Sangwan et al., 2000; Franz e Novak, 2010).

La moltitudine di fattori che influenzano la composizione chimica dell'olio, in alcuni casi anche in maniera sostanziale, ha portato la comunità scientifica ad approfondire gli studi sulle condizioni ottimali di crescita delle varie specie e sull'effetto delle variazioni indotte dal chemiotipo, dal clima, dalle tecniche di coltivazione (Gilij et al., 2008; Carrubba e Catalano, 2009a), dall'età della pianta, dal terreno, ma anche dalla metodologia di estrazione e di conservazione (Morris et al., 2006; Chiasson et al., 2001).

2 ATTIVITÀ BIOCIDA DELLE PIANTE

Le piante definite “biocide”, si caratterizzano per la loro attività nei confronti di insetti (repellenti e/o attrattivi), di altre piante (allelochimici) o di varie altre avversità quali funghi (antimicotiche) e batteri (antibiotiche).

Questo tipo di piante viene generalmente utilizzato in due modi (Yang e Tang, 1988): attraverso l’impiego dell’estratto vegetale tal quale, o isolando la sostanza attiva, per poi identificarla e sintetizzarla chimicamente in modo da poterla commercializzare su vasta scala come prodotto *pronto all’uso*. Nella fase di sintesi chimica, la molecola attiva può essere modificata per migliorarne ulteriormente le performance; un esempio è offerto dal Piretro naturale (*Chrysanthemum cinerariaefolium*). L’estratto dei fiori del Piretro è stato uno dei primi insetticidi naturali ad essere usato su vasta scala, ed oggi il Piretro è uno dei prodotti più conosciuti ed utilizzati per la sua azione insetticida (Dharmagadda et al., 2005). La sua elevata fotolabilità, tuttavia, fa sì che la vita utile dell’estratto naturale non superi un paio di ore (Chermenskaya et al., 2007). L’ingegneria chimica ha così permesso la sintesi di prodotti simili (detti Piretroidi) caratterizzati da un’elevata resistenza alla fotoossidazione e quindi da una vita utile notevolmente più lunga.

Nel campo agronomico i fitofarmaci di origine naturale sono conosciuti relativamente da poco tempo, ma negli ultimi anni stanno vivendo un forte rilancio dovuto prevalentemente ai problemi di fitossicità riscontrati in numerose molecole di sintesi chimica, ai fenomeni di resistenza indotta nelle avversità e agli ovvi e conosciutissimi problemi di inquinamento ambientale. Anche in questo caso le famiglie botaniche esplorate sono poche, ed all’interno di esse solo poche specie sono state approfonditamente studiate; tra queste, le famiglie botaniche delle Lamiaceae (ex Labiate) e delle Asteraceae (ex Composite).

3 LA FLORA SPONTANEA SICILIANA D’INTERESSE BIOCIDA (COMPOSITAE)

La flora siciliana rappresenta un bacino di biodiversità di enorme interesse (Lentini e Venza, 2007). Una verifica incrociata tra le specie ad attività biocida più studiate nel mondo e le specie della flora spontanea siciliana permette una prima individuazione delle essenze ad attività biocida presenti nel territorio siciliano. Le famiglie maggiormente rappresentate sono le seguenti:

• Apiaceae	5 generi	(Foeniculum, Anethum, Apium, Pimpinella, Carum)
• Asteraceae	4 generi	(Artemisia, Chrysanthemum, Senecium, Tanacetum)
• Cruciferae	3 generi	(Brassica, Sisymbrium, Coriandrum)
• Labiatae	6 generi	(Lavandula, Thymus, Mentha, Origanum, Salvia, Rosmarinus)
• Liliaceae	2 generi	(Allium, Polygonatum)
• Fabaceae	1 genere	(Trigonella)
• Solanaceae	2 generi	(Solanum, Datura)
• Urticaceae	1 genere	(Urtica)
• Verbenaceae	2 generi	(Verbena, Lantana)

La famiglia più interessante tra quelle evidenziate, subito dopo quella delle Labiatae, è sicuramente quella delle Composite (ex Asteraceae) che racchiude il maggior numero di specie con riconosciuta attività insetticida sia ad azione repellente che letale (Pascual-Villalobos e Robledo, 1998 e 1999) e che nelle zone a clima temperato del pianeta rappresenta una delle famiglie più diffuse sia come piante coltivate che come essenze spontanee (Wang et al., 2006). All’interno della flora spontanea mediterranea, le Composite assumono un ruolo di primaria importanza rappresentando circa il 19% del totale delle specie siciliane spontanee d’interesse erboristico (Carrubba et al., 2009). Tra le specie biocide presenti nel territorio, quelle appartenenti alla famiglia delle composite coprono circa il 30% del totale.

4 IL GENERE ARTEMISIA

4.1 BOTANICA, MORFOLOGIA E DISTRIBUZIONE

Tra le composite, il genere *Artemisia* è rappresentato da più di 300 specie, anche se il numero varia molto a seconda degli autori (Torrel e Valles, 2001).

La maggior parte delle specie appartenenti al genere *Artemisia* sono perenni, mentre solo una piccola parte sono annuali e biennali (Valles e McArthur, 2001). Le foglie sono sia alterne che opposte, con una grande variabilità nelle dimensioni; i fiori possono essere penduli o eretti, di forma emisferica o cilindrica, con colori che vanno dal giallo cromo al bianco; l'impollinazione è prevalentemente anemofila, anche se alcune specie vengono visitate da molti insetti assicurando una certa percentuale d'impollinazione entomofila (Valles e McArthur, 2001).

La grande variabilità morfologica e chimica all'interno del genere è stata argomento di studio di alcuni genetisti che ne hanno studiato la filogenesi cercando di stabilire gli ancestrali del genere (Torrel e Valles, 2001; Valles e McArthur, 2001). Questi studi hanno permesso di dividere il genere in 4 sezioni distinte in base a precise caratteristiche morfologiche: *Artemisia*, *Absinthium*, *Dracunculus* e *Seriphidium*. All'interno di questa classificazione è stato operato un ordinamento su base cromosomica ($2n=18$; $2n=34$; $2n=38$; $2n=32$; $2n=48$; $2n=9$) (Fig. 4.1.1).

L'areale di origine dell'artemisia si localizza tra l'Europa centro-meridionale e le steppe cinesi, ma le diverse specie si sono diffuse abbondantemente su tutto l'emisfero continentale (Torrel e Valles, 2001; Valles e McArthur, 2001); *A. vulgaris*, ad esempio, sembra essersi originata nell'est dell'Asia (Wang et al., 2006), ma oggi è diffusa in tutta la fascia temperata del pianeta.

Il genere spazia in ambienti di crescita assai diversificati, dalle sabbie retrodunali alle più alte montagne iraniane (4000 m s.l.m.), dalle aree secche e semi-desertiche della Giordania alle aree umide e paludose della Francia (Valles e McArthur, 2001).

In Italia il genere è presente in modo discontinuo (Pignatti, 1982) e si comporta da ruderale, con preferenza per le aree ghiaiose del greto dei fiumi.

4.2 IL GENERE ARTEMISIA TRA MITO E FOLKLORE

Al genere *Artemisia* è collegato un gran numero di tradizioni e credenze popolari; il nome stesso deriva dalla dea Artemide, che secondo la mitologia donò questa pianta alle donne, per rendere il ciclo mestruale regolare e per aiutarle nei parti difficili; una genesi così aristocratica non può quindi che rendere il mito di questa pianta ricco di aneddoti. E' una pianta legata ai cicli lunari, e come la Luna induce l'abbassamento di veglia, così, l'absintina presente nei fiori di alcune specie, un principio amaro che in passato veniva usato come droga, provoca allucinazioni, delirio e a volte anche la morte. Già nel mondo greco-romano l'Artemisia era nota per la sua efficacia contro le convulsioni e le crisi epilettiche. Per comunicare con gli Dei, gli antichi Greci, mescolavano fiori di Artemisia con il grasso degli animali sacrificati, e il fumo che saliva al cielo era così profumato da essere gradito agli esseri superiori.

Nelle medicina popolare di varie parti d'Italia, la pianta veniva vietata alle puerpere, poiché dava un sapore sgradevole al latte materno.

Un vecchio detto dice: “*Chi porterà l'artemisia nel suo cammino non si sentirà mai stanco*”, infatti rametti di artemisia venivano usati come talismano contro la fatica e come amuleto dai viaggiatori. La pianta tuttavia

non protegge solo i viaggi fisici, ma offre la sua protezione anche durante i viaggi spirituali, per cui sarebbe opportuno bruciarne qualche rametto, durante le meditazioni.

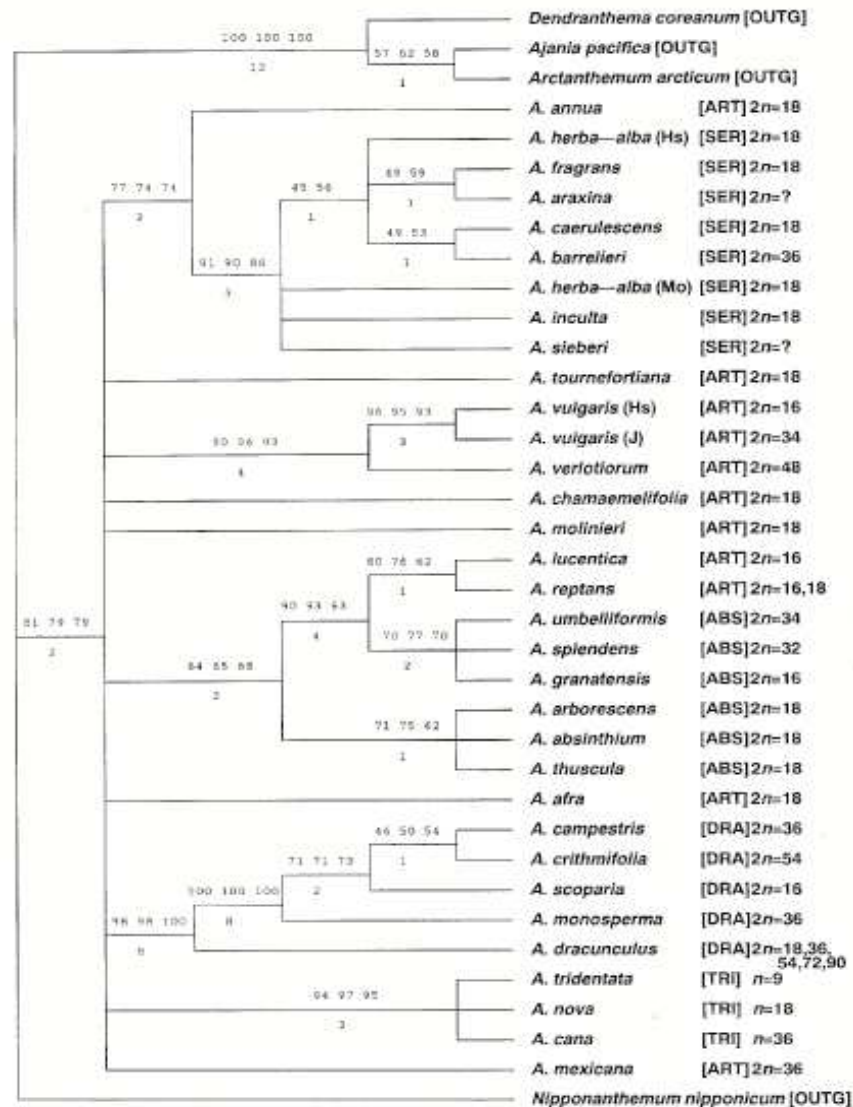


Figure 2—Cladogram showing the hypothetical ITS phylogeny of *Artemisia* (adapted from Torrell and others, 1999b). Consistency index excluding uninformative characters (CI) = 0.471; retention index (RI) = 0.740. Numbers above branches are bootstrap percentages and parsimony jackknife results: first, Lidén and others (1997) bootstrap method; second, Plunkett and others (1996) bootstrap method; third, parsimony jackknife values. Numbers below branches are decay indices. ART = Section/Subgenus *Artemisia*; SER = Section/Subgenus *Seriphidium*; ABS = Section/Subgenus *Absinthium*; DRA = Section/Subgenus *Dracunculus*; TRI = Section/Subgenus *Tridentata*; OUTG = Outgroup.

Figura 4.1.1. Schema filogenetico del genere *Artemisia* secondo Valles e McArthur (2001). Si nota la stretta parentela genetica tra *A. arborescens* e *A. absinthium*.

Alcune tradizioni prevedono che si intreccino corone di *Artemisia* per ornare il capo dei giovani, allontanare gli spiriti maligni e alleggerire il cuore con il dolce sentimento della contentezza.

Viene usata nei talismani di protezione contro le disgrazie e nei rituali per proteggere la fedeltà e la felicità coniugale. In alcuni paesi, nel giorno di ferragosto, gli sposi si regalano corone di artemisia per propiziare la fertilità. In quasi tutto l'oriente, con l'artemisia vengono confezionate figure magiche, che vengono appese fuori dalla porta per allontanare il male dalle case.

L'inchiostro veniva temperato con succo di *Artemisia*, per rendere la carta inattaccabile dalle tarme.

L'artemisia è inoltre una delle erbe di San Giovanni (24 Giugno); in tempi antichi faceva parte del mazzetto degli odori e veniva solitamente raccolta allo spuntare del giorno, camminando all'indietro.

L'artemisia si brucia insieme ad altre erbe per purificare ambienti e persone, e il fumo aspirato favorisce le visioni.

Fuori dal mito, invece durante la seconda guerra mondiale e nei periodi immediatamente successivi, nelle campagne siciliane, le foglie essiccate di *Artemisia arborescens* venivano utilizzate come sostituto economico ed artigianale del tabacco da fumo, apprezzandone anche le proprietà euforizzanti.

4.3 USI FARMACOLOGICI E INDUSTRIALI

Tutta la parte aerea delle piante appartenenti al genere *Artemisia* è ricca di oli essenziali che la rendono piacevolmente aromatica. Alcune specie, come *Artemisia abrotanum* L., *A. absinthium* L., *A. vulgaris* L., *A. dracuncululus* L. e *A. annua* sono usate come piante medicinali ed hanno di conseguenza un rilevante valore commerciale (Negahban et al., 2006a). *A. annua*, in particolare, è oggetto di grande interesse in quanto dotata di accertate e notevoli proprietà antimalariche (Ferreira et al., 2006), tanto che in più di 50 Paesi essa viene utilizzata come efficace rimedio di pronto soccorso contro la malaria clorochino-resistente. L'artemisinina, lattone sesquiterpenico responsabile di tale azione, non è stata finora ottenuta per via sintetica, e le piante di *A. annua* (allo stato spontaneo o coltivate) rappresentano quindi l'unica fonte conosciuta per l'approvvigionamento del principio attivo. Questo è noto ai cinesi da più di 2000 anni, tanto che se ne trovano notizie in una serie di rimedi medici rinvenuti in una tomba Han del III secolo a.C. Veniva utilizzato però genericamente per curare le febbri, senza una relazione precisa con la malaria. La sua fortuna recente risale al 1969, anno in cui l'esercito della Cina maoista riscontrò che gli estratti ottenuti dalla pianta possedevano un'eccellente efficacia contro la malaria; pochi anni dopo (1972) fu identificato il principio attivo, che venne denominato artemisinina. Il limite attuale è comunque rappresentato dalla bassa produzione di artemisinina nelle piante, che rende il costo dei farmaci derivati un po' più elevato rispetto a quello degli altri antimalarici.

Molte altre specie di *Artemisia* hanno mostrato attività antimalariche, antibatteriche, antinfiammatorie ed antitumorali, (Jacobson, 2008; Negahban et al., 2006; Wang et al., 2006). Alcuni studi sull'attività antimicotica hanno rivelato una buona efficacia d'azione ad esempio su funghi appartenenti ai generi *Candida*, *Botrytis* e *Penicillium* (Ameziane et al., 2007; Muyma et al., 2001); *Artemisia herba-alba* è stata impiegata come inibitore della riproduzione a sessuata dei funghi *Aspergillus niger* Tiegh, *Penicillium italicum* Wehmer e *Zygorrhynchus* sp (Negahban et al., 2006).

5 ARTEMISIA ARBORESCENS L.

5.1 BOTANICA, MORFOLOGIA E DISTRIBUZIONE

Artemisia arborescens L. è una pianta erbacea perenne, costituita da numerosi fusti semilegnosi di colore rosso scuro che possono raggiungere anche il metro di altezza, ramificati leggermente nella parte superiore e quasi per nulla in quella inferiore. L'apparato radicale rizomatoso è in grado di creare una fitta rete radicale che colonizza rapidamente ampi volumi di suolo.

Le foglie, pennate e di colore verde grigiastro per effetto della presenza di una peluria bianca che le ricopre, emanano un profumo piuttosto forte. Le infiorescenze sono caratterizzate da spighe composte di piccoli capolini color oro, che producono frutti costituiti da minuscoli acheni.

Per completare il suo ciclo vegetativo fino alla fruttificazione, la pianta richiede un fotoperiodo di 14-16 ore di luce. Il ciclo stagionale di *Artemisia arborescens* è caratterizzato da due flussi vegetativi, il primo primaverile in corrispondenza della ripresa vegetativa ed il secondo autunnale, molto breve, in corrispondenza delle prime piogge prima del freddo invernale. La pianta entra in stasi nel mese più caldo (agosto) e nei mesi più freddi (gennaio e febbraio), mentre la fioritura avviene nella tarda estate (tra giugno e luglio). L'impollinazione è prettamente anemofila, e allo stesso modo anche la disseminazione dei semi avviene ad opera del vento.

Presente in Europa prevalentemente nelle aree costiere del bacino del Mediterraneo (Fig. 5.1) è diffusa in Italia dal Nord fino al Sud su gran parte della costiera Tirrenica, si trova spesso nelle zone incolte, lungo i muri, nei campi, nei prati, tra le rovine e vicino le siepi (Pignatti, 1982).



Figura 5.1- Popolazioni naturali di *A.arborescens* studiate in Europa; Algeria (Abderrahim et al., 2010; Garcia et al., 2006); Calabria (Betto et al., 1988); Corsica (Garcia et al., 2006); Creta (Garcia et al., 2006); Francia (Garcia et al., 2006); Giordania (Zarga et al., 1995); Marocco (Pappas e Sheppard-Hanger, 2000); Sardegna (Lai et al., 2007, Marongiu et al., 2006, Sacco et al., 1983); Sicilia (Lo Presti et al., 2007, Militello et al., 2011); Spagna (Garcia et al., 2006); Tunisia (Glasl et al., 1999); Turchia (Garcia et al., 2006).

6 SCOPO DELLA RICERCA E ARTICOLAZIONE DEL LAVORO

Scopo di questo lavoro è stato quello di approfondire le conoscenze sul comportamento bio-agronomico di *A. arborescens* in coltivazione, sulla composizione chimica dell'olio essenziale e sulle sue possibili applicazioni in vari settori dell'industria agraria come pianta biocida.

Lo studio della pianta è stato pertanto strutturato in tre ambiti distinti: uno agronomico, uno fitochimico ed uno relativo all'attività biocida dell'olio essenziale.

In una prima fase sono state studiate le tecniche di messa in coltura della specie iniziando dallo studio di protocolli di propagazione per l'ottenimento di piantine ed in seguito valutando le performance produttive delle piante da seme o da talea. Lo studio dell'attività biocida è stato invece realizzato tramite diverse prove, ognuna pertinente ad un diverso settore industriale.

Il presente elaborato è stato diviso in due parti; la prima con una introduzione sulla problematica dei prodotti naturali di origine vegetale e sulla loro applicazione nel settore industriale delle piante biocide; la seconda parte, di tipo sperimentale, riporta le prove effettuate come paragrafi indipendenti presentati da una breve introduzione seguita dai materiali e metodi adottati e si conclude con i risultati ottenuti brevemente commentati.

La parte finale del lavoro riporta le conclusioni generali con i possibili spunti di ricerca che ne sono conseguiti. Le prove che sono già state pubblicate, in corso di pubblicazione o i cui dati sono parzialmente pubblicati, sono indicate nella parte iniziale del paragrafo afferente.

7 COMPOSIZIONE CHIMICA DELL'OLIO ESSENZIALE

M.Militello, M.A. Blazquez, A. Carrubba. 2011. *Artemisia arborescens* L.: effects of plant growth stage and distillation time on essential oil composition. Accepted by *JEOR* 2011 (*in press*).

7.1 INTRODUZIONE

La famiglia delle *Asteraceae* (ex *Compositae*), comprendente circa 23000 specie e 1300 generi, è per consistenza e diffusione una delle famiglie botaniche più importanti al mondo. Al suo interno, il genere *Artemisia* comprende un non ben determinato numero di specie; tra 200 e 400 a seconda dell'autore; (Depege et al., 2006), generalmente accomunate dall'utilizzazione in ambito farmaceutico o comunque nelle tradizioni popolari delle aree di diffusione naturale, e in maggioranza distribuite nella metà continentale dell'emisfero boreale (Salido et al., 2004), generalmente nelle aree secche (Kordali et al., 2005). La classificazione botanica delle specie del genere *Artemisia* è in alcuni casi complicata dall'esistenza di un'elevata somiglianza morfologica tra i diversi genotipi (Pignatti, 1982; Sinico et al., 2005; Abderrahim et al., 2010); sull'esempio di altri casi in cui la chemiotassonomia ha consentito di risolvere problemi di posizionamento sistematico di alcune specie (Depege et al., 2006; Hayat et al., 2009; Salido et al., 2004), alcuni autori hanno suggerito l'adozione della fitochimica come chiave di classificazione accessoria, considerando la chemio-tassonomia come marker del genere (Costa et al., 2009).

A. arborescens è la specie più rappresentata sul territorio siciliano ed è conosciuta per le sue proprietà contraccettive, antipiretiche, antisettiche, antielmintiche, toniche e diuretiche (Costa et al., 2009; Lamharrar et al., 2007; Hayat et al., 2009).

Nel caso specifico dell'*A.arborescens*, tuttavia, una forte variabilità chemiotipica è stata riscontrata anche a livello intraspecifico, suggerendo la definizione di tre diversi chemiotipi, denominati "tipo a camazulene" (American oil), "tipo a β -thujone" (Morocco oil) e "tipo a β -thujone/camazulene" (Pappas e Sheppard-Hanger, 2000; Marongiu et al., 2006; Lo Presti et al., 2007). Come evidenziato da diversi autori (Carrubba e Catalano, 2009; Franz e Novak, 2010; Sangwan et al., 2001; Angelopoulou et al., 2001), la composizione chimica dell'olio essenziale può essere influenzata da diversi parametri, quali lo stadio fenologico, l'ambiente di crescita (Perez-Alonso et al., 2003), l'età della pianta, l'andamento stagionale (Muller-Riebau et al., 1997; Gourine et al., 2010; Amin et al., 2008) e non ultima la tecnica di estrazione dell'olio stesso (Smallfield et al., 2001; Marongiu et al. 2010; Peng et al., 2004; Richter e Schellenberg, 2007) che può influire anche sull'attività biocida specifica (Maurya et al., 2009). Pochi, in questo senso, sono i lavori presenti in bibliografia sul genere *Artemisia*; tra le specie studiate, *A. pallens* (Mallavarapu et al., 1999) e *A. annua* in India (Haider et al., 2004), *A. molinieri* in Francia (Masotti et al., 2003) e *A.scoparia* in Iran (Mirjalili et al., 2007). Più limitate le informazioni su *A. arborescens*; è stato pertanto ritenuto utile uno studio orientato verso la delucidazione di alcuni aspetti fitochimici della specie, indirizzato verso:

- la caratterizzazione chimica di alcune popolazioni naturali;
- l'effetto dello stadio fenologico sulla composizione chimica dell'olio essenziale;
- l'effetto della durata del processo di estrazione per idrodistillazione sulla composizione chimica dell'olio essenziale.

7.2 MATERIALI E METODI

Siti di prelevamento

L'area interessata dai campionamenti, estesa per circa 100 kmq, ricade nella provincia di Palermo e risulta limitata al Nord dal Mar Tirreno e sugli altri tre lati da montagne con altitudine variabile dai 600 ai 1250 m s.l.m. In quest'area risulta evidente il contrasto tra una flora tipica del paesaggio antropizzato e quella naturale delle aree soggette a vincolo ambientale come la Riserva Naturale Pizzo Cane, Pizzo Trigna e Grotta Mazzamuto. Come descritto da Pignatti (Pignatti, 1982), *A. arborescens* si ritrova su tufi, rupi e nelle prossimità di vecchi insediamenti urbani; pertanto le prime fasi della ricerca hanno interessato un'area caratterizzata da una fitta rete viaria di vecchie mulattiere, strade intercomunali ed interpoderali limitrofe ad aree naturali. L'attività di ricognizione ha condotto all'individuazione di diverse popolazioni di *A.arborescens* tra le quali sono state selezionate solo quelle rappresentate da un numero di individui elevato (almeno 10) e con piante molto grandi e lignificate, caratteristiche che permettevano di concludere che la popolazione fosse presente da diversi anni. Sono stati selezionati 6 siti di prelevamento, identificati mediante le loro coordinate geografiche.

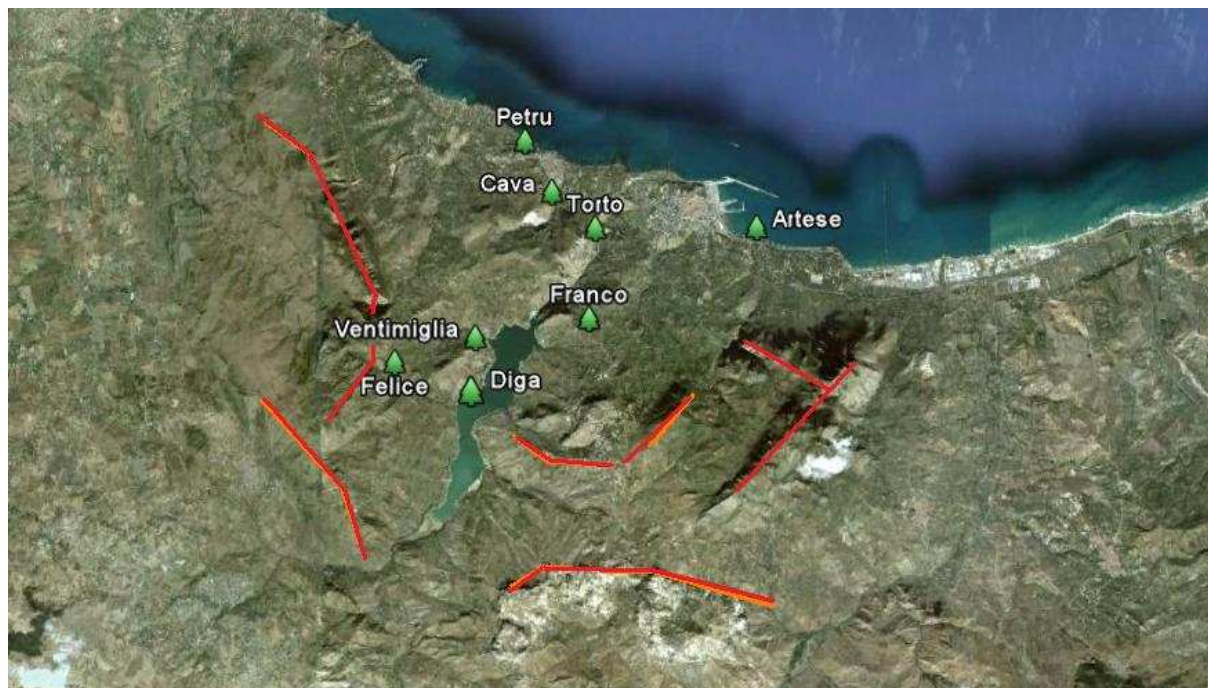


Figura 7.2.1- Area di campionamento di *A.arborescens*. L'area è delimitata per tre lati da sistemi montagnosi di altitudine compresa tra i 600 ed i 1250 m.s.l.m.

ARTESE	(N 37°58'28", E 13°44'13", 10 m s.l.m.);
TORTO	(N 37°57'53", E 13°46'30", 55 m s.l.m.),
PETRU	(N 37°59'46", E 13°38'53", 69 m s.l.m.);
DIGA	(N 37°57'23", E 13°39'05", 198 m s.l.m.),
VENTIMIGLIA	(N 37°56'39", E 13°36'37", 431 m s.l.m.);
FELICE	(N 37°56'44", E 13°36'38", 484 m s.l.m.);

In altri due siti inizialmente inclusi nello studio (Franco, N 37°57'22" - E 13°38'20, 184 m s.l.m. e Cava, N 37°59'04" - E 13°39'21", 134 m s.l.m.), la sperimentazione è stata interrotta a causa di incendi, presumibilmente di natura dolosa, che hanno distrutto le popolazioni soggette a campionamento.

Modalità di campionamento

Nel periodo compreso tra il settembre 2009 ed il luglio 2010, allorché le piante si trovavano in fase di stasi vegetativa, da ognuna delle stazioni individuate sono stati prelevati campioni di materiale vegetale (circa 1 kg di materiale fresco) rappresentativi dei popolamenti di partenza. In tre siti selezionati (TORTO, DIGA e VENTIMIGLIA) il campionamento è stato ripetuto in coincidenza della fase di piena fioritura (maggio-luglio 2010). I campioni prelevati nelle accessioni DIGA, TORTO e FELICE sono stati inoltre suddivisi nelle tre frazioni botaniche (steli, foglie e sommità fiorite), avviando le ultime due alla distillazione separatamente.

Distillazione in corrente di vapore

Il processo di estrazione è stato condotto con un Estrattore per oli essenziali prodotto dalla ditta Albrigi Luigi (Albrigi Luigi, Stallavena – VE; <http://www.albrigiluigi.com/prodotti/erboristeria/estrattore.html>), caratterizzato da un sistema di recupero delle acque aromatiche tale da massimizzare la resa in olio.

Allo scopo di verificare l'effetto della durata del processo sulla composizione dell'olio essenziale, su una parte dei campioni dell'intera pianta la distillazione è stata frazionata nel tempo, prelevando l'olio estratto dopo rispettivamente 30, 60, 120 e 180 minuti dall'inizio del processo di distillazione. I 4 oli ottenuti sono stati purificati dalla presenza di acqua mediante aggiunta di solfato anidro e conservati in frigo alla temperatura di 4°C prima di essere avviati all'analisi chimica.

Analisi chimica e riconoscimento dei composti

Allo scopo di evitare l'inconveniente della saturazione della colonna, determinata dall'elevata densità dell'olio essenziale di *A. arborescens*, il campione per l'analisi gascromatografica è stato preventivamente diluito con di-cloro-metano in rapporto 1:10.

L'analisi è stata condotta presso i laboratori del Dipartimento di Farmacologia della Facoltà di Farmacia dell'Università di Valencia (Spagna), utilizzando un dispositivo Clarus 500GC Perkin-Elmer dotato di rilevatore a ionizzatore di fiamma (FID), ed una colonna capillare Hewlett-Packard HP-1 (cross-linked

methyl silicone) lunga 30 m con un diametro interno di 0.2 mm e spessore della fase stazionaria pari a 0.25 mm. Il programma delle temperature previsto è stato di 60 °C per 5 min, con incrementi di 3 °C al minuto fino a 180 °C, e successivamente un incremento di 20 °C al minuto fino a 280 °C, temperatura mantenuta costante per 10 minuti. Il gas vettore utilizzato è stato l'elio (He) con un flusso di 1 ml/min. La temperatura del FID e della porta dell'iniettore è stata mantenuta a 250 °C e a 220 °C, rispettivamente. L'analisi spettrometrica è stata condotta con un Varian Saturn 2000 dotato di una colonna capillare Varian C.S VA-5MS lunga 30 m con un diametro interno di 0.25 mm i.d. e spessore della fase stazionaria di 0.25 mm. Il programma utilizzato è stato lo stesso del processo gascromatografico utilizzando lo "split mode injection" (rapporto di split sul flusso totale 1:25). Lo spettro è stato mantenuto entro un range di 28–400 m/z con un voltaggio di ionizzazione di 70 eV. I composti sono stati individuati sulla base degli spettri di massa ottenuti per comparazione degli stessi e degli indici di ritenzione con la bibliografia disponibile sia in formato software (NIST, 98) che cartaceo (Adams, 2007).

7.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

Caratterizzazione chimica

La composizione qualitativa e quantitativa dell'olio essenziale estratto da 5 popolazioni differenti di *A. arborescens* è riportata nella tabella 7.3.1, in cui risultati relativi ai diversi composti sono riuniti per gruppi fitochimici ed elencati in ordine crescente di eluizione in colonna cromatografica (RI: Retention index). Sono stati identificati 43 composti, nel complesso corrispondenti al 92-99% dell'olio estratto. Tra le diverse popolazioni non si evidenziano differenze significative riguardo alla composizione dell'olio dal punto di vista qualitativo, mentre è possibile individuare alcune differenze sotto il profilo quantitativo. Tutti gli oli ottenuti sono caratterizzati dalla predominanza della frazione monoterpica rispetto a quella sesquiterpica. La prima risulta essere composta in prevalenza dagli idrocarburi monoterpici (13) con una presenza variabile tra il 6.29 % ed il 15.74 %, mentre i monoterpici ossigenati, in totale 14, variano da un minimo del 37.45% al 65.04 %. Tra questi ultimi i maggioritari sono β -thujone (20.51 - 55.85 %), canfora (1.34 - 10.71 %), terpinen-4-olo (1.02 - 3.87%), α -terpineolo (0.46 - 2.47 %) e carvacrolo (0.14 - 1.60 %), mentre tra gli idrocarburi troviamo canfene, sabinene, β -pinene, mircene e γ -terpinene con un percentuale superiore all'1%. Come detto, la frazione sesquiterpica rappresenta circa un terzo della composizione totale, costituita da 13 composti dei quali il principale risulta essere il camazulene (15.23 - 49.41 %), seguito da germacrene-D (2.28 - 3.43 %) e β -cariofillene (0.63 - 0.89 %).

Come già riportato in bibliografia (Betto et al., 1988; Lo Presti et al., 2007; Lai et al., 2007; Biondi et al., 1993; Sacco et al., 1983; Pappas e Sheppard-Henger, 2000), i composti prevalenti e caratteristici risultano β -thujone e camazulene, la cui costante predominanza permette di confermarne il ruolo di markers dell'olio essenziale di *Artemisia arborescens* L.

Tabella 7.3.1 - Composizione chimica dell'olio essenziale *Artemisia arborescens* L.; analisi di 5 accessioni naturali di *A. arborescens* prelevate in un'area della Sicilia Nord Occidentale di circa 100 kmq isolata da montagne di altitudine variabile dai 600 a 1200 m.s.l.m. Sono stati individuati 43 composti, di cui 27 nella frazione monoterpenica e 13 in quella sesquiterpenica. E' possibile notare come i composti principali sono sempre β -thujone, chamazulene, canfora e germacrene D.

	COMPOSTI	RI _L	RI _C	PETRU [%]	Err. Std.	DIGA [%]	Err. Std.	FELICE [%]	Err. Std.	ARTE [%]	Err. Std.	VENTI [%]	Err. Std.
	Monoterpene Hydrocarbons			7.6		6.3		11.2		12.2		15.7	
1	<i>cis</i> -Salvene	856	856	0.1	0.0	0.1	0.0	0.1	0	t		t	
2	α -Thujene	930	930	0.2	0.0	t		t		t		t	
3	α -Pinene	939	938	0.9	0.0	0.3	0.0	0.6	0.3	1.0	0.3	0.8	0.1
4	Camphene	954	955	0.6	0.2	0.2		1.5		1.0	0.3	0.6	0.1
5	Sabinene	975	977	1.3	0.5	t		1.4	0.7	2.0	0.3	3.0	0.4
6	β -Pinene	979	979	t		1.4	0.2	0.2		0.1		t	
7	Myrcene	990	992	1.6	0.7	2.5	0.5	5.1	2.7	5.4	0.9	6.8	0.8
8	α -Phellandrene	1002	1009	t		0.2	0.0	0.1		0.2	0.0	0.2	0.0
9	α -Terpinene	1017	1020	0.4	0	0.4	0.1	0.5	0.3	0.5	0.2	1.2	0.3
10	<i>p</i> -Cymene	1024	1030	0.8	0.2	0.2	0.1	0.2	0.1	0.3	0.1	0.3	0.1
11	Limonene	1029	1034	t		t		0.2	0.1	0.3	0.1	0.2	0.0
12	γ -Terpinene	1054	1063	1.6	0.3	0.9	0.1	1.1	0.5	1.0	0.4	2.4	0.6
13	Terpinolene	1088	1089	0.3	0.1	0.1	0.0	0.3	0.2	0.4		0.3	0.1
	Oxygenated Monoterpenes			37.5		55.1		65.0		62.1		56.8	
14	1,8-Cineole	1031	1039	0.4	0.1	0.2	0.0	0.2	0.0	0.2	0.0	0.2	0.0
15	<i>cis</i> -Sabinene hydrate	1070	1077	1.3		0.9	0.2	1.2	0.5	2.3	0.3	2.6	0.3
16	<i>trans</i> -Sabinene-hybrate	1098	1100	t		t		t		t		t	
17	Linalol	1096	1106	1.5		t		t		t		t	
18	α -Thujone	1102	1111	0.9	0.3	1.0	0.2	1.5	0.3	0.8	0.0	0.5	0.0
19	β-Thujone	1114	1121	20.5	3.4	49.5	1.1	55.9	3.4	44.0	3.6	41.7	6.8
20	<i>cis-p</i> -Menth-2-en-1-ol	1121	1127	t		t		0.1	0.0	0.1		0.2	0.0
21	Camphor	1146	1155	8.4	1.1	1.3	0.4	2.3	1.4	10.7	3.1	6.5	2.1
22	Borneol	1169	1179	t		t		1.0		0.3		0.2	0.0
23	Terpinen-4-ol	1177	1186	1.0	0.3	1.2	0.1	1.8	0.2	1.5	0.5	3.9	0.8
24	α -Terpineol	1188	1192	2.5	0.1	0.5	0.0	0.7	0.2	0.5	0.1	0.7	0.0
25	Carvacrol	1299	1301	0.1		0.2				1.6	0.5	0.3	
26	Neryl isovalerate	1583	1584	t		t		t		t		t	
27	Geranyl isovalerate	1607	1609	0.8	0.2	0.3	0.1	0.2		0.2	0.1	0.2	0.0
	Sesquiterpene Hydrocarbons			53.9		30.1		19.7		19.4		21.7	
28	α -Copaene	1376	1378	0.4									
29	β -Bourbonene	1388	1388	0.2	0.0	0.3	0.1	0.3	0.1	0.2	0.0	0.2	0.0
30	β -Caryophyllene	1419	1422	0.6	0.1	0.9	0.1	0.8	0.3	0.7	0.1	0.8	0.1
31	α -Humulene	1454	1454	t		t		t		t		t	
32	Germacrene D	1484	1484	2.8	0.3	3.4	0.7	3.1	0.2	2.4	0.3	2.3	0.1
33	Bicyclgermacrene	1500	1500	t		0.1	0.0	0.1		0.1		t	
34	α -Farnesene	1505	1507	0.5	0.1	0.4	0.1	0.1	0.0	0.2		t	
35	Calacorene isomer		1516	t		t		t		t		t	
36	δ -Cadinene	1523	1526	t		t		t		t		t	
37	Chamazulene	1731	1744	49.4	8.6	24.9	2.2	15.2	3.8	15.7	2.5	18.5	1.6
	Oxygenated Sesquiterpenes			0.2		0.4		0.4		0.4		0.3	
38	Dehydro-Sesquicineole	1471	1471	t		0.1	0.0	0.2	0.1	0.1		0.2	0.0
39	Germacrene D-4-ol	1575	1580	t		t		t		t		t	
40	Caryophyllene oxide	1583	1592	0.2		0.3	0.0	0.3		0.3	0.0	0.2	
	ALTRI			t		0.3		0.9		0.6		0.8	
41	6-Methyl-5-hepten-2-one	985	986	t		t		t		t		t	
42	Methyl butyl-2-methyl butyrate	1100	1104	t		0.3	0.1	0.9	0.2	0.6	0.1	0.8	0.1
43	Methyl eugenol	1403	1404	t		t		t		t		t	
				99.1		92.1		97.3		94.7		95.4	

Effetto della fase fenologica

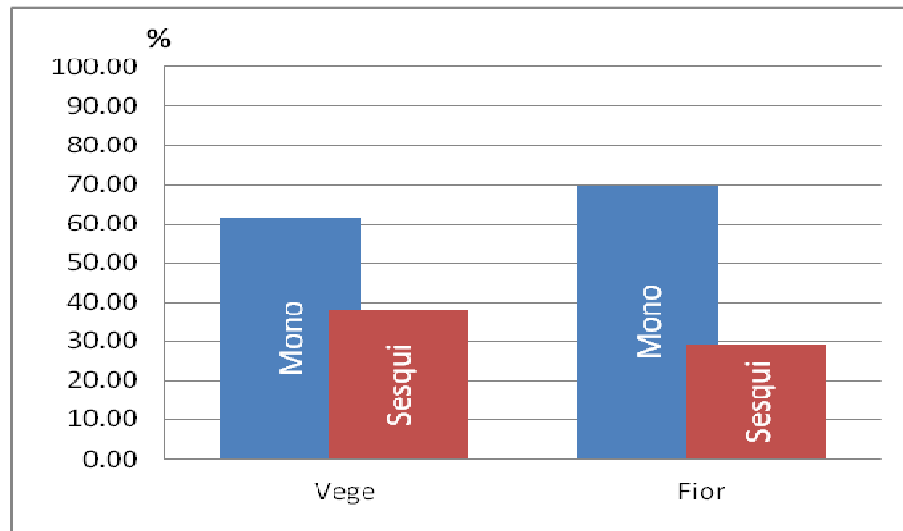
La composizione chimica dell'olio essenziale ottenuto da piante raccolte nelle due fasi fenologiche di stasi vegetativa e piena fioritura viene riportata in tabella 7.3.2, in cui i 36 costituenti individuati (corrispondenti a circa il 95% della composizione totale dell'olio essenziale) vengono elencati in ordine crescente di RI. Le due composizioni risultano molto simili, con β -thujone, camazulene, canfora e germacrene D come composti principali. Nel passaggio dallo stadio vegetativo a quello di piena fioritura, tuttavia, la frazione monoterpenica aumenta da 61.80% al 69.01%. I composti più importanti appartenenti a questo gruppo sono β -thujone (33.37% - 42.58%) e canfora (7.45% - 5.49%).

Tabella 7.3.2- Composizione chimica dell'olio essenziale di *Artemisia arborescens* L.; effetto della fase fenologica sulla composizione analitica. Si può notare l'aumento percentuale della frazione monoterpenica in occasione della piena fioritura.

COMPOSTI	Stadio Vegetativo	Err. Std.	Fioritura	Err. Std.
Monoterpene Hydrocarbons	9.6 %		11.8 %	
<i>cis</i> -Salvene	0.1	0.0		
α -Thujene	0.1	0.0	0.2	
α -Pinene	0.7	0.1	0.7	0.1
Camphene	0.7	0.1	0.8	0.2
Sabinene	2.3	0.4	2.0	0.3
β -Pinene	0.1	0.0	0.6	0.3
Myrcene	2.4	0.2	4.5	1.1
α -Phellandrene	0.2	0.1	0.2	0.0
α -Terpinene	0.6	0.0	0.7	0.1
<i>p</i> -Cymene	0.4	0.1	0.4	0.1
Limonene	0.2	0.1	0.2	0.0
γ -Terpinene	1.4	0.1	1.4	0.3
Terpinolene	0.4	0.2	0.3	0.0
Oxygenated Monoterpenes	46.3 %		56.7 %	
1,8-Cineole	0.2	0.0	0.3	0.1
<i>cis</i> -Sabinene hydrate	0.9	0.3	1.7	0.3
Linalool	0.3	0.0	1.5	0.1
α -Thujone	0.6	0.1	1.0	0.2
β -Thujone	33.4	4.6	42.6	6.1
<i>cis-p</i> -Menth-2-en-1-ol	0.1	0.0	0.1	0.0
Camphor	7.5	0.9	5.5	2.0
Borneol	0.3	0.1	0.4	0.1
Terpinen-4-ol	1.8	0.2	1.9	0.5
α -Terpineol	0.2	0.0	1.0	0.4
Carvacrol	0.7	0.3	0.4	
Geranyl isovalerate	0.3	0.0	0.3	0.1
Sesquiterpene Hydrocarbons	33.7 %		29.3 %	
α -Copaene	0.7	0.3	0.6	0.3
β -Bourbonene	0.2	0.0	0.4	0.1
β -Caryophyllene	1.2	0.2	0.2	0.0
α -Humulene	0.2	0.0	0.7	0.1
Germacrene D	3.6	0.5	2.8	0.2
Bicyclogermacrene	0.1	0.0	0.1	0.0
α -Farnesene	0.2	0.0	0.3	0.1
Chamazulene	28.1	3.6	24.4	6.6
Oxygenated Sesquiterpenes	0.4 %		0.4 %	
Dehydro-Sesquiceneole	0.2	0.0	0.2	0.0
Caryophyllene oxide	0.2	0.0	0.2	0.0
ALTRI	0.5 %		0.6 %	
Methyl butyl-2-methyl butyrate	0.5	0.1	0.6	0.1

La frazione sesquiterpenica, i cui costituenti principali sono camazulene (28.11% - 24.35%) e germacrene D (3.58% - 2.80%) parallelamente passa da 34.66% a 29.14% (Grafico 7.3.1). La variazione della composizione a favore della frazione monoterpenica in fase di fioritura è ampiamente giustificata dalla fisiologia vegetale, poiché la maggior parte delle sostanze attrattive emesse dalle piante in questa fase sono sostanze monoterpeniche volatili (Sangwan et al., 2001; Franz e Novak, 2010; Muller-Riebau et al., 1997; Masotti et al., 2003; Mirjalili et al., 2007; Mallavarapu et al., 1999; Amin et al., 2008).

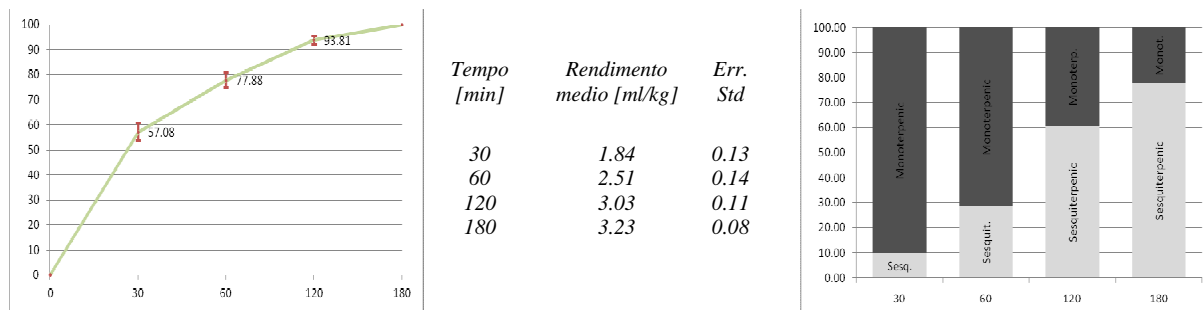
Grafico 7.3.1- Composizione Chimica di Olio essenziale di *Artemisia arborescens*; variazione delle frazioni mono e sesquiterpeniche in funzione delle diverse fasi fenologiche; Vege = stadio vegetativo, Fior = Piena Fioritura. La frazione monoterpenica risulta sempre superiore alla sesquiterpenica, probabilmente perchè nella frazione monoterpenica sono presenti tutti quei composti volatili che conferiscono l'odore alla pianta e che possono assumere la funzione di attrattivi/repellenti.



Durata della distillazione

Circa il 90% (77-94%) dell'olio complessivamente estratto si ottiene tra i 60 ed i 120 minuti, con un leggero incremento (appena il 6%) negli ultimi 60 minuti (tabella 7.3.3). Il rapporto tra frazione mono e sesquiterpenica durante il processo di distillazione varia consistentemente. Nei primi minuti del processo l'olio è costituito quasi interamente dalla frazione più volatile, cioè quella monoterpenica, mentre con l'avanzamento del processo l'olio si va arricchendo della frazione sesquiterpenica (più pesante) e soprattutto di camazulene. Quest'ultimo, va ricordato essere un artefatto della distillazione, in quanto non esiste in natura come tale ma si forma a partire da specifici precursori durante il processo di estrazione grazie al calore ed al pH acido. (D'Ischia, 2002).

Tabella 7.3.3 – Composizione chimica di olio essenziale di *Artemisia arborescens* L.; effetto del tempo di distillazione; A sinistra: Il rendimento percentuale in olio essenziale subisce un incremento sostanziale fino a 120 minuti dall'inizio del processo di distillazione (+93.8%), successivamente l'incremento percentuale risulta molto ridotto (+ 6.2 %). A destra: la composizione chimica dell'olio essenziale risulta variare sostanzialmente durante il processo di distillazione. Nei primi minuti 60 minuti del processo l'olio risulta essere caratterizzato da una ricca frazione monoterpeneica a scapito di quella sesquiterpenica; il fenomeno si inverte negli ultimi 60.



La composizione complessiva e la sua variazione dettagliata è riportata in tabella 7.3.4. L'effetto del tempo di distillazione sulla resa in olio può venire facilmente spiegato considerando la tecnica del processo di estrazione; a dei consistenti livelli iniziali seguono lievissimi incrementi dovuti alla maggiore difficoltà da parte del sistema ad estrarre dalla matrice vegetale le quantità d'olio residue, fino all'esaurimento del processo (Smallfield et al.2001, Marotti e Piccaglia, 1992). Anche dal punto di vista qualitativo l'effetto dei differenti tempi di distillazione trova spiegazione nel fatto che i composti più volatili, più facilmente trasportabili dal vapore acqueo, sono i primi ad essere allontanati dalla matrice vegetale.

In base ai risultati ottenuti, sia dal punto di vista quantitativo che qualitativo, si può affermare che il tempo ottimale di distillazione per l'*Artemisia arborescens* è compreso tra 120 ed 180 minuti.

Frazione botanica

La composizione chimica delle due parti botaniche selezionate, foglie e sommità fiorite (tabella 7.3.5), non ha evidenziato variazioni di tipo qualitativo; anche in questo caso i composti prevalenti sono stati β -thujone, camazulene, canfora e germacrene D. Camazulene e canfora hanno espresso valori uniformi nei fiori e nelle foglie, mentre β -thujone e germacrene D sono stati riscontrati in quantità differenti nelle due frazioni: il β -thujone, presente nelle foglie per il 16.07 %, nei fiori passa al 28.21%, mentre il germacrene D si trova in maggiore quantità (4.78 %) nelle foglie e in percentuale più ridotta (2.98 %) nei fiori.

Tabella 7.3.4- Composizione chimica di olio essenziale di *Artemisia arborescens* L.; effetto della durata del processo di distillazione sulla composizione analitica dell'olio essenziale. E' possibile notare come i composti monoterpenici quali β -thujone e canfora si riducano a favore dei composti sesquiterpenici come germacrene D e chamazulene.

COMPOSTI	30'	Err. Std.	60'	Err. Std.	120'	Err. Std.	180'	Err. Std.
<i>cis</i> -Salvene			0,08	0,01				
α -Thujene	0,40	0,04	0,32	0,20	0,12	0,01		
α -Pinene	2,75	0,17	0,86	0,06	0,34	0,03	0,18	0,01
Camphene	1,97	0,17	1,02	0,10	0,40	0,02	0,21	0,00
Sabinene	18,24	9,01	6,02	1,33	1,98	0,40	1,07	0,30
β -Pinene	0,23	0,03	0,10	0,00				
Myrcene	9,28	0,69	5,72	0,57	2,34	0,34	1,08	0,15
α -Phellandrene			0,15	0,02	0,15	0,01	0,10	0,00
α -Terpinene	1,32	0,08	1,03	0,10	0,58	0,07	0,29	0,06
p-Cymene	0,47	0,05	0,89	0,06	0,28	0,05	0,18	0,01
Limonene	0,65	0,07	0,30	0,03	0,11	0,01	0,06	0,00
γ -Terpinene	3,65	0,18	3,45	0,20	1,80	0,17	0,87	0,07
Terpinolene	0,50	0,03	0,31	0,07	0,29	0,08	0,22	0,02
1,8 Cineole	0,25	0,02	0,12	0,01				
<i>cis</i> -Sabinene hydrate	2,21	0,39	0,84	0,02				
Methyl butil 2 methyl hydrate	1,31	0,01	1,49	0,23	0,73	0,04	0,40	0,06
α -Thujone			0,60	0,02	0,28	0,02	0,14	0,01
β-Thujone	43,23	0,81	34,05	1,15	18,08	0,77	8,32	0,62
Menth-2-en-1-ol			0,05	0,00				
Camphor	10,30	3,67	10,36	1,63	6,38	0,92	4,47	2,36
Borneol			0,16	0,02				
Terpinen-4-ol	2,88	0,24	2,08	0,55	1,48	0,29	1,16	0,60
α -Terpineol	0,25	0,03	0,35	0,02	0,23	0,06	0,16	0,02
Carvacrol			2,63	0,17	1,44	0,15	0,90	0,01
Geranyl isovalerate			0,34	0,02	0,60	0,03	0,62	0,05
α -Copaene			0,09	0,00	0,26		0,19	0,01
β -Bourbonene	0,32	0,01	0,43	0,03	0,28	0,03	0,21	0,01
β -Caryophyllene	1,21	0,03	2,42	0,37	1,70	0,39	1,79	0,33
α -Humulene			0,21	0,00	0,30	0,05	0,17	0,01
Germacrene D	2,88	0,11	3,92	0,29	3,49	0,48	3,07	0,50
Bicyclgermacrene			0,18	0,01	0,16		0,14	0,01
α -Farsene			0,19	0,01	0,20		0,15	0,00
Chamazulene	6,18	1,69	21,09	5,03	50,30	3,25	65,30	1,16
Caryophyllene oxide	0,26	0,03	0,45	0,02	0,52	0,03	0,58	0,02

Tabella 7.3.5- Composizione chimica olio essenziale di *Artemisa arborescens* L.; Nei fiori troviamo un maggior e presenza di monoterpeni, mentre nelle foglie troviamo una composizione maggiormente ricca di sesquiterpeni.

COMPOSTI	IK	Foglie	Fiori	P.Intera
<i>cis</i> -Salvene	856	t	0.03	t
α -Thujene	930	t	0.10	t
α -Pinene	939	0.46	0.79	0.72
Camphene	954	0.64	0.94	0.78
Sabinene	975	1.45	2.20	2.61
β -Pinene	979	t	t	t
Myrcene	990	2.18	2.56	t
α -Phellandrene	1002	0.45	0.13	t
α -Terpinene	1014	0.23	0.67	0.90
<i>p</i> -Cymene	1024	t	0.25	t
Limonene	1029	0.25	0.28	0.22
1,8 Cineole	1031	t	t	0.13
γ -Terpinene	1054	1.18	1.39	1.04
<i>cis</i> -Sabinene hydrate	1070	t	0.42	0.82
Linalol	1096	t	t	t
Terpinolene	1088	0.16	0.22	0.20
Methyl butil 2 methyl hydrate	1100	0.64	1.33	2.40
α -Thujone	1102	0.28	0.53	0.81
β -Thujone	1114	16.07	28.21	37.68
Camphor	1146	10.27	9.52	10.55
Borneol	1169	t	0.13	t
Terpinen-4-ol	1177	1.70	1.70	2.02
α -Terpineol	1188	t	0.14	0.24
Bornyl acetate	1288	t	0.20	t
Carvacrol	1299	0.55	2.44	0.26
α -Copaene	1376	0.51	t	t
β -Bourbonene	1388	0.35	0.22	t
β -Caryophyllene	1419	2.29	1.42	1.08
α -Humulene	1454	0.17	t	t
Dehydro- Sesquicineole	1471	0.22	0.16	0.17
Germacrene D	1484	4.78	2.98	2.00
α -Farsene	1505	0.26	0.61	0.13
Caryophyllene oxide	1583	0.37	0.25	t
Geranyl isovalerate	1607	0.49	0.43	0.20
Chamazulene	1731	35.59	32.86	22.17
totale		84.19	91.96	92.13

8. PROPAGAZIONE GAMICA – GERMINABILITA' DEL SEME

8.1 INTRODUZIONE

Il processo d'impovertimento della flora spontanea avviato già da parecchi decenni sia per cause antropiche che naturali ha portato alla ribalta, soprattutto in questi ultimi anni, il problema della salvaguardia ambientale, in particolare per quanto riguarda il ripristino delle aree percorse da incendi o soggette a dissesto idro-geologico. A tal fine, le moderne tecniche di ingegneria ambientale si prefiggono l'obiettivo del risanamento ambientale tramite l'utilizzazione di specie vegetali autoctone che possano insediarsi rapidamente garantendo, in termini di uniformità e compattezza della vegetazione, un risultato ottimale in poco tempo (Bussotti et al., 2005, Cervelli et al., 2008). Gli ecotipi locali presentano infatti caratteristiche di adattabilità a condizioni ambientali specifiche che sono il risultato dell'azione di selezione naturale vissuta localmente, che individui selezionati in aree diverse, pur se appartenenti allo stesso areale, talvolta non possiedono (Di Gregorio et al., 2010).

Gli ecotipi, pertanto, rivestono un ruolo importantissimo (anche economico) perché possiedono le migliori caratteristiche di vigore e di resistenza alle avversità presenti in una determinata area. Le forme di adattamento all'ambiente messe in atto dalle piante superiori sono molte e diverse. Negli ambienti mediterranei, caratterizzati da condizioni di aridità pedologica e climatica di varia gravità, le strategie adattative messe in atto dalle piante sono fondamentalmente due. La prima, detta strategia di 'resistenza', viene attivata dalla pianta per evitare l'insorgere di stress; la seconda, definita strategia di 'tolleranza', è costituita invece da una serie di adattamenti che permettono alla pianta di svolgere normalmente le sue funzioni vitali anche in situazioni di carenza idrica. Strategie di resistenza sono ad esempio la caduta delle foglie, la riduzione dell'apparato vegetativo e la riduzione della traspirazione per mezzo della chiusura stomatica, mentre le strategie di tolleranza sono rappresentate ad esempio dai vari meccanismi di opposizione alla disidratazione attraverso l'attivazione di processi biochimici che aumentano il potenziale osmotico delle cellule.

Una caratteristica adattativa comune alla maggior parte delle piante mediterranee è la presenza di un apparato radicale esteso e profondo, che, come nel caso di *A. arborescens*, consente di assorbire acqua dal suolo anche in condizioni di forte aridità (Bussotti et al., 2005). In questo modo le piante riescono a svolgere la fotosintesi anche in presenza di potenziali idrici nelle foglie fortemente negativi, parametro questo verificato, per *A. arborescens*, in una prova effettuata ed ancora in corso (dati non pubblicati).

Il seme costituisce lo strumento principale di conservazione della specie. Esso infatti, rappresentando una nuova combinazione genetica, è in grado di garantire quella variabilità all'interno della specie che è alla base di un adattamento graduale all'ambiente che cambia.

I semi possono essere definiti come organismi in condizioni di stasi, capaci di rimanere in questo stato fino a quando non si realizzino le condizioni favorevoli alla germinazione, che può avvenire anche dopo molto

tempo. Il processo di germinazione è controllato da fattori sia esterni al seme (ambientali) che interni (genetici).

Tra i fattori esterni, oltre all'acqua, uno dei più importanti è la temperatura; questa regola lo svolgimento dei processi biochimici, che difatti avvengono entro intervalli termici spesso ristretti; determinante è anche la luce, così che alcuni semi germinano solo al buio e altri germinano solo alla luce, mentre una terza categoria comprende semi detti 'fotoindifferenti' perché non influenzati dalla luce. Di norma, semi molto piccoli tendono ad emergere in presenza di luce, poiché la ridotta quantità di endosperma presente è in genere insufficiente a garantire un'adeguata crescita in pre-emergenza, e il seme esaurisce le sue riserve prima di essere riuscito a guadagnare la superficie (Baldoni e Benvenuti, 2001; Benvenuti, 2010). Altro parametro esterno molto importante è la presenza di ossigeno, che risulta strettamente legata all'umidità poiché un terreno mediamente umido rappresenta la condizione ideale per la germinazione, mentre se la quantità di acqua presente è troppo elevata, si determina una saturazione della porosità del suolo, con conseguente diminuzione dell'ossigeno (Baldoni e Benvenuti, 2001).

Fra i fattori interni, particolarmente importante è la dormienza. Viene così definito uno stato di riposo del seme, dovuto a cause fisiche e/o fisiologiche intrinseche, che impedisce lo sviluppo di un nuovo individuo anche in condizioni ambientali favorevoli ad una crescita attiva (Baldoni e Benvenuti, 2001a). Un particolare tipo di dormienza è legato ad esempio alla presenza di una "barriera", identificabile nei tegumenti, che può determinare una resistenza meccanica variabile da seme a seme, oppure impedire l'assorbimento dell'acqua o gli scambi gassosi con l'esterno; in altri casi tali barriere sono di tipo chimico, in quanto particolari sostanze (inibitori) impediscono l'attivazione del processo di germinazione. La presenza di una dormienza del seme più o meno marcata è molto frequente nelle specie spontanee, in cui rappresenta un importante meccanismo di regolazione dell'abbondanza e della dinamica della specie, soprattutto in ambienti instabili (Baldoni e Benvenuti, 2001). Tecniche tendenti a facilitare la germinazione dei semi e la micropropagazione sono state studiate con un buon grado di dettaglio su diverse specie di *Artemisia*, come *A. frigida* Willd. (Bai et al., 1995), *A. tridentata* Nutt. (Alvarez-Cordero e McKell., 1979; Young e Evans, 1975); *A. genipi* Weber e *A. umbelliformis* Lam. (Anon., 2004), *A. judaica* L. (Liu et al., 2004), *A. vulgaris* L. (Govindaraj e Bollipo, 2007; Govindaraj et al., 2008; Sujatha e Ranjitha Kumari, 2008); *A. annua* L. (Liu et al., 1998; Fulzele et al., 1995) e *A. absinthium* L. (Zia et al., 2007). Non sono invece disponibili informazioni specifiche sulla biologia dei semi di *A. arborescens*, anche se alcuni autori (Piotto e Di Noi, 2001) estendono a tutto il genere *Artemisia* condizioni ideali di germinazione rappresentate da un'alternanza termica giornaliera di +30/+20°C (giorno/notte). *A. arborescens*, diffusa in natura su litorali sassosi e pendici rocciose, viene classificata tra le specie a spiccato carattere xerofita, in cui le condizioni generalmente limitanti delle aree di vegetazione naturale inducono spesso la messa in atto di meccanismi di adattamento tali da consentire il processo di germinazione solamente nelle condizioni di temperatura, illuminazione e umidità più favorevoli. Sembrerebbe pertanto plausibile l'esistenza di meccanismi di dormienza dei semi tali da aumentare le possibilità di sopravvivenza della specie. In numerose specie congeneri (*A. absinthium*, *A. dracunculus*, *A. maritima*, *A. vulgaris*) tali fenomeni non sono stati riscontrati (Piotto e Di Noi, 2001); in considerazione dell'elevata variabilità morfologica e genetica all'interno del genere *Artemisia*, tuttavia, l'ipotesi di un comportamento diverso da parte di *A. arborescens* non può venire esclusa.

Obiettivo di questa linea di sperimentazione è stato quindi quello di studiare i principali parametri di germinazione e accrescimento della specie, circoscrivendone l'interesse alla verifica della presenza di barriere fisiologiche in grado di ostacolare la normale germinazione dei semi.

8.2 MATERIALI E METODI

Materiale vegetale

La prova, effettuata nei mesi di ottobre e novembre 2009 presso i laboratori del Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura (C.R.A.), sez. di Bagheria, è stata condotta in via preliminare per individuare alcune condizioni ambientali idonee per la germinazione del seme di *Artemisia arborescens*.

I semi sono stati prelevati nel mese di settembre dello stesso anno da una pianta madre appartenente ad una popolazione naturale nella costa nord-occidentale della Sicilia (38°06'47.74" N, 13°31'16.38" E, 31 ms.l.m.). Una volta estratti dalle strutture fiorali (capolini), i semi sono stati raggruppati in base alle dimensioni ed al colore, selezionando i semi più grandi e con colorazione uniforme e tendente al marrone scuro, e scartando invece i semi troppo piccoli e che presentavano colorazione disomogenea dal verde al bianco. Dopo le operazioni di cernita, i semi sono stati conservati al buio a temperatura ambiente all'interno di capsule Petri sigillate.

Semina e germinazione

La prova è stata condotta con lo scopo di verificare l'effetto sulla germinabilità del seme di diverse temperature ambientali e di due condizioni di luminosità.

Sono state utilizzate delle capsule Petri monouso del diametro di 10 cm, al cui interno è stato posto un disco di carta assorbente imbibito con acqua distillata, sulla quale sono stati posizionati 20 semi di *A. arborescens* selezionati in base ai criteri sopra detti.

Al di sopra dei semi è stato posto un secondo disco di carta assorbente imbibito con acqua distillata ed infine la piastra è stata sigillata con del Parafilm® (Meyer e Monsen, 1991).

Per valutare l'effetto della luce, accertando così se la germinazione in natura viene favorita da condizioni di scopertura o interrimento del seme, sono state messe a confronto due tesi, la prima prevedente l'esposizione dei semi ad un fotoperiodo 18/6 (luce/buio) e la seconda sottoposta a totale oscurità.

Per valutare invece l'effetto della temperatura i semi sono stati esposti a temperature crescenti da 5°C fino a 30°C, con incrementi successivi di 5 °C ciascuno (5 °C ±1; 10 °C ±1; 15 °C ±1; 20 °C ±1; 25 °C ±1; 30

°C±1). Per ogni prova sono state previste 5 repliche. Il conteggio del numero di semi germinati veniva effettuato dopo 4, 7, 9, 11 e 14 giorni dall'inizio della prova, considerando germinati i semi che mostravano una radichetta perfettamente conformata e priva di alterazioni, imbrunimenti e marciumi, tali quindi da produrre piante in grado, in idonee condizioni di coltivazione, di compiere l'intero ciclo vegetativo e riproduttivo (Spreafico, 1978). Il tempo medio di germinazione (T.M.G) dei semi per ogni livello di temperatura (Tab. 8.3.1) è stato inoltre valutato applicando la classica formula di Pieper (Spreafico, 1978), secondo cui:

$$T.M.G. = \frac{\sum(n \times g)}{N}, \text{ dove:}$$

n = numero di semi germinati con germogli normali nei singoli giorni;

g = numero di giorni intercorsi per ogni conteggio dall'inizio della prova;

N = numero totale di semi germinati con germogli normali.

8.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

Rilievi ed analisi dei dati

Come evidenziato nelle figure 8.3.1 e 8.3.2, i valori di germinabilità rilevati nell'ultimo conteggio (14 giorni) oscillano tra il 4 e il 78.8%, con un tempo medio di germinazione piuttosto variabile, entri i valori di temperatura considerati, nei semi esposti alla luce (6.9 - 9.8 giorni) e fluttuazioni meno marcate (7.7 - 9.5 giorni) in quelli esposti al buio.

Tabella 8.3.1 Germinazione di semi di *Artemisia arborescens* L.; sono riportati i risultati delle prove effettuate con diverse condizioni di temperature e luce.

	+ 4	+ 7	+ 9	+ 11	+ 14	T.M.G.
+ 5°C ± 1	0.0 ± 0.0	10.0 ± 0.9	52.0 ± 11.6	52.0 ± 4.3	62.0 ± 5.5	9.8
+ 10°C ± 1	1.0 ± 0.0	39.0 ± 9.2	48.8 ± 6.5	66.0 ± 7.7	66.0 ± 8.1	9.4
+ 15°C ± 1	0.0 ± 6.2	22.0 ± 5.6	39.0 ± 2.9	52.0 ± 3.2	52.0 ± 4.1	9.5
+ 20°C ± 1	23.8 ± 4.4	32.5 ± 0.5	33.8 ± 0.7	40.4 ± 4.8	44.8 ± 5.2	7.1
+ 25°C ± 1	27.5 ± 8.8	46.3 ± 8.8	55.0 ± 12.5	58.8 ± 12.5	59.4 ± 13.1	6.9
+ 30°C ± 1	1.9 ± 1.9	2.5 ± 1.3	3.1 ± 1.9	3.1 ± 1.9	3.8 ± 2.5	7.3
+ 5°C ± 1 BUIO	27.5 ± 12.5	60.0 ± 5.0	62.5 ± 2.5	72.5 ± 2.5	77.5 ± 2.5	7.8
+ 10°C ± 1 BUIO	0.0 ± 0.0	21.8 ± 5.5	53.4 ± 9.3	60.0 ± 10.4	63.8 ± 12.3	9.5
+ 15°C ± 1 BUIO	22.5 ± 2.5	43.2 ± 11.7	62.6 ± 2.6	70.1 ± 2.0	70.8 ± 1.5	7.7

La germinabilità massima è stata riscontrata in assenza di luce ed alla temperatura minima (5 °C), temperatura a cui, almeno in una prima fase, si è manifestata la maggiore differenziazione tra le tesi poste alla luce (in cui la germinazione è stata fortemente rallentata) e quelle poste al buio, in cui invece il processo si è manifestato con valori elevati fin dal primo conteggio.

Figura 8.3.1 Germinazione di semi di *Artemisia arborescens* L.; confronto tra diverse temperature di germinazione in condizioni di luce con fotoperiodo 18/6 di luce/bio; è possibile notare come alla temperatura di 30°C non si è avuta germinazione, mentre per intervalli di 5° da +5 fino a 25°C la germinazione è stata sempre superiore al 30% a partire dal 9° giorno.

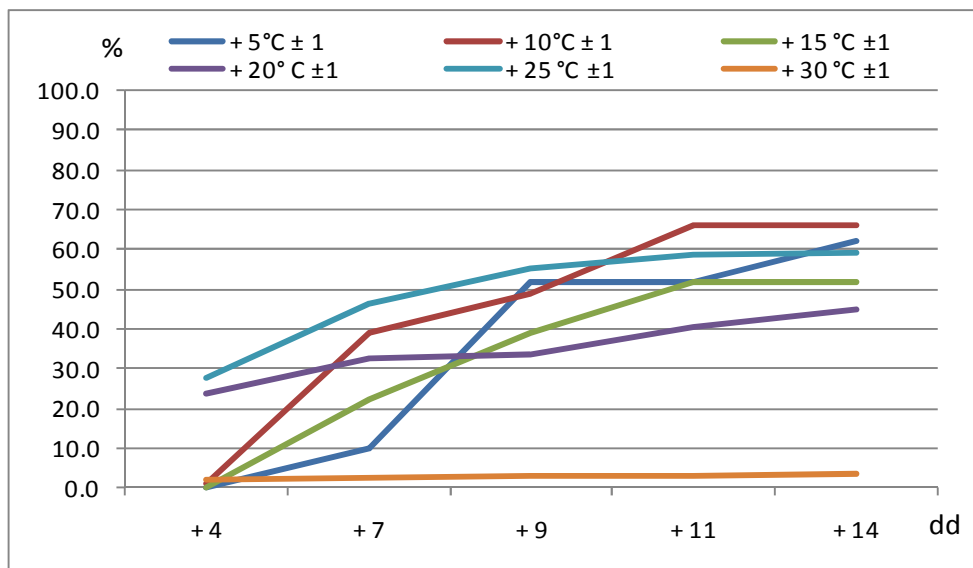
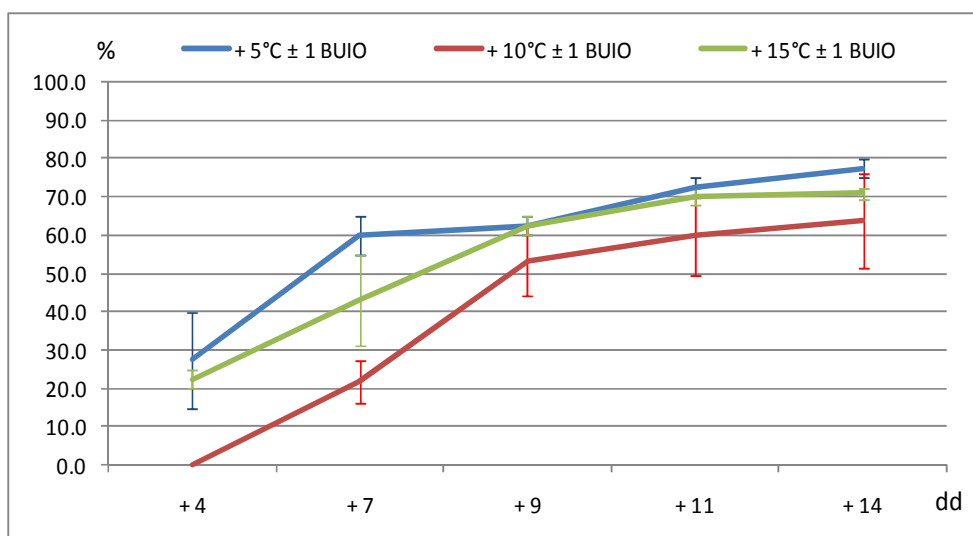


Figura 8.3.2 Germinazione di semi di *Artemisia arborescens* L.; sono state messe a confronto diverse temperature di germinazione in condizioni di assenza di luce. Le tre diverse temperature in prova non hanno presentato significative differenze quando i semi sono posti a germinare al buio.



Una certa differenziazione tra le due condizioni sperimentali è visibile già nel primo conteggio delle prove condotte a 5, 10 e 15 °C, dove la germinabilità dei semi posti al buio si è innalzata fino al 27.5%. Al termine della prova (14° giorno) la differenziazione tra le tesi è sembrata ridursi, sia pur lievemente, mostrando valori tra il 52 ed il 66% in condizioni di illuminazione e tra il 64 ed il 77,5% in condizioni di buio. Il tempo medio di germinazione (T.M.G.), tuttavia, in quest'ultimo gruppo di osservazioni risulta marcatamente più basso (tra 7,7 e 9,5 giorni). A temperature più elevate (da 20 a 30°C), i flussi di germinazione variano notevolmente, avvicinandosi a quelli rilevati al buio a temperature inferiori. Tra 20 e 25°C il processo avviene con grande rapidità, mostrando valori di germinabilità superiori al 20% fino al conteggio del 4° giorno ed evidenziando un T.M.G. intorno a 7 gg. Alla temperatura massima (30°C) la germinazione è risultata fortemente inibita, mantenendosi su valori molto bassi (tra il 1.9 e il 3.8 %).

Ad eccezione della tesi a 20 °C, in tutte le temperature considerate la differenziazione tra tesi illuminate e tesi al buio si è appiattita nel corso del tempo, e dopo 11 giorni la germinabilità non è sembrata significativamente influenzata dalla presenza/assenza di luce. In entrambe le prove, i valori di germinazione più elevati si sono ottenuti nell'intervallo di temperature comprese tra i 5 ed i 15 °C.

Dal punto di vista ecologico, sembra così trovare una motivazione il fatto che in natura le giovani piante di *A. arborescens* si ritrovano in maggior numero in primavera e in autunno, quando cioè le temperature superano i 10-15°C, mentre a temperature inferiori e superiori, tipiche delle stagioni invernale ed estiva, i flussi di emergenza vengono parzialmente inibiti. In particolare, in condizioni di illuminazione, la germinazione dei semi avviene in maniera più rapida quando le temperature sono più elevate (20-25°C); al buio, limitatamente ai valori di temperatura saggiati, il processo è invece favorito dall'esposizione dei semi a temperature più basse.

9. PROPAGAZIONE VEGETATIVA – RADICAZIONE TALEE

M. Militello, G. Fascella, A. Carrubba. Vegetative propagation of *Artemisia arborescens* L. by stem-cutting. Sottoposto a “*Propagation of Ornamental Plants*”.

9.1 INTRODUZIONE

La moltiplicazione su larga scala di specie vegetali arbustive può seguire tre strade alternative: la propagazione gamica di piantine ottenute da seme, la micropropagazione *in vitro* e la propagazione vegetativa *in vivo*. Tra queste, la tecnica di micropropagazione è stata largamente utilizzata, ma risulta molto costosa (Saranga e Cameron, 2006) e richiede molto tempo prima di ottenere delle piantine pronte al trapianto in pieno campo. La produzione di piantine da seme, invece, pur essendo più rapida ed economica, rappresenta un rischio per la disomogeneità genetica che caratterizza le produzioni ottenute. Pertanto, la propagazione vegetativa *in vivo* risulta ancora l’alternativa più rapida ed economica per la propagazione a basso costo, e per questo motivo la tecnica viene largamente utilizzata nelle realtà vivaistiche regionali.

Rispetto alla moltiplicazione gamica, la propagazione vegetativa presenta il vantaggio di poter produrre individui che ripropongono, anche se non illimitatamente, le caratteristiche morfologiche della pianta madre, e si presenta pertanto particolarmente adatta alla moltiplicazione di individui selezionati per determinati aspetti particolarmente pregevoli (Cervelli et al., 2008).

La capacità radicante delle talee è influenzata da fattori interni, come il genotipo, lo stato nutrizionale o lo stadio fenologico, e fattori esterni come la temperatura e l’intensità luminosa (Hartmann et al., 1997; Agbo e Obi, 2008; Priadjati et al., 2010).

I fattori interni sono strettamente legati alla presenza di fitormoni necessari al processo di radicazione (Copes e Mandel, 2000; Guo et al., 2009; Zobolo, 2010; Amri et al., 2010; Ofori et al., 1996); le operazioni di taleaggio si effettuano solitamente nei periodi in cui il potenziale rizogeno naturale della specie in oggetto è massimo, che a loro volta variano secondo la specie e, a parità di questa, con lo stadio fenologico della pianta madre. Per ogni specie esiste, quindi, un periodo dell’anno più favorevole degli altri alla radicazione, e l’individuazione di questo è di estrema importanza ai fini dell’avvio del processo di radicazione (Mascarello, 2008). L’influenza del periodo di raccolta delle talee sull’efficienza di radicazione è stata in effetti valutata su numerose specie (Hartmann et al., 1997; Sharma e Aier, 1989), e nella maggior parte dei casi quest’ultima viene attribuita alle caratteristiche fisiologiche del materiale vegetale. In talee di *Paeonia* raccolte in tre periodi differenti, ad esempio, né la percentuale di talee morte né il numero di radici subivano variazioni, mentre variavano il numero di talee radicate e la lunghezza delle radici (Guo et al., 2009). In altre esperienze sul nocciolo il periodo di raccolta del materiale vegetale influenzava significativamente la percentuale di radicazione (Cristofori et al., 2010), così come in *Pteroccephalus perennis* (Akoumianaki-Ioannidou et al., 2010).

Allo stesso modo, essenziali per la buona riuscita della moltiplicazione per talea sono la conoscenza dei fattori esterni ottimali e la selezione del miglior substrato di radicamento (Cella e Collu, 2004; Tchoundjeu et al., 2002; Mesh et al., 1997; Shiembo et al., 1996; Ofori et al., 1996).

La formazione di radici avventizie è mediata da cambiamenti metabolici dovuti alla presenza di auxine, che stimolano l'inizio della fase di radicazione. L'azione è stata dimostrata sia per l'IBA (acido indol-3 butirrico) che per il NAA (acido naftalenacetico), che si sono rivelati in grado di stimolare la formazione di radici avventizie (Copes e Mandel, 2000; Guo et al., 2009; Zobolo, 2010; Amri et al., 2010; Moura-Costa e Lundoh, 1994; Mesh et al., 1997; Shiembo et al., 1996; Aminah et al., 1995).

Solo pochi lavori sono disponibili sulla propagazione vegetativa *in vivo* del genere *Artemisia*; tra questi è possibile citare le prove condotte su *A. ludoviciana* Nutt. (Bradley Rowe e Cregg, 2002) e *A. tridentata* Nutt. (Alvarez-Cordero e McKell, 1979; Bakker, 2010). Su *A. arborescens* L. alcune prove preliminari (Cella e Collu, 2004) hanno già indicato come questa specie si presenti potenzialmente interessante nell'ambito dell'ingegneria ambientale, grazie anche alle sue spiccate caratteristiche di arido resistenza e nitrofilia.

Lo scopo di questo lavoro è stato quindi quello di verificare alcuni aspetti tecnici preliminari in vista della stesura di un protocollo di propagazione vegetativa a bassi costi per *A. arborescens*, individuando il substrato ottimale di radicazione, il periodo ottimale di prelevamento del materiale vegetale di partenza ed accertando l'eventuale vantaggio legato all'uso di auxine esogene.

9.2 MATERIALI E METODI

Materiale vegetale

La prova è stata condotta nella stagione 2010/2011 utilizzando talee semilegnose di *Artemisia arborescens* L., prelevate da piante madri in buone condizioni fitosanitarie e di vegetazione all'interno di una popolazione naturale omogenea e continua rilevata nelle vicinanze della zona costiera nord-occidentale della Sicilia (38°06'47.74" N, 13°31'16.38" E, 31 m s.l.m.).

Il materiale vegetale è stato prelevato in tre diversi periodi dell'anno (Febbraio, Aprile e Novembre 2010), ricavando per ogni epoca di prelevamento un numero adeguato di talee della lunghezza di 25-30 cm ciascuna; immediatamente dopo il prelevamento, le talee sono state trasferite presso le strutture del CRA - Unità di Ricerca per il Recupero e la Valorizzazione delle Specie Floricole Mediterranee (Bagheria, PA), dove sono state sottoposte ai trattamenti previsti dal protocollo sperimentale. Le prove di radicazione sono state realizzate all'interno di serre di circa 200 m² con orientamento E-W, costruite con struttura in acciaio e copertura in polimetacrilato di metile (38°05'25.22" N, 13°31'18.15" E, 23 m s.l.m.).

Mezzo di coltura e ormone radicante.

A seguito di ciascuna campagna di prelevamento, dopo la rimozione totale delle foglie, la porzione basale del 50% delle talee è stata immersa in una formulazione polverulenta di acido naftalenacetico (NAA) alla dose di 4000 ppm (Germon, Gerlach GmbH, Lubbecke, Germany), mentre le rimanenti talee non trattate sono state utilizzate come controllo. Le talee sono state posizionate in contenitori alveolari di polistirolo riempiti con tre differenti miscele (2:1; 1:1, 1:2 v/v – rispettivamente denominate substrato 1, 2 e 3,) di torba acida (TECNIC - Free Peat B.V., Sluiskade, Vriezenveen, Netherlands) e perlite Ø 2-5 mm (AGRIPAN 100, Perlite Italiana s.r.l., Corsico (MI), Italia); il contenuto di sostanza organica e azoto organico della torba era di 46% e 0.5% rispettivamente.

I contenitori alveolari sono stati riposti all'interno di bancali (6 m x 1.2 m) coperti con una pellicola di polietilene e dotati di sistema di nebulizzazione tipo MIST (umidità relativa 75%), in condizioni di fotoperiodo naturale.

Rilievi e analisi statistica

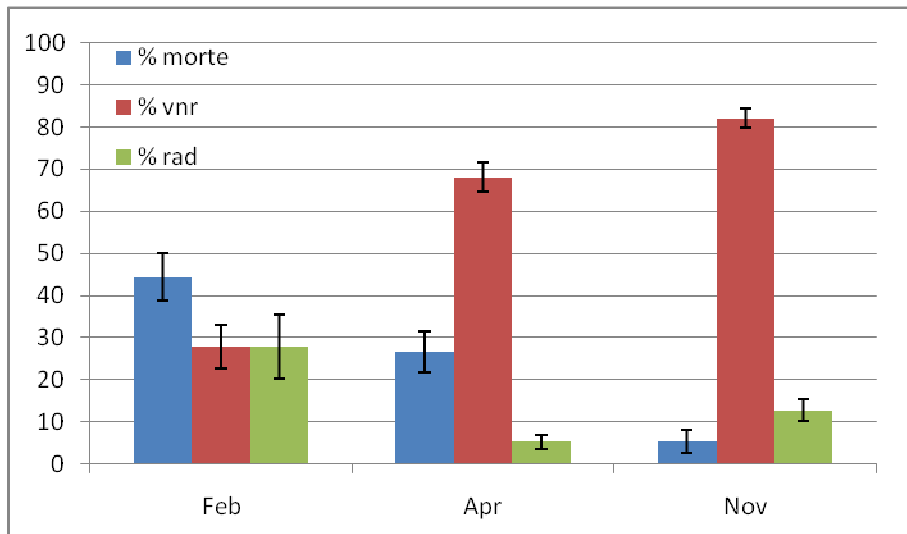
Dopo 40 giorni dall'inizio della prova, per ogni trattamento sono stati rilevati il tasso di sopravvivenza (survival rate %), la percentuale di radicazione (cuttings rooting rate %), il numero e la lunghezza delle radici per talea.

Sui dati ottenuti, allo scopo di verificare l'effetto dei diversi trattamenti (Gomez e Gomez, 1984) è stata effettuata l'analisi della varianza (procedura ANOVA) utilizzando il software statistico "Statistica" (V. 6.0 for Windows, Statsoft Inc., Tulsa, OK).

9.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati ottenuti dal confronto tra le diverse epoche di prelevamento vengono riportati in figura 9.3.1, in cui le talee vengono ripartite tra morte (D), vive ma non radicate (NR) e radicate (R). Come evidenziato, non è emersa alcuna differenza sostanziale tra la percentuale di talee radicate e non radicate nel primo conteggio, quando tutti e tre i gruppi (talee morte, radicate e vive non radicate) hanno mostrato valori oscillanti tra 20 e circa 40 %. Questi risultati sembrano in accordo con quanto riportato da altri autori su *A.tridentata*, in cui la radicazione invernale risulta essere la migliore (Alvarez-Cordero e McKell, 1979). Una differenziazione più marcata è emersa nelle osservazioni successive, quando il tasso di mortalità delle talee è diminuito portandosi al 26% e al 5%, rispettivamente in aprile e novembre.

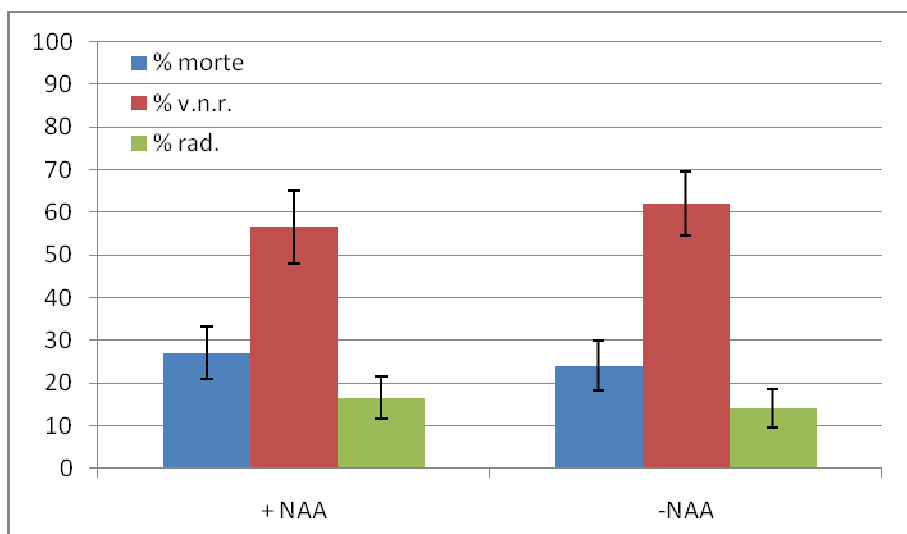
Figura 9.3.1 Radicazione di talee di *Artemisia arboresces* L.; tasso di radicazione in funzione di diversi momenti di raccolta (valori medi di diversi substrati e presenza/assenza di auxine). Le barre verticali rappresentano l'errore standard; morte: talee morte; v.n.r.: vive non radicate; rad.: radicate.



A questa diminuzione non fa tuttavia riscontro un parallelo aumento del numero di talee radicate, mentre un evidente incremento tra i momenti di rilevamento (da 68% a 82 %) si osserva a carico del numero di talee che, sebbene vitali, non hanno prodotto radici (NR).

Il grafico in fig. 9.3.2 mostra invece come, a parità di momento di prelevamento, l'aggiunta di auxine esogene (NAA) non aiuta a superare i problemi di dormienza, con una media di radicazione prossima al 20% sia nelle talee trattate con auxina che in quelle non trattate; allo stesso modo la percentuale di talee non radicate, sempre superiore al 50%, è rimasto invariato in entrambi i casi.

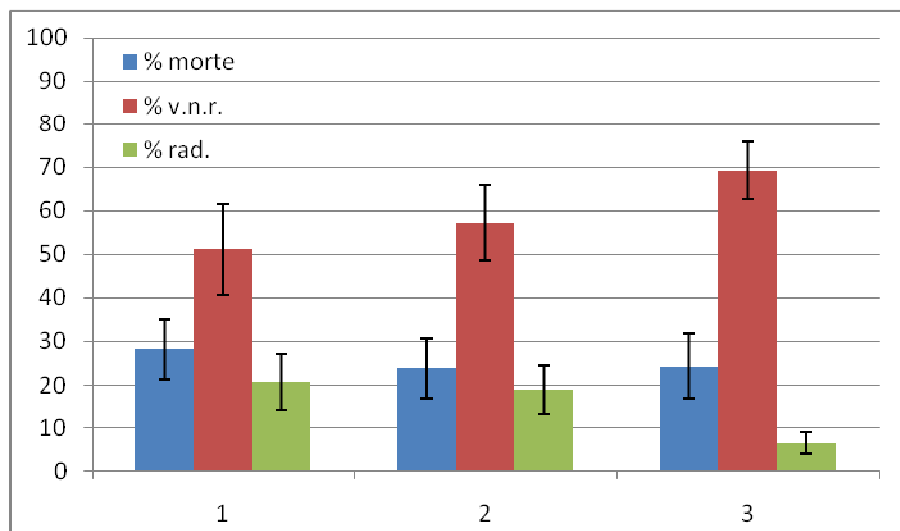
Figura 9.3.2 Radicazione di talee di *Artemisia arboresces* L.; tasso di radicazione in presenza/assenza di auxine esogene; (valori medi dei differenti substrati e delle date di raccolta). Le barre verticali rappresentano l'errore standard; morte: talee morte; v.n.r.: vive non radicate; rad: radicate.



Questi risultati concordano con quanto riportato su *Artemisia abrotanum* L. (Schroeder e Le Duc, 1996) e su altre specie (Myers e Still, 1979; Dirr e Heuser, 1987; Panetsos et al., 1994). in cui la radicazione delle talee non ha mostrato differenze significative tra tesi trattate e non trattate con ormone radicante. Al contrario altri autori (Alvarez-Cordero e McKell, 1979), hanno ottenuto risultati incoraggianti su *A. tridentata*, riscontrando un significativo incremento della percentuale di radicazione in conseguenza dell'aumento della concentrazione di acido indolbutirrico (IBA). Le differenze nella risposta di queste specie, comunque appartenenti allo stesso genere botanico, possono essere riconducibili ad una diversa attitudine propagativa di origine genetica, come già osservato nel genere *Grevillea* (Krisantini et al., 2006) e in *Magnolia* (Sharma et al., 2006), ma non è da escludere l'esistenza di una risposta diversa tra le due specie legata al diverso meccanismo di azione dei due ormoni (Ibàñez-Torres, 2004; Németh, 1986).

L'adozione di diversi substrati (Fig. 9.3.3) non ha influenzato il tasso di radicazione delle talee, che a parità di momento di prelevamento e di presenza/assenza di ormone radicante, ha presentato valori medi prossimi al 20%. Solo una riduzione della quantità di torba ha determinato un incremento del 15% del numero di talee vitali ma non radicate (NR) rispetto alla tesi con un quantitativo di torba più elevato (substrato 1). Altri autori avevano già evidenziato come la riduzione della percentuale di torba influenzava la radicazione in diverse specie (Fascella et al., 2008; Lym, 1992).

Figura 9.3.3. Radicazione di talee di *Artemisia arborescens* L.; tasso di radicazione in funzione di diversi substrati; (valori medi delle date di raccolta e della presenza/assenza di auxine esogene). Le barre verticali rappresentano l'errore standard; morte: talee morte; v.n.r.: vive non radicate; rad: radicate.



L'aggiunta di auxine esogene non ha influenzato il numero di radici per talea, che sono risultate in media 3 per talea (Fig. 9.3.4), né la loro lunghezza (media 5.8 cm; Fig. 9.3.5), in accordo con quanto riportato in bibliografia su *Euphorbia lagascae* Spreng. (Ibàñez-Torres, 2004) e su *Euphorbia x lomi* Rauh. (Fascella e Zizzo, 2009).

Il numero di radici sembra risentire in qualche modo del periodo di prelevamento delle talee (Fig. 9.3.4), anche se le differenze riscontrate non sono statisticamente significative; allo stesso modo, la lunghezza media delle radici sembra manifestare differenze assai ridotte in relazione sia al periodo di prelevamento che al substrato utilizzato (Fig. 9.3.5).

Figura 9.3.4 Radicazione di talee di *Artemisia arborescens* L.; numero medio di radici in talee di *A. arborescens* in funzione della data di raccolta, tipo di substrato e presenza/assenza di auxine esogene. Le barre verticali rappresentano l'errore standard.

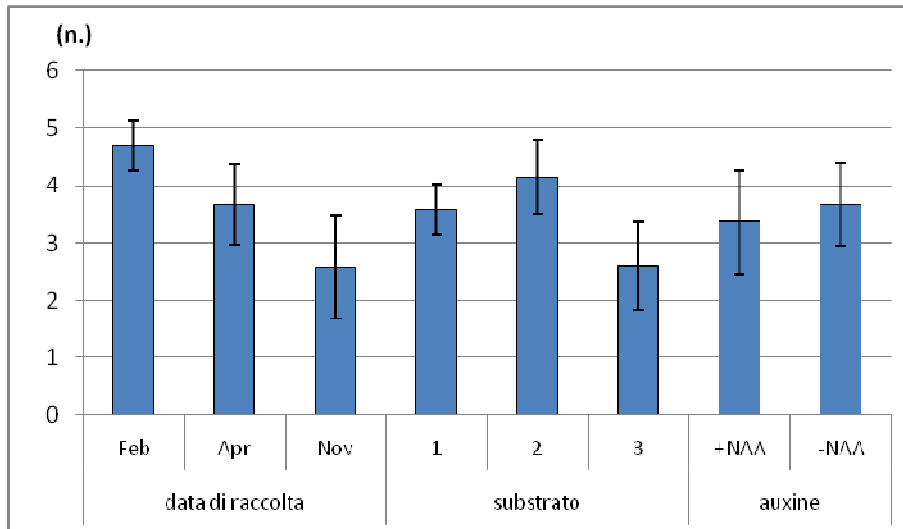
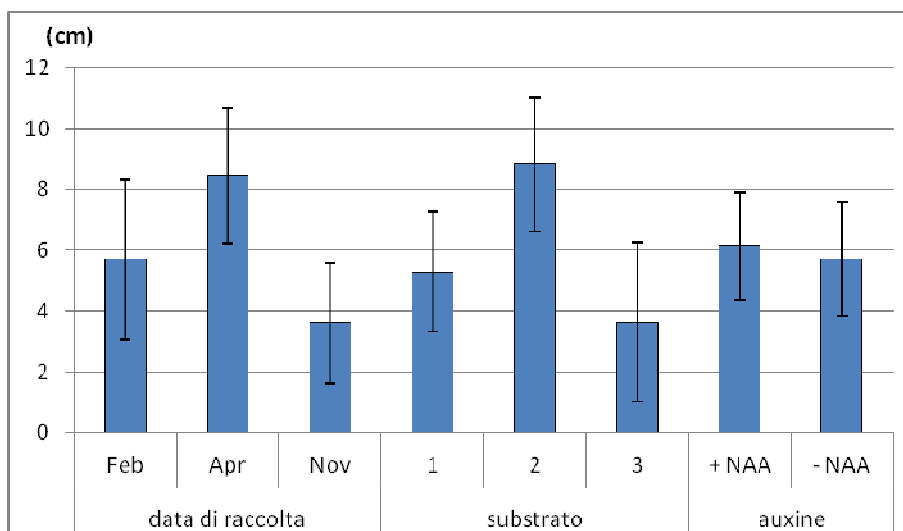


Figura 9.3.5 Radicazione di talee di *Artemisia arborescens* L.; lunghezza media delle radici in talee di *A. arborescens* in funzione della data di raccolta, tipo di substrato e presenza/assenza di ormone radicante. Le barre verticali rappresentano l'errore standard.



10. PROVA DI COLTIVAZIONE

10.1 INTRODUZIONE

Le colture destinate all'estrazione di oli essenziali possono costituire una risorsa strategica per numerosi ambienti, soprattutto quando la coltivazione delle colture "da reddito" più note e diffuse incontra limiti ambientali ed economici più o meno severi (Carrubba e Catalano, 2009). Di fatto, l'utilizzazione di molte tra queste specie è probabilmente antica quanto l'uomo, e non esiste cultura nel mondo che non ne annoveri un numero più o meno grande tra le sue risorse primarie per la pratica fitoterapeutica e/o per l'alimentazione. La raccolta dallo spontaneo è sicuramente il metodo più antico per l'approvvigionamento da parte delle comunità umane; largamente adoperato nel passato, almeno fin quando i fabbisogni si mantenevano su livelli limitati, oggi questo metodo è caduto in disuso, e la produzione di piante da olio essenziale è vista quasi esclusivamente come una coltivazione altamente specializzata. Alla base di ciò stanno tre ragioni fondamentali:

1. La raccolta dallo spontaneo non garantisce i requisiti di uniformità quantitativa e qualitativa che oggi vengono fortemente richiesti dai compratori, siano essi semplici consumatori che strutture industriali più o meno grandi (Ruta et al., 2006; Shetty et al., 1996). Solo in coltivazione, infatti, è possibile modulare le produzioni seguendo le richieste del mercato e soddisfacendone le esigenze. La produzione spontanea è in effetti difficilmente quantificabile ed in qualche caso può venire drammaticamente sovrastimata, soprattutto quando si considera la possibilità, sempre presente, dell'insorgenza di fenomeni casuali ed imprevedibili che portano ad una diminuzione improvvisa delle disponibilità naturali, generando il fenomeno che gli autori di lingua inglese definiscono di "boom and bust" (esplosione e fallimento): da principio si origina un flusso di reddito cospicuo, seguito da un improvviso e drammatico crollo economico
2. La produzione specializzata permette di limitare il rischio di depauperamento dei popolamenti naturali, soprattutto quando l'aumento della richiesta di una specie viene soddisfatto incrementandone la raccolta dai luoghi di vegetazione naturale (Schippmann et al., 2002; Skoula, 2006; WHO, 2003). La letteratura sull'argomento abbonda di casi in cui estesi popolamenti naturali sono stati drasticamente ridotti (spesso oltre la loro possibilità naturale di ricostituzione) per effetto di un'eccessiva pressione del carico di prelevamento: il Ginseng americano ma anche quello giapponese e coreano, alcune specie di arnica e genziana in Spagna e Croazia (Schneider, 2004; Šatović, 2004) e addirittura interi popolamenti di rosmarino in Sardegna (Mulas e Mulas, 2005).

3. La coltivazione offre la possibilità di valorizzare specie poco diffuse, se non addirittura rare, che hanno manifestato potenzialità tali da suggerirne l'uso da parte di alcuni settori produttivi, ma che non possiedono una fitomassa sufficiente da far fronte a tale uso, e in qualche caso nemmeno sufficiente a svolgere su di esse un'adeguata attività sperimentale.

Il problema, a questo punto, diventa quello di accertare se, e in che misura, la pratica della coltivazione influenza la risposta qualitativa di tali piante, intesa come contenuto e caratteristiche dell'olio essenziale. E' vero infatti che la tecnica agronomica, modificando l'ambiente di crescita delle piante, determina variazioni delle condizioni nutrizionali e abitative del suolo (attraverso le fertilizzazioni, le lavorazioni o l'irrigazione), delle condizioni di temperatura e fotoperiodo durante lo sviluppo (mediante l'epoca di semina, la pacciamatura, la coltivazione in ambiente protetto), delle condizioni di competizione (la competizione interspecifica perde d'importanza, mentre acquista maggior peso la componente intraspecifica) (Carrubba e Catalano, 2009; Catizone et al., 1986). Una scelta opportuna delle pratiche colturali può dunque senza dubbio influenzare le caratteristiche quantitative e qualitative delle produzioni.

Un secondo aspetto da sottolineare è che numerose specie diffuse allo stato spontaneo ed apprezzate per alcune particolarità dei loro oli essenziali presentano spesso tratti morfofisiologici che le rendono poco adatte alla coltivazione, in massima parte legati proprio al loro adattamento a vivere in condizioni "naturali". Numerose specie in cui il prodotto utile è costituito dal seme (finocchio, coriandolo, anice), ad esempio, possiedono un habitus di fioritura indeterminato, considerato un importante adattamento strategico allo scopo di allungare il periodo di disseminazione e quindi assicurare il successo riproduttivo anche in ambienti in cui la disponibilità idrica è aleatoria (Arnon, 1992). Questo carattere, derivante da millenni di selezione naturale, costituisce tuttavia un serio problema ai fini della meccanizzazione della raccolta. Allo stesso modo, molte piante da seme presentano in condizioni di coltivazione la marcata tendenza a produrre massa verde a scapito della produzione commerciale, caratteristica talvolta spiacevolmente accentuata da alcuni input tecnici come la concimazione azotata o l'irrigazione.

Tra le pratiche agronomiche da sottoporre a verifica, la tecnica di propagazione assume un ruolo non secondario, poiché anche ad essa viene attribuito talvolta un effetto significativo sulle caratteristiche degli oli essenziali. Molte specie da olio essenziale (come ad esempio la menta) sono sterili, e richiedono quindi la propagazione per via vegetativa, tramite stoloni, rizomi o parti di pianta (Dellacecca, 1996). Quando la moltiplicazione per seme è possibile essa può rappresentare un'interessante opportunità, ma in specie eterogame i semi forniscono spesso piante disomogenee sia per crescita che per caratteristiche qualitative. Bruneton (1995) riporta, ad esempio, variazioni significative nella composizione chimica dell'olio essenziale di lavanda in piante ottenute da seme o per talea, giungendo alla conclusione che il secondo metodo consente di ottenere piante con caratteristiche morfologiche, biologiche e qualitative costanti. Nelle specie perenni, l'uso della semina diretta costituisce una pratica piuttosto complessa, poiché, come verificato ad esempio nella salvia (Caligani e Adamo, 1987), l'affrancamento piuttosto lento delle piantine può causare una maggiore competizione con le infestanti. D'altra parte, i costi associati al trapianto possono talvolta essere tanto alti da rendere antieconomica l'intera coltura, per cui la scelta tra i due metodi dipenderà prioritariamente dalle rese attese e dai prezzi di mercato della coltura (Falk et al., 2000).

Da queste considerazioni è nata l'esigenza di verificare l'adattabilità di *A. arborescens* alle condizioni di coltivazione, verificando in primo luogo la risposta vegetativa e produttiva di piante ottenute per via vegetativa o da seme, e successivamente valutandone il comportamento in seguito a due diverse altezze di taglio.

10.2 MATERIALI E METODI

La prova è stata condotta presso l'azienda sperimentale "Sparacia" (Cammarata – AG; 37° 38' N – 13° 46' E; 415 m s.l.m.), con l'obiettivo di valutare l'adattabilità alla coltivazione e la risposta bio-agronomica e produttiva di *A. arborescens* L. Il materiale vegetale utilizzato per la prova proveniva da piante madri in buone condizioni fitosanitarie e di vegetazione all'interno di un popolamento naturale omogeneo e continuo individuato nelle vicinanze della zona costiera nord-occidentale della Sicilia (38°06'47.74" N, 13°31'16.38" E, 31 m s.l.m.).

Il seme adoperato è stato prelevato nel settembre 2009 e posto a germinare in vassoi alveolari (6 x 11 = 66 alveoli) in polistirene (PS) delle dimensioni di 54 x 28 cm, riempiti di una miscela di torba e perlite in parti uguali (v/v). Il seme è stato deposto sulla superficie degli alveoli in data 23/11/2009 e la germinazione è avvenuta con regolarità a partire dal settimo giorno (32% di plantule emerse), giungendo al valore definitivo (germinazione massima 71%) in corrispondenza dell'undicesimo giorno. Dopo 14 giorni le piantine sono state trasferite in vasetti di materiali plastico delle dimensioni di 7 x 7 cm, riempiti con una miscela 2:1 di torba e perlite (v/v).

A 40 giorni dal trapianto le piantine sono state portate all'esterno per favorire la lignificazione della zona del colletto.

Le talee sono state invece prelevate il 05.02.2010 e poste a radicare in contenitori di plastica della dimensione di 7 x 7 cm riempiti con una miscela di torba e perlite in rapporto 1:1 (v/v). Dopo 80 giorni dal trapianto le piantine perfettamente formate e correttamente lignificate sono state trapiantate in pieno campo.

L'impianto del campo è stato effettuato il 29.04.2010, quando indipendentemente dalla modalità di propagazione, le piantine avevano raggiunto un'altezza media di circa 15 cm, disponendole su file lunghe 14 m a distanze di 100 cm (sulla fila) x 120 cm (tra le file).

Il terreno utilizzato per il trapianto, precedentemente impegnato a trifoglio alessandrino, è stato preparato mediante un'epicatura a due passaggi incrociati, condotta ad una profondità di lavorazione di circa 25 cm, che ha permesso di interrare i residui della coltura precedente. In seguito, il campo è stato sottoposto a visite periodiche per valutarne le condizioni fitosanitarie e di sviluppo, misurando l'altezza ed il diametro delle piante.

La coltura è stata condotta in asciutto, limitando gli interventi irrigui ad un'unica distribuzione al momento dell'impianto.

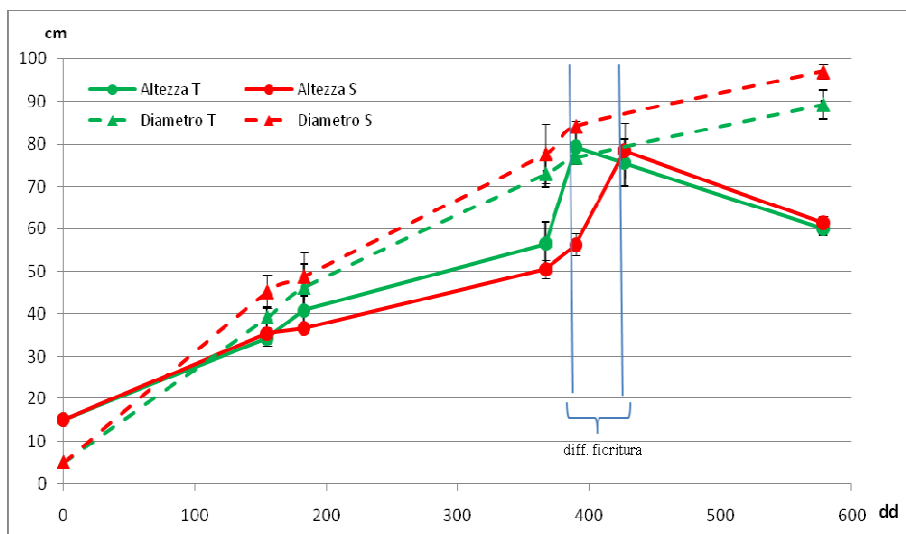
Durante il secondo anno di sperimentazione sono state effettuate le operazioni di raccolta della parte aerea delle piante da avviare al processo di distillazione. Per verificare la risposta delle piante alla variazione

dell'altezza di taglio, in ciascuna delle due tesi originarie (piante da seme e piante da talea) sono stati messi a confronto un taglio basso (TB) effettuato a circa 25 cm dal suolo, ed un taglio alto (TA) con asportazione di tutta la vegetazione al di sopra dei 40 cm. La biomassa raccolta per ogni tesi è stata pesata, e 4 campioni di 100 g ciascuno sono stati essiccati in stufa a 105 °C per 24 ore fino a raggiungimento del peso costante, per determinarne l'umidità. Il valore ottenuto è stato utilizzato per trasformare il valore misurato della biomassa fresca in sostanza secca.

10.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

L'andamento delle altezze e dei diametri nel corso del periodo di osservazione delle piante appartenenti alle due tesi in prova è riportato nel grafico in fig. 10.3.1.

Figura 10.3.1 Sparacia (Cammarata – AG) 2010 e 2011. Andamento delle altezze medie e del diametro medio dei cespi in piante di *A. arborescens* provenienti da talea radicata (in verde) e da seme (in rosso). Le barre verticali indicano gli errori standard delle medie per ogni rilevamento. Le frecce indicano le date di fioritura delle piante provenienti da talea radicata (in verde) e da seme (in rosso).



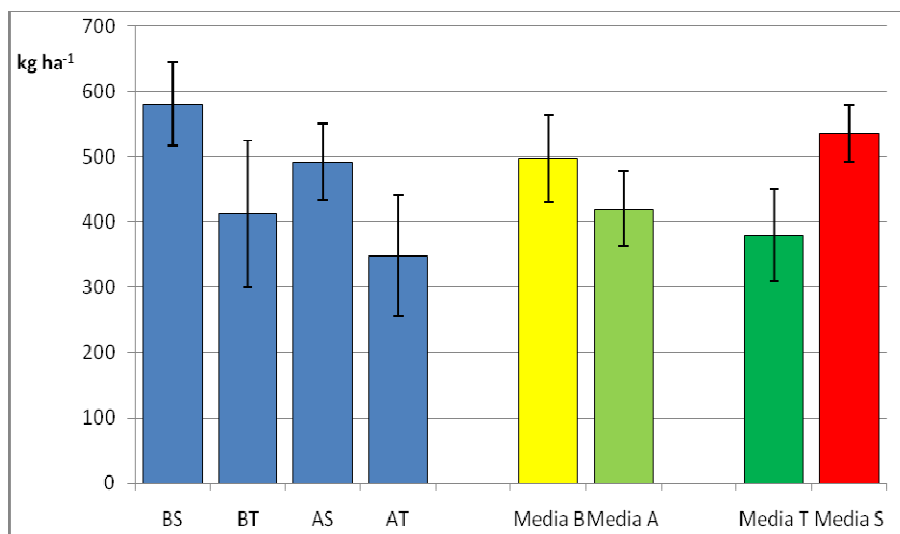
Malgrado le piante provenienti da talea presentino costantemente un'altezza superiore, lo sviluppo in altezza segue nelle due tesi un'evoluzione molto simile, manifestando un accrescimento lento e costante fino al momento della fioritura, fase in cui in ambedue le tesi si registrano i valori più elevati. L'espansione del diametro continua invece anche oltre il momento della fioritura, ed al contrario del parametro precedente esso conserva sempre valori più elevati nelle piante provenienti da seme.

La produzione di biomassa ricavata dal taglio (fig.10.3.2) è stata, come era da attendersi, superiore nelle tesi sottoposte a un taglio più drastico (496,6 vs. 419,7 kg ha⁻¹); la presenza di una certa differenziazione tra le diverse tesi, tuttavia, si evidenzia nettamente nel confronto tra i valori della produzione di biomassa riferiti al

complesso delle piante ottenute da seme ($536,1 \text{ kg ha}^{-1}$) e da talee radicate ($380,2 \text{ kg ha}^{-1}$).

I risultati sin qui ottenuti sembrano quindi testimoniare una maggiore adattabilità alle condizioni di coltivazione delle piante ottenute da seme, caratterizzate da una maggiore espansione in larghezza e in grado di fornire, al secondo anno dell'impianto, produzioni di biomassa complessivamente superiori con ambedue le modalità di taglio.

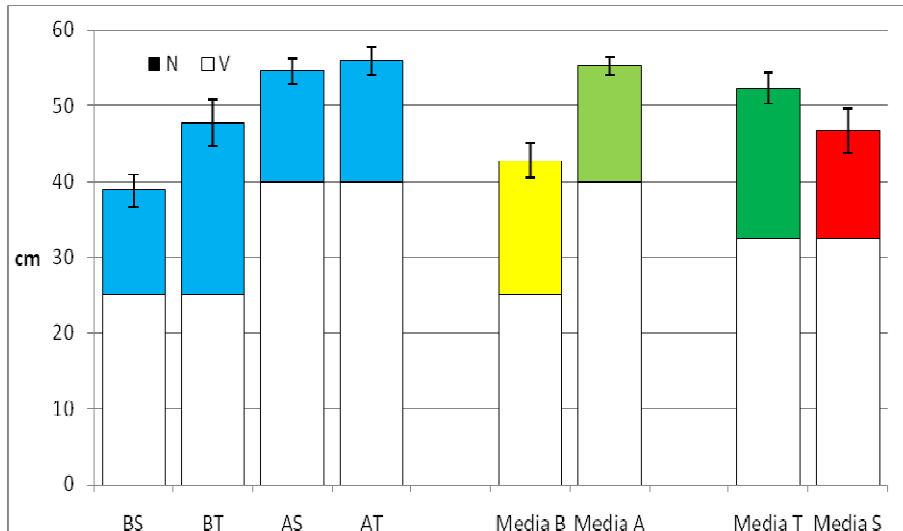
Figura 10.3.2 Sparacia (Cammarata – AG) - Produzione di biomassa (kg ha^{-1} di SS) in *A. arborescens* proveniente da talee radicate (T) o da semi (S) e sottoposta a diverse intensità di taglio (B= taglio a 25 cm dal suolo; A= taglio a 40 cm dal suolo). Per ogni colonna, le barre verticali indicano l'errore standard della media.



Tuttavia, i rilievi effettuati dopo la ripresa vegetativa (fig. 10.3.3) mostrano come la severità del taglio di raccolta possa in qualche misura influenzare la risposta produttiva delle piante. Malgrado l'altezza complessivamente raggiunta dalle tesi sottoposte a taglio alto (40 cm dal suolo) sia infatti più elevata, solo una ridotta frazione (14-16%) del valore misurato deriva da biomassa di nuova formazione, mentre la produzione di nuova vegetazione è più elevata nelle tesi sottoposte a taglio basso, il cui accrescimento in altezza è significativamente superiore e, in uno dei due trattamenti (BT), quasi raddoppiato (+ 91 %). Il fenomeno è probabilmente da porre in relazione con la rimozione nelle tesi del gruppo B di un numero di gemme piuttosto consistente, che permette alle restanti un livello inferiore di competizione per le risorse disponibili nella pianta.

La possibilità di disporre, per la raccolta, di una maggior quota di biomassa di neoformazione non costituisce un dato di importanza secondaria: oltre al già noto effetto esercitato sugli aspetti qualitativi dell'olio essenziale dal momento fenologico della pianta, numerose ricerche (Sangwan et al., 2001; Carrubba e Catalano, 2009) riportano per diverse specie l'esistenza di modificazioni a volte significative della composizione dell'olio essenziale al variare dell'età delle foglie.

Figura 10.3.3 Sparacia (Cammarata – AG). Ripartizione dell'altezza delle piante di *A. arborescens* fra biomassa di nuova formazione (N, aree colorate) e biomassa preesistente (V, aree in bianco) in piante provenienti da talee radicate (T) o da semi (S) e sottoposte a diverse intensità di taglio (B= taglio a 25 cm dal suolo; A= taglio a 40 cm dal suolo). Le barre verticali indicano l'errore standard di ogni media.



Non è da escludere, inoltre, che la maggiore lignificazione caratteristica della biomassa più vecchia possa, come già verificato in alcune altre specie perennanti come ad es. l'origano (Leto et al., 1994), condurre ad un'alterazione delle caratteristiche qualitative del prodotto, determinando una riduzione della resa in olio. Data la poliennalità della specie, tuttavia, una valutazione più completa dell'attitudine al ricaccio di *A. arborescens* potrà comunque derivare dalla prosecuzione dello studio per più anni, valutandone la ripartizione della biomassa prodotta in foglie, fiori e frazione legnosa degli steli, e le eventuali variazioni nella resa e nella composizione dell'olio essenziale.

11. ATTIVITA' ANTIMICROBICA

M. Militello; L. Settanni; A. Aleo; C. Mamma; G. Moschetti; G. M. Giammanco; M. Amparo Blazquez; A. Carrubba. 2011. Chemical Composition and Antibacterial Potential of *Artemisia arborescens* L. Essential Oil. "Current microbiology", 62 (4): 1274-1281.

11.1 INTRODUZIONE

Negli ultimi anni, nei consumatori si è sviluppata una particolare sensibilità in merito agli additivi alimentari, sempre più interessati ai cibi di tipo tradizionale o naturale, e comunque prodotti senza l'uso di additivi chimici (Settanni e Corsetti, 2008). Quando i conservanti chimici vengono utilizzati in dosi molto ridotte, si possono avere dei fenomeni di sopravvivenza di alcuni ceppi batterici con il rischio di selezionare ceppi resistenti (Xu e Lee, 2001). In particolare la comparsa di alcuni patogeni resistenti ai tradizionali conservanti chimici ha generato la necessità di individuare agenti antibiotici alternativi.

Diversi composti presenti nelle piante, con una lunga tradizione come conservanti alimentari (Nychas et al., 2003), sono generalmente ben accettati dai consumatori, e alcuni prodotti naturali, come gli oli essenziali estratti da diverse specie vegetali, sono oggi presi in seria considerazione dalle industrie alimentari grazie alle loro accertate proprietà antibiotiche. La capacità di alcuni oli essenziali di inibire la crescita di certi microorganismi risulta interessante soprattutto quando questi sono patogeni degli alimenti. Tra questi, particolarmente pericolosi sono i batteri; uno dei maggiori rischi legati alla salute degli alimenti nell'ultimo ventennio è rappresentato dai Gram-positivi, quali *Listeria monocytogenes* (Farber, 2000). Pur avendo una bassa incidenza sulla popolazione, la listeriosi ha esiti molte volte fatali, con una mortalità superiore al 30% (Drevets e Bronze, 2008) soprattutto in Europa (Goulet et al., 2008). Oggi, molte spezie vengono normalmente aggiunte agli alimenti per aumentarne l'appetibilità, e per questo motivo l'utilizzo degli oli essenziali come conservanti costituisce una risorsa naturale di additivi conservanti. (Carrubba e Calabrese, 1998; Haraguchi, 2001; Burt, 2004; Khan et al., 2009).

L'obiettivo di questa prova è stato quello di verificare le proprietà antibiotiche dell'olio essenziale di *A. arborescens* su alcuni ceppi batterici responsabili di alterazioni a carico del cibo.

11.2 MATERIALI E METODI

Materiale Vegetale ed Olio Essenziale

La prova è stata effettuata utilizzando le parti aeree di alcune piante di *A. arborescens* L., prelevate nel gennaio 2010 da una popolazione naturale in fase di stasi vegetativa (N 37°, E 13°44'13"). Subito dopo la raccolta, il materiale vegetale è stato distillato in corrente di vapore (Estrattore Albrigi Luigi-Verona, Italia) per 3 ore. L'olio essenziale ottenuto è stato depurato dei residui acquosi utilizzando del solfato anidro di

sodio (Na_2SO_4) e successivamente conservato a 4°C in boccettine da 2 ml di vetro scuro con chiusura ermetica. L'olio essenziale è stato analizzato mediante gascromatografia e spettrometria di massa, seguendo le procedure già esposte nel paragrafo 2.0.

Ceppi Batterici in prova

I ceppi batterici utilizzati per la prova provenivano da apposite colture disponibili presso il Dipartimento "G. D'Alessandro" di Scienze per la Promozione della Salute dell'Università degli Studi di Palermo. Le specie selezionate (*Listeria monocytogenes*, *Enterobacter* spp. e *Salmonella enterica*) sono generalmente associate alle alterazioni degli alimenti determinate da una loro cattiva conservazione.

Attività Antibatterica

L'olio essenziale è stato applicato su di un disco di carta filtro sterile adattando la metodica riportata in bibliografia (Kelmanson et al., 2000). Nel mezzo di coltura adottato, a base di agar, è stato inserito dell'agar liquido (0.7% w/v), precedentemente inoculato con circa 10^7 CFU ml^{-1} o 10^6 CFU ml^{-1} di uno dei ceppi batterici in prova. In seguito, sulla superficie del substrato sono stati posizionati quattro dischi di carta filtro sterile (Whatman No. 1) di 6 mm di diametro, posti ad una distanza di circa 5 cm l'uno dall'altro.

Due dischi sono stati utilizzati come controllo aggiungendo 10 ml di acqua sterile e acetone (controllo negativo) o streptomina (10% w/v, controllo positivo) mentre i due dischi restanti sono stati trattati con 10 ml di olio essenziale preventivamente diluito in acetone. Le piastre sono state poste a 37°C per 24 h e l'attività inibitoria è stata valutata positiva quando attorno al disco di carta si presentava un'evidente area di inibizione.

Determinazione della minima concentrazione inibente (MIC)

L'attività antibatterica dell'olio essenziale è stata valutata come Concentrazione Minima Inibente (MIC - minimum inhibitory concentration), che rappresenta il parametro più comune di valutazione della performance antibatterica di un olio essenziale (Burt, 2004). La MIC è definita come la più bassa concentrazione di un composto attivo che inibisce evidentemente la crescita dell'organismo utilizzato per la prova (Karapinar e Aktug, 1987).

11.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

Caratterizzazione chimica dell'olio essenziale

La distillazione in corrente di vapore ha prodotto un olio essenziale di colore blu scuro con un intenso odore balsamico e con un rendimento dello 0.33 % (v/w). L'analisi effettuata mediante GC e GC-MS (tabella

11.3.1) ha consentito di individuare 43 composti per un totale del 93% dell'olio totale, che sono stati elencati per gruppi fitochimici in ordine di tempo di eluizione nella colonna capillare. La composizione qualitativa riscontrata risulta in accordo con quanto osservato nelle attività sperimentali precedenti.

Tabella 11.3.1. Olio Essenziale di *A. arborenses*; composizione chimica dell'olio in prova attività antimicrobica.

COMPOSTI	RT [min]	KI ^a	% ^b
α -Pinene	7,874	939	0,70
Camphene	8,532	954	0,61
Sabinene	9,470	975	2,33
Myrcene	10,164	990	2,03
α -Phellandrene	10,905	1002	0,34
α -Terpinene	11,377	1014	0,69
p-Cymene	11,776	1024	0,33
γ -Terpinene	13,301	1054	1,29
Monoterpene hydrocarbons			8,32
<i>cis</i> -Sabinene hydrate	13,968	1070	1,65
Linalool	15,432	1096	0,22
Methyl butyl 2 methyl hydrate		1100	0,96
α -Thujone	15,652	1102	0,75
β -Thujone	16,338	1114	45,04
Camphor	17,590	1146	6,78
Borneol	18,795	1169	
Terpinen-4-ol	19,136	1177	2,16
Carvacrol	23,804	1299	
Oxygenated monoterpenes			57,56
α -Copaene	27,600	1376	0,19
β -Caryophyllene	29,442	1419	0,89
Germacrene D	31,979	1484	3,34
Chamazulene	41,577	1731	22,71
Sesquiterpene hydrocarbons			27,13
Sesquicineole - dehydro	31,114	1471	0,72
Geranyl isovalerate	36,766	1607	
Oxygenated sesquiterpenes			0,72
Total			93,73

^a KI, Indice di ritenzione di Kovats relativo a C₈-C₃₂ n-alcani.
^b Percentuale di ogni compost sull'olio totale.

Inibizione della crescita dei ceppi batterici

L'attività antibatterica dell'olio essenziale di *A. arborenses* è riportata nella tabella 11.3.2. Lo spettro di inibizione ha evidenziato una buona inibizione su *Listeria* (34 dei 44 ceppi sono stati inibiti nella crescita), con un grado di sensibilità al trattamento variabile tra i diversi ceppi selezionati in prova.

Il ceppo *L. monocytogenes* ATCC 19114T pur evidenziando un risultato positivo ha mostrato una inibizione molto bassa (8 mm, di cui 6 mm sono dati dalle dimensioni del disco di carta). I ceppi che hanno mostrato i risultati più interessanti sono stati *L. monocytogenes* 186 e 7BO, con una zona di inibizione di 12 mm. *L. monocytogenes* 7BO è stato il meno sensibile in entrambe le concentrazioni provate; su questo ceppo l'olio essenziale ha mostrato una MIC di 2.5 ed 1.25 $\mu\text{l ml}^{-1}$ rispettivamente a 107 e 106 CFU ml^{-1} ; la MIC per il ceppo *L. monocytogenes* 186 a 107 e 106 CFU ml^{-1} è invece stata di 1.25 e 0.625 $\mu\text{l ml}^{-1}$ rispettivamente.

In accordo con quanto ottenuto nelle prove precedenti, l'analisi chimica dell'olio essenziale ottenuto ha evidenziato un olio particolarmente ricco in β -thujone (45.04%) e camazulene (22.71%),

Tabella 11.3.2- Attività inibitoria di Olio essenziale di *A. arborescens*.

Specie Batteriche	Inibizione	Fonte d'isolamento
<i>Enterobacter amnigenus</i>	DHPS70B3(-)	Pollo congelato
<i>E. amnigenus</i>	DHPS60A2(-)	Agnello congelato
<i>E. cloacae</i>	DHPS24(-),DHPS25(-)	Latte in polvere
<i>E. cloacae</i>	DHPS13A(-)	Crema di cereali
<i>E. cloacae</i>	DHPS62A(-)	Pollo congelato
<i>E. cloacae</i>	DHPS 32A(-)	Farina di latte
<i>E. cloacae</i>	DHPS43B1(-)	Semolino
<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i>	DHPS1(-), DHPS2(-), DHPS6(-), DHPS7(-), DHPS8(-), DHPS11(-), DHPS13 (-), DHPS15(-), DHPS19(-), DHPS31(-)	Latte in polvere
<i>E. sakazaki</i>	DHPS2B(-)	Crema di riso
<i>E. sakazaki</i>	DHPS23A(-)	Crema di riso verde
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19114T(?)	Tessuti animali
<i>L. monocytogenes</i>	DHPS129(?), DHPS130(?), DHPS131(?), DHPS132(-), DHPS133(-), DHPS134(-), DHPS135 (?), DHPS136(?), DHPS137(?), DHPS138(?), DHPS139(?), DHPS140(?)	umano
<i>L. monocytogenes</i>	DHPS179(?)	Salmone
<i>L. monocytogenes</i>	DHPS180(?),DHPS182(?)	Ricotta
<i>L. monocytogenes</i>	DHPS184(-)	Insalata di riso
<i>L. monocytogenes</i>	DHPS185(-)	Carne di manzo
<i>L. monocytogenes</i>	DHPS186(??)	Mozzarella
<i>L. monocytogenes</i>	DHPS187(?)	Pollo arrosto
<i>L. monocytogenes</i>	DHPS188(?)	Insalata verde
<i>L. monocytogenes</i>	DHPS1BO (?),DHPS10BO(?)	Carne tritata
<i>L. monocytogenes</i>	DHPS2BO(?), DHPS 3BO(?)	salame
<i>L. monocytogenes</i>	DHPS4BO(?), DHPS5BO (?)	Salame stagionato 3 settimane
<i>L. monocytogenes</i>	DHPS6BO(?), DHPS7BO(??), DHPS8BO(-)	Salame stagionato 4 settimane
<i>L. monocytogenes</i>	DHPS11BO(?)	Macello
<i>L. monocytogenes</i>	DHPS12BO(?)	Salame stagionato 1 settimana
<i>L. monocytogenes</i>	DHPS13BO(?), DHPS14BO(-), DHPS15BO(-), DHPS16BO(-), DHPS7BO(?), DHPS18BO(?), DHPS19BO(?), DHPS20BO(?), DHPS21BO(-)	Gorgonzola
<i>L. monocytogenes</i>	DHPS22BO(?), DHPS23BO(?), DHPS24BO(?)	Taleggio
<i>Salmonella</i> Abony	DHPS50398(-)	Umano
<i>S. Agona</i>	DHPS50361(-)	Umano
<i>S. Blockley</i>	DHPS50314(-)	Umano
<i>S. Bredeney</i>	DHPS50374(-)	Umano
<i>S. Derby</i>	DHPS50399(-)	Umano
<i>S. Enteritidis</i>	DHPS50339(-),DHPS50430(-),DHPS50371(-)	Umano
<i>S. Hadar</i>	DHPS50272(-)	Umano
<i>S. Infantis</i>	DHPS50356(-)	Umano
<i>S. Muenchen</i>	DHPS50393(-)	Umano
<i>S. Napoli</i>	DHPS50376(-)	Umano
<i>S. Newport</i>	DHPS50404(-)	Umano
<i>S. Panama</i>	DHPS50347(-)	Umano
<i>S. Saintpaul</i>	DHPS50415(-)	Umano
<i>S. Thompson</i>	DHPS50280(-)	Umano
<i>S. Typhimurium</i>	DHPS50414(-), DHPS 50384(-)	Umano
<i>S. Typhimurium</i>	DHPS50432(-)	Pesce fresco
<i>S. Veneziana</i>	DHPS50391(-)	Umano

–, nessuna inibizione; ?, chiara inibizione (8–10 mm diametro); ??, bassa inibizione ([10 mm diametro). I ceppi in coltura provengono da: DHPS Department of Health Promotion Sciences “G. D’Alessandro” (Palermo, Italy); ATCC American Type Culture Collection (Manassa, VA, USA).

I thujoni sono dei monoterpeni ossigenati comunemente presenti in numerose piante medicinali ed aromatiche quali *Salvia officinalis* (L.), *Salvia sclarea* (L.), *Assenzio gentile* (*Artemisia absinthium* L.) e *Tanaceto comune* (*Tanacetum vulgare* L.); questi composti sono presenti anche in alcuni bevande alcoliche, ma il loro isomero beta è ritenuto tossico per il consumo umano (European

Commission 2003, National Toxicology Program 2010). L'uso del thujone è soggetto pertanto a molte restrizioni, anche se la quantità generalmente presente nelle bevande e negli alimenti risulta essere 100 volte inferiore alla dose a cui si presentano i primi sintomi da intossicazione (NOEL: no observed effect level; European Commission 2003; Patočka e Plucar, 2003). Il secondo composto maggioritario è il camazulene, un idrocarburo sesquiterpenico caratteristico delle piante della famiglia delle *Asteraceae* come la camomilla e l'achillea (Franz e Novak, 2010; Wagner et al., 2005). Questo è conosciuto per le sue proprietà anti-infiammatorie (Salamon, 2009), che ne fanno un prodotto molto interessante dal punto di vista industriale.

Da quanto sopra detto si può comprendere l'interesse per l'olio essenziale di *Artemisia* come alternativa naturale agli additivi chimici con attività antibiotica. Lo spettro di inibizione che si è tentato di testare sulle più diffuse specie batteriche (*Enterobacteria*, *L. monocytogenes* e *Salmonella*) responsabili di intossicazioni alimentari (Crum-Cianflone, 2008, Healy et al., 2010, Swaminathan e Gerner-Smidt, 2007) ha consentito comunque di ricavare informazioni interessanti. Le specie Gram-negative (*Salmonella* spp. e *Enterobacter* spp.) si sono mostrate insensibili al trattamento con *Artemisia arborescens*, mentre le specie Gram-positive (*Listeria* spp.) si sono mostrate più sensibili. In effetti, la letteratura disponibile sull'argomento (Di Pasqua et al., 2005) riporta come la suscettibilità ai trattamenti con oli essenziali sia superiore nelle specie Gram-positive rispetto alle Gram-negative (Al-Reza et al., 2010; Calsamiglia et al., 2007, Davidson e Naidu, 2000), probabilmente a causa della presenza in queste ultime di una barriera impermeabile (Nikaido, 1994).

Anche altri componenti dell'olio essenziale di *A. arborescens*, quali cariofillene, cariofillene ossido, α -humulene e germacrene-D, sono noti per le loro potenzialità inibitorie della crescita di molti batteri patogeni (El-Sakhawy et al., 1998; Tewtrakul et al., 2005; Yuenyongsawad e Tewtrakul, 2005).

Le sopra citate potenzialità dell'olio essenziale di *A. arborescens* permetterebbero di ipotizzarne un possibile utilizzo industriale; in considerazione delle forti caratteristiche aromatiche di questo prodotto; resta ancora da verificare, tuttavia, la risposta del consumatore dal punto di vista organolettico.

12 ATTIVITA' FUNGICIDA

12.1 INTRODUZIONE

Fino al secolo scorso la lotta in campo fitopatologico era totalmente affidata ai prodotti di sintesi chimica, quasi sempre ad azione non selettiva. Senza voler affrontare in dettaglio tutti i problemi che l'utilizzo sconsiderato di questi prodotti provoca negli agro-ecosistemi e nell'ecosistema naturale, già a partire dall'ultimo decennio del XX secolo il settore della lotta a basso impatto ambientale ha cominciato a muovere i primi passi in direzione della ricerca di nuove sostanze di origine naturale.

Attualmente la razionalizzazione delle strategie di lotta, dalla lotta biologica a quella integrata, si basa sull'utilizzo di prodotti chimici ad elevata specificità e, in alcuni casi, anche di origine vegetale (Dayan et al., 2009). Se in campo entomologico troviamo già da decenni l'impiego di derivati vegetali (Isman, 2000) quali Piretro, Rotenone, Quassia e Azadiractina, in campo fitopatologico l'applicazione di prodotti di origine vegetale risulta ancora molto marginale, anche se bisogna precisare che la ricerca di principi attivi vegetali con attività fungitossica negli ultimi decenni, ha visto un evidente incremento di risorse investite. L'uso di prodotti naturali nella lotta fitopatologica si basa sullo studio degli aspetti tossicologici e sul mantenimento di un basso impatto ambientale (per esempio: selettività verso i vertebrati, selettività verso i nemici naturali e gli impollinatori, rapida degradazione ambientale) oltre che sulla determinazione dell'efficacia, della dose minima efficace e dello spettro d'azione dei principi attivi. Gli effetti di questi ultimi sono dovuti quasi sempre ad una miscela complessa di componenti piuttosto che un singolo principio attivo, con un'azione sinergica di efficacia superiore a quella che si potrebbe ottenere, con la stessa quantità, con il solo costituente più attivo isolato in purezza o sintetizzato (Isman, 2000).

Lo studio degli oli essenziali costituisce, quindi, una via di considerevole interesse per l'individuazione di sostanze con proprietà fungicide o fungistatiche, come già accertato per gli estratti ottenuti da Timo (*Thymus* spp.), Origano (*Origanum* spp.), Salvia (*Salvia officinalis* L.), Rosmarino (*Rosmarinum officinalis* L.), Geranio odoroso (*Pelargonium odoratissimum* L. L'Hér) (Isman, 2000; Salamone et al., 2009; Salamone et al., 2011).

Tra le specie vegetali i cui estratti sono dotati di proprietà inibenti, quelle appartenenti al genere *Artemisia* mostrano un'attività ad ampio spettro d'azione su svariati patogeni come *Colletrotichum* sp. (Meepagala et al., 2002 e 2003), *Fusarium* sp, *Rhizoctonia* sp., *Phytophthora* spp., *Alternaria* sp., *Verticillium* sp., *Pythium* spp., *Botrytis* sp. e *Penicillium* sp. (Farzaneh et al., 2006; Liu et al., 2001; Kordali et al., 2005; Abdelgaleil et al., 2008).

12.2 MATERIALI E METODI

Materiale vegetale ed olio essenziale

L'olio essenziale è stato ottenuto mediante le stesse procedure già presentate nei precedenti paragrafi, prelevando il materiale vegetale da popolazioni naturali presenti nella zona costiera nord della Sicilia (N

37°58'28", E 13°44'13", 10 m s.l.m e 38°06'47.74" N, 13°31'16.38" E, 31 m s.l.m.).

La strumentazione e le procedure utilizzate per le analisi e le metodiche di riconoscimento dei composti che caratterizzano l'olio essenziale di *Artemisia*, sono state le stesse applicate nelle prove presentate precedentemente.

Inibizione della crescita miceliale

La capacità inibente dell'olio essenziale di *A. arborescens* è stata valutata in vitro nei confronti di colonie fungine di *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* (isolato da garofano); *Verticillium dahliae* (isolato da pomodoro), *Phytophthora citrophthora* (isolato da agrumi) e *Botrytis cinerea*, patogeni fungini particolarmente diffusi sia in pieno campo che in serra. Il lavoro è stato svolto presso i laboratori del C.R.A.-S.F.M. (Unità di Ricerca per il recupero e la valorizzazione delle Specie Floricole Mediterranee, Bagheria (PA), Italia).

L'efficacia dell'olio essenziale nei confronti dei ceppi fungini è stata saggiata alle seguenti concentrazioni: 1x10; 1x 10², 5x10² e 1x10³ µg·ml⁻¹.

I saggi in vitro sono stati condotti adottando il metodo messo a punto da Grover e Moore (1961) per la preparazione di substrati contenenti sostanze tossiche. L'olio essenziale è stato diluito in etanolo (C₂H₅OH) e distribuito, in ragione di 100 µl, al centro di capsule Petri (Ø 90 cm) con l'ausilio di una pipetta a pistone (Pipettman, Gilson). Per ciascuna ripetizione sono stati utilizzati 20 ml di substrato (~ 50°C) a base di Potato-Dextrose-Agar (PDA) sterilizzato in autoclave (120°C/20 min ad 1 atm). Per distribuire uniformemente la sostanza da saggiare le piastre sono state poste in un agitatore orizzontale per 30 sec.

Per ogni tesi sono state effettuate 4 ripetizioni e ciascun saggio è stato ripetuto due volte. Le piastre utilizzate come controllo sono state preparate allo stesso modo aggiungendo al substrato etanolo o acqua distillata sterile.

Dopo 24 h, da colture di 6-7 gg di età allevate in PDA, è stato prelevato un frammento di micelio di 8 mm di diametro che è stato posto al centro di ogni piastra. Le piastre, infine, sono state sigillate con Parafilm® e incubate al buio alla temperatura di 22±1°C.

L'effetto inibente dell'olio essenziale di *Artemisia* è stato valutato misurando la crescita radiale delle colonie (media di due diametri ortogonali) dopo 3, 6 e 9 giorni. La percentuale di inibizione rispetto al controllo è stata calcolata applicando la formula di Zygadlo et al. (1994)¹.

I dati relativi all'accrescimento sono stati sottoposti ad analisi statistica utilizzando il programma SPSS 9.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) e le differenze tra le medie sono state confrontate utilizzando il test di Duncan (Gomez e Gomez, 1984).

¹ $I = 100(C-T)C^{-1}$. I = inibizione; C = controllo; T = diametro del fungo allevato nella sostanza tossica.

12.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

In tabella 12.3.1 vengono riportati i risultati delle analisi chimiche effettuate sull'olio essenziale proveniente da piante di *Artemisia* raccolte in siti diversi e indicati come tipo BC, B e C a seconda del contenuto di β -tujone e/o camazulene. Dalla tabella si evince che i tipi BC1 e BC2 contenevano sia β -tujone (31.09% e 35.80% rispettivamente) che camazulene (38,94% e 39,21% rispettivamente) in percentuali molto simili; il tipo B era caratterizzato dalla maggiore presenza di β -tujone (36.13%) rispetto al camazulene (14.67%) e, infine, il tipo C era costituito prevalentemente da camazulene (35.59%) con solo il 16.07% di β -tujone.

Tabella 12.3.1- Attività fungicida di olio essenziale di *A.arborescens* L.; composizione chimica dell'olio essenziale utilizzato nella prova di inibizione fungicida; BC :beta thuione e chamazulene tipo; B = beta thuione tipo; c= chamazulene tipo.

COMPOSTI	IK	BC1 %	BC2 %	B %	C %
<i>cis</i> -salvene	856	t	t	0.06	t
α -thujene	930	t	t	0.09	t
α -pinene	939	0.53	0.14	0.92	0.46
camphene	954	0.51	t	1.05	0.64
sabinene	975	2.56	1.84	4.63	1.45
β -pinene	979	t	t	0.10	t
myrcene	990	1.34	1.73	6.79	2.18
α -phellandrene	1002	0.13	0.12	0.17	0.45
α -terpinene	1014	0.64	0.53	0.94	0.23
ρ -cymene	1024	0.27	0.44	0.80	t
limonene	1029	0.13	t	0.36	0.25
<i>1,8</i> Cineole	1031	t	0.14	0.13	t
γ -terpinene	1054	1.43	1.26	3.24	1.18
<i>cis</i> -sabinene hydrate	1070	0.38	t	0.84	t
terpinolene	1088	0.19	0.21	0.20	0.16
α -thujone	1102	0.5	0.91	0.57	0.28
β-thujone	1114	31.09	35.80	36.13	16.07
camphor	1146	5.57	3.73	8.43	10.27
terpinen-4-ol	1177	1.58	2.68	1.37	1.70
terpineol-a	1188	0.06	0.18	0.35	t
carvacrol	1299	t	0.10	2.30	0.55
α -copaene	1376	t	0.20	0.09	0.51
β -bourbonene	1388	t	0.21	0.38	0.35
β -caryophyllene	1419	1.15	0.74	3.11	2.29
germacrene D	1484	3.44	2.62	4.47	4.78
caryophyllene oxide	1583	0.22	0.22	0.39	0.37
geranyl isovalerate	1607	0.49	t	0.31	0.49
chamazulene	1731	38.94	39.21	14.67	35.59

La tabella 12.3.2 mostra l'effetto inibente sull'accrescimento miceliare dei funghi saggianti da parte dell'olio essenziale di *Artemisia*.

I dati mostrano che i migliori risultati sono stati ottenuti alla concentrazione più alta ($1 \times 10^3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) e con l'olio essenziale camazulene-tipo che ha inibito l'accrescimento di colonie di *V. dahliae* del 65.2%, quelle di *F. oxysporum* del 40.35% e quelle di *P. citrophthora* del 34.51%, mentre alla concentrazione di $1 \times 10^2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ solo nel caso della *P. citrophthora* è stata evidenziata una inibizione pari al 30.99%. Anche nel saggio realizzato con l'olio denominato BC1 si sono avute discrete percentuali di inibizione su tutte le colonie

fungine rispetto a quello denominato BC2 che ha fatto registrare percentuali di inibizione sempre inferiori al 30% su tutti i patogeni e a tutte le concentrazioni.

Per quanto riguarda l'olio essenziale di tipo B (alto contenuto in β -tujone) la percentuale di inibizione maggiore si è avuta nei confronti delle colonie di *V. dahliae* (35%) seguite da *P. citrophthora* (24.58%) e *F. oxysporum* (22.32%) e sempre alla concentrazione più alta.

Le percentuali più alte di inibizione si sono avute comunque con gli oli essenziali caratterizzati dalla maggior presenza di camazulene. In bibliografia è riportato come il β -thujone pur essendo un composto molto tossico non sempre presenta attività fungicida, o se presente questa risulta comunque molto specifica (Kordali et al., 2005; Giordani et al., 2008), mentre la canfora risulta avere un più ampio spettro di azione come pure l'1-8 cineolo (Kordali et al., 2005; Farzaneh et al., 2006; Giordani et al., 2008; Zuzarte et al., 2011). Anche lo stesso β -cariofillene presenta una discreta attività fungicida, soprattutto nei confronti di *Fusarium* sp. (Kordali et al., 2005; Zuzarte et al., 2011). Questo potrebbe spiegare la migliore attività degli oli ad alto camazulene, con un più alto titolo in canfora (10.2%), e del tipo BC1 rispetto al BC2 (5.5 % di canfora contro il 3.7%)

Va comunque precisato che l'attività inibente non è riconducibile alla sola azione di un composto bensì all'azione sinergica di più composti (Farzaneh et al., 2006; Giordani et al., 2008).

Tabella 12.3.2 - Attività fungicida di olio essenziale di *A.arborescens* L.; effetto inibitorio sullo sviluppo del micelio di alcuni patogeni d'interesse agrario. Sono stati provati oli con differente composizione chimica per presenza di β -thujone e chamazulene.

Funghi	10 μ l/ml-1 Inibizione (%)	100 μ l/ml-1 Inibizione (%)	500 μ l/ml-1 Inibizione (%)	1000 μ l/ml-1 Inibizione (%)
BC 1				
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>dianthii</i>	5.56	17.91	27.72	40.43
<i>Verticillium dahliae</i>	15.84	22.97	6.25	28.4
<i>Phytophthora citrophthora</i>	17.75	29.53	17.52	35.53
<i>Botrytis cinerea</i>	8.56	18.36	0	37.16
BC 2				
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>dianthii</i>	0.0	7.59	4.43	8.23
<i>Verticillium dahliae</i>	0.0	2.9	2.94	11.8
<i>Phytophthora citrophthora</i>	0.0	29.57	1.34	0.0
β-tujone				
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>dianthii</i>	0.0	3.57	15.18	22.32
<i>Verticillium dahliae</i>	0.0	5.0	0	35.0
<i>Phytophthora citrophthora</i>	0.0	1.69	11.86	24.58
Chamazulene				
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>dianthii</i>	0.0	3.57	19.3	40.35
<i>Verticillium dahliae</i>	0.0	17.4	14.13	65.2
<i>Phytophthora citrophthora</i>	0.0	30.99	16.9	34.51

13 ATTIVITA' ERBICIDA

13.1 INTRODUZIONE

Con il termine allelopatia si intende tutto l'insieme di fenomeni di interferenza tra specie vegetali, legati ai meccanismi chimici del metabolismo secondario, che causano una variazione nella vitalità della pianta e/o nella germinazione dei semi (Dudai et al., 1999). Il termine deriva dal greco *allelo* (uno verso l'altro) e *pathos* (sofferenza); può riguardare relazioni seme-seme, pianta-seme oppure pianta-pianta e può essere mediata dalle radici, dalle foglie oppure da sostanze volatili emesse da organi epigei o ipogei (Vicidomini, 2007).

Lo sfruttamento di questo fenomeno naturale rappresenta un bacino molto interessante di informazioni per lo studio della gestione delle infestanti, poiché negli ultimi anni le strategie basate soltanto sull'utilizzo degli erbicidi di sintesi con molecole sintetiche sempre più complesse hanno portato all'insorgenza di diffusi fenomeni di selezione di specie infestanti resistenti oltre ad incrementare i rischi ambientali legati alla salute dell'ecosistema e dell'uomo (Verdeguer et al., 2009). Nell'ultimo ventennio, gli studi sull'allelopatia si sono intensificati, consentendo di individuare in molti estratti naturali, tra cui gli oli essenziali, dei potenziali strumenti di controllo della flora infestante (Duke et al., 2002).

Nella frazione terpenica degli oli essenziali sono stati scoperti diversi composti con attività fitotossica in grado di inibire la germinazione dei semi o la crescita di alcune specie di piante (Angelini et al., 2003; Dudai et al., 1999; Tworkoski, 2002). Tra i monoterpeni, i più comuni composti ad attività erbicida sono α - and β -pinene, camphene, limonene, α -phellandrene, *p*-cymene, borneolo e canfora (Angelini et al., 2003), mentre i più attivi appartengono al gruppo dei cineoli (Duke et al., 2002). In piante quali *Laurus nobilis* L., *Salvia* spp., *Eucalyptus* spp. e *Artemisia* spp., l'1,8-cineolo è stato segnalato come uno dei più potenti allelochimici mentre l'1,4-cineolo presente in varie specie di *Artemisia*, pur essendo molto potente non è stato trovato in concentrazioni sufficienti (Duke et al., 2002). Recentemente è stato dimostrato come la struttura chimica dell'1,4-cineolo sia analoga a quella dell'erbicida *cinmethylin*, un potente inibitore della asparagina-sintetasi (Romagni et al., 2000). I sesquiterpeni invece sono costituiti da molecole più grandi dei monoterpeni e presentano diverse attività biologiche, tra le quali anche quelle erbicide; prove effettuate incorporando nel terreno foglie secche di *A. annua* hanno dimostrato come, a prescindere dal quantitativo di artemisina presente nella massa vegetale, si otteneva un buon controllo delle specie infestanti (Duke et al., 2000).

All'interno del genere *Artemisia* sono state individuate ben 15 specie (*A. absinthium*, *A. afra*, *A. annua*, *A. californica*, *A. campestris*, *A. cana*, *A. capillaris*, *A. filifolia*, *A. herba-alba*, *A. nova*, *A. princeps*, *A. taurica*, *A. tridentata*, *A. tripartita* e *A. vulgaris*) con effetti allelopatici su numerose specie botaniche, alcune anche di grande importanza agronomica. Le specie maggiormente indagate da questo punto di vista che subiscono (in campo o in laboratorio) gli effetti allelopatici di *Artemisia*, sono appartenenti alle famiglie botaniche delle *Amaranthaceae*, *Asteraceae*, *Brassicaceae*, *Graminaceae*, *Papilionaceae* e *Solanaceae*, *Araceae*, *Cistaceae*, *Cucurbitaceae*, *Linaceae*, *Onagraceae*, *Pinaceae*, *Plantaginaceae*, *Portulacaceae* e *Violaceae* (Vicidomini, 2007).

13.2 MATERIALI E METODI

Germinazione dei semi

La prova è stata svolta presso i laboratori di botanica dell'Istituto Agroforestal Mediterraneo dell'Università Politecnica di Valencia nel periodo compreso tra il marzo ed il settembre 2010. La procedura adottata per la prova è stata quella suggerita dalla bibliografia (Dudai et al., 1999; Angelini et al., 2003; Escudero et al., 2000). Le specie target sono state selezionate all'interno di una lista costituita dalle specie infestanti di interesse agrario comuni agli ambienti Spagnoli (Valencia) e Italiani (Sicilia), individuando tra queste quelle che permettevano una maggior disponibilità di seme per le prove. I semi delle specie infestanti scelte sono stati raccolti da piante spontanee in fase di disseminazione. Una volta selezionati sono stati posti a germinare in capsule Petri del diametro di 10 cm, tra due strati di carta da filtro (Whatman No. 3) imbibiti con 4 ml di acqua distillata. In ogni piastra sono stati posti 20 semi nel caso di *Portulaca* e *Conyza* e 10 semi nel caso di *Araujia*. Le piastre sono state poste in incubazione a 27 °C al buio o a 25°C con un fotoperiodo (rapporto luce/buio) di 18/6 ore. La prova di inibizione della capacità germinativa è stata effettuata distribuendo, con l'ausilio di micro-pipette calibrate, micro quantità prefissate di olio essenziale sul disco di carta imbevuto che copriva i semi; ogni tesi è stata replicata 5 volte per *Portulaca* e *Conyza* e 10 volte per *Araujia*. Dopo 3, 6 e 10 giorni sono stati contati i semi germinati e misurati, ove presenti, gli accrescimenti di radici e germogli.

13.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

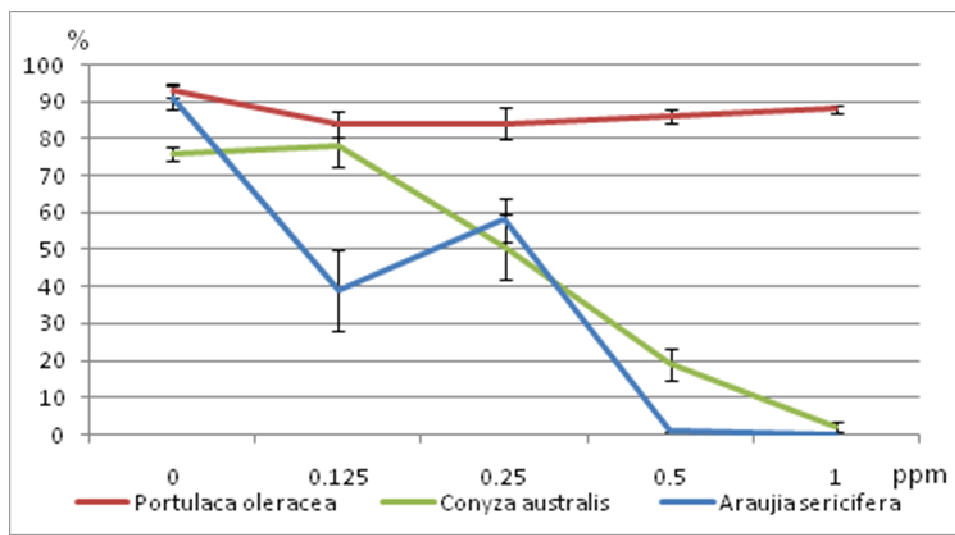
I dati sulla germinazione delle specie infestanti mostrati nella Tabella 13.3.1 mostrano come la presenza dell'olio essenziale di *A.arborescens* inibisca la germinazione solo alle dosi più elevate e solo su due specie su tre.

E' evidente come la *Portulaca oleracea* non venga significativamente influenzata dalla presenza dell'olio essenziale; già altri autori hanno riportato un'elevata tolleranza della *Portulaca* ai trattamenti con oli essenziali (Verdeguer et al., 2009). I dati più incoraggianti sono quelli riferiti alla *Araujia sericifera* dove alle dosi di 0.5 e 1 ppm l'effetto antigerminativo risulta essere totale. Anche su *Conyza australis*, alle stesse dosi, l'olio mostra un buon effetto con una riduzione della germinazione dell'81% e 98% rispettivamente per le dosi 0.5 e 1 ppm. (Fig 13.3.1)

Tabella 13.3.1 Attività antigerminativa di olio essenziale di *A.arborescens* L.; germinazione e accrescimento di semi di essenze infestanti trattate con olio essenziale di *A.arborescens*. E' evidente l'efficacia del trattamento nelle due dosi più elevate; dati percentuali da medie di 100 semi.

Trattamenti (ml/ml) <i>Artemisia arborescens</i> L.	<i>Araujia</i> <i>sericifera</i>	<i>Portulaca</i> <i>oleracea</i>	<i>Conyza</i> <i>australis</i>
0	91 ± 3.14	93 ± 2.00	76 ± 1.87
0.125	39 ± 11.20	84 ± 3.32	78 ± 5.61
0.25	58 ± 6.11	84 ± 4.30	51 ± 8.86
0.5	1 ± 0.00	86 ± 1.87	19 ± 4.30
1	0 ± 0.00	88 ± 1.22	2 ± 1.2

Figura 13.3.1- Attività antigerminativa di olio essenziale di *A.arborescens* L.; effetto dell'olio essenziale sulla germinazione di semi di alcune specie infestanti. E' possibile notare la marcata resistenza della *Portulaca* al trattamento.



Informazioni ancora più interessanti sono ricavate dalla prova di accrescimento.

I semi di *Araujia sericifera*, posti a germinare in presenza di dosi di olio essenziale anche minime (0.125 ppm), pur riuscendo talvolta a produrre la radichetta non sono in grado di formare una plantula autonoma (tabella 13.3.2)

Su *Conyza australis* l'effetto dell'olio essenziale sull'accrescimento si manifesta solo nelle ultime due concentrazioni, e le plantule mostrano uno sviluppo scarso e inadeguato.

Come evidenziato da altri autori, per controllare lo sviluppo delle infestanti è sufficiente che le plantule vengano sottoposte a un forte stress (Angelini et al., 2003; Dudai et al., 1999).

Tabella 13.3.2- Attività antigerminativa di olio essenziale di *A.arborescens* L.; accrescimento espresso in cm delle plantule dei infestanti sottoposte al trattamento con olio essenziale. E' possibile notare come le due specie evidenzino una forte sensibilità al trattamento già alla dose di 0,25 ppm.

	CONYZA AUSTRALIS						ARAUJA SERICIFERA					
	+3		+5		+7		+3		+5		+7	
	Media	E.S.	Media	E.S.	Media	E.S.	Media	E.S.	Media	E.S.	Media	E.S.
Control	0.25	± 0.11	3.31	± 1.36	3.66	± 1.62	0.50	± 0.32	1.60	± 0.79	5.38	± 1.38
0.125	0.73	± 0.22	2.80	± 1.14	3.65	± 1.54	0.04	± 0.04	0.04	± 0.04	0.06	± 0.06
0.25	0.16	± 0.16	2.18	± 1.33	2.46	± 1.20	0.01	± 0.01	0.11	± 0.11	0.28	± 0.23
0.5	0.00	± 0.00	0.79	± 0.79	0.90	± 0.90	0.04	± 0.03	0.09	± 0.06	0.12	± 0.09
1	0.00	± 0.00	0.00	± 0.00	0.00	± 0.00	0.05	± 0.05	0.06	± 0.06	0.06	± 0.06

In conclusione si può affermare che l'olio essenziale di *A.arborescens* risulta molto efficace per il controllo in vitro della germinazione e dello sviluppo di *Araujia sericifera*, mentre su *Conyza* il controllo sembra essere inadeguato ai fini di una sua applicazione pratica.

14 ATTIVITA' INSETTICIDA

14.1 INTRODUZIONE

La gestione fitosanitaria delle avversità biotiche di tipo entomologico è stata largamente dominata dalla presenza di fitofarmaci di sintesi chimica a partire dagli anni '50 fino all'inizio del secolo corrente. L'uso indiscriminato di questi prodotti, tuttavia, ha ben presto causato l'insorgenza di gravi fenomeni di resistenza ed di inquinamento ambientale (Jeppson et al., 1958).

In questi ultimi anni l'aumento della sensibilità ambientale collettiva ha generato la richiesta di alimenti provenienti da itinerari tecnico-agronomici a basso impatto ambientale, basati sul rispetto dei naturali equilibri presenti all'intero dell'ecosistema agrario e sull'utilizzo di fitofarmaci di origine naturale (Dayan et al., 2009; Rongai et al., 2008). La ricerca di questo tipo di prodotti inizia già a partire dalla fine della seconda guerra mondiale (Carl e Deyton., 2001), anche se sono pochissimi i prodotti ad entrare realmente negli itinerari tecnici come nel caso della nicotina (da *Nicotiana tabacum* L.), del piretro (da *Chrysanthemum cinerariifolium* L.), del rotenone (da *Derris* spp. and *Lonchocarpus* spp.) e dell'azadiractina (dall'albero di Neem, *Azadirachta indica*) (Pascual-Villalobos e Robledo, 1998; Macedo et al., 1997; Isman, 2000).

Lo studio delle potenzialità degli oli essenziali spazia dall'attività antimicrobica utilizzata nella fitomedicina all'attività antimicotica ed insetticida per gli ecosistemi agrari (Isman, 2006; Machial et al., 2010). In quest'ultimo settore le famiglie botaniche più studiate sono senz'altro le *Lamiaceae* e le *Asteraceae* (Singh et al., 2009). Il genere *Artemisia* ricopre un ruolo molto importante grazie agli studi effettuati da diversi autori su numerosi target quali *Tribolium castaneum*, *Callosobruchus maculatus*, *Sitophilus oryzae* e *Bruchus rugimanus*, con applicazioni sia di tipo topico che come fumigante (Wang et al., 2006; Tripathi et al., 2000; Negahban et al., 2006 a,b; Liu et al., 2006).

La cocciniglia rossa forte degli agrumi (California red scale - *Aonidiella aurantii*; Hemiptera – Coccoidea), è una cocciniglia molto diffusa negli ambienti agrumicoli mondiali che, in caso di abbondante infestazione, arreca ingenti danni alle piante ed alle produzioni, e conseguentemente economici (Yarom et al., 1988). Il controllo chimico di questa avversità biotica è reso difficile dallo scudo impermeabile che protegge l'insetto ostacolando l'azione di molte molecole chimiche, che in mancanza di una selettività specifica, esercitano un effetto molto limitato sull'insetto mentre hanno un forte effetto abbattente sulla entomofauna utile, ottenendo in alcuni casi un incremento della popolazione di cocciniglia (Forster et al., 1995; Bedford, 1996; Levitin e Cohen, 1998; Collins et al., 2007; Grafton-Cardwell et al., 2001; Vehrs et al., 1994; Martínez et al., 2005). Studi specifici hanno stabilito che il miglior prodotto per il controllo di questa avversità risulta essere l'olio minerale applicato nei primi stadi di infestazione quando la cocciniglia non ha ancora sviluppato lo scutello protettivo impermeabile; tuttavia, se in un primo momento l'olio minerale sembrava aver risolto i problemi di contenimento di questo insetto, successivamente si è notato come con l'uso ripetuto e a dosi elevate, l'olio minerale crei problemi di fitotossicità sulle piante.

La miscela di olio minerale con insetticidi fosfororganici, applicata nel corretto periodo di sviluppo dell'insetto,

ha fornito risultati molto incoraggianti (Beatty et al., 2002; Chen et al., 2009; Mennone, 2006; Miret e Garcia-Marì, 2001; Rhiel et al., 1959). Emerge così l'esigenza di trovare dei prodotti sostitutivi dei fosfororganici, che ne possano permettere l'eliminazione dalle formulazioni insetticide riducendo al contempo il più possibile la dose di olio minerale, allo scopo di scongiurare i fenomeni di fitotossicità.

L'olio essenziale di *A. arborescens* è caratterizzato dalla presenza di β -thujone, canfora e germacrene D, già noti per la loro attività insetticida (Noge e Becerra, 2009); si è quindi pensato di verificare l'efficacia di questo prodotto in miscela con olio minerale nel controllo dell'*Aoenidiella* con l'obiettivo di sostituire i fosfororganici e ridurre la dose di olio minerale necessaria ad ottenere un buon controllo dell'insetto nella fase in cui l'insetto è maggiormente suscettibile ai trattamenti, corrispondente al momento del primo stadio (L1) in cui l'insetto passa dallo stato di *White cup* alla fase di prima mutazione (*first molt*) (Fig 14.1.1).

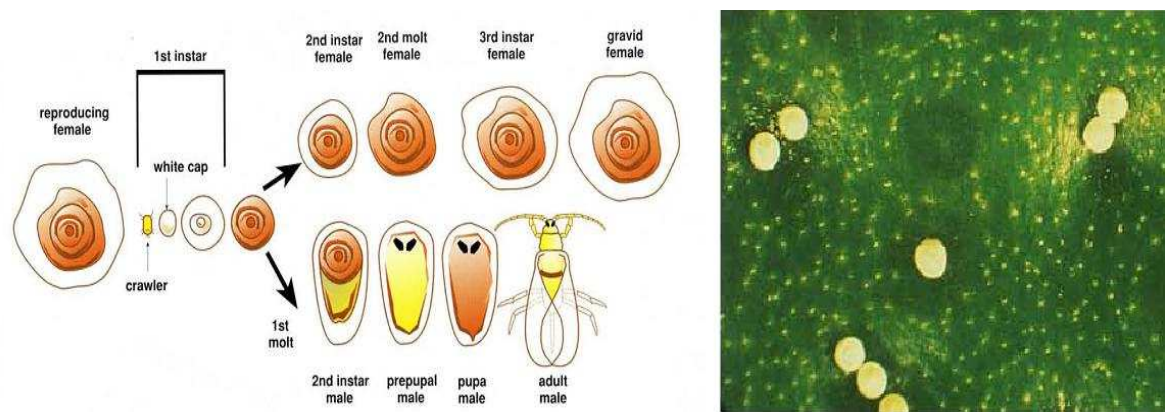


Figura 14.1.1 - Ciclo vitale di *Aoenidiella aurantii*. Sulla sinistra viene schematizzato il ciclo di vita a partire dall'individuo femmina in fase di deposizione dell'uovo. Il primo stadi di sviluppo, detto mobile, termina non appena l'individuo si fissa sulla buccia del frutto. Da quel momento si avvia la seconda fase di sviluppo che vede la differenziazione degli individui in base al sesso. La fase di maggior vulnerabilità dell'insetto ai trattamenti si trova all'interno del primo stadio di sviluppo prima del passaggio (molt) al secondo stadio di sviluppo.

14.2 MATERIALI E METODI

Predisposizione del dispositivo di infestazione artificiale (DIAR).

La prova è stata svolta presso i laboratori di entomologia dell'Istituto Agroforestal del Mediterraneo dell'Università Politecnica di Valencia, nel periodo compreso tra il maggio ed il settembre 2010. In fase preliminare, con l'obiettivo di disporre di un'unica generazione sincronizzata di *Aonidiella aurantii* su cui effettuare i successivi trattamenti, nel comprensorio di Valencia alcuni frutti di arancia che presentavano una consistente infestazione di femmine adulte fecondate sono stati prelevati da un aranceto non sottoposto ad alcun trattamento. Il dispositivo di infestazione artificiale (DIAR) utilizzato per la prova è composto da una

cassa in materiale plastico coperta da uno strato di carta d'alluminio con la funzione di rifrangere la luce all'interno creando un effetto di luce diffusa. Sul fondo della cassa sono stati poste le arance selezionate per fungere da fonte di infestazione, poste sopra un foglio di carta per evitare che sul fondo della cassa si potesse condensare l'umidità. Al di sopra di questo primo strato di frutti sono stati disposti i frutti puliti da destinare all'infestazione controllata. A quest'ultimo scopo sono stati utilizzati frutti di limone ancora immaturi, di colorazione verde uniforme ma con diametro longitudinale superiore a 10 cm, che precedentemente erano stati lavati con sapone e poi asciugati all'aria.

Il dispositivo è stato infine chiuso utilizzando della carta bianca opaca, su cui sono stati praticati dei fori di circa 5 cm di diametro.

Al termine di queste operazioni preliminari, il DIAR veniva posto in camera termostata a 28 °C con una U.R. del 70% ed un fotoperiodo di 18/6 ore (luce/buio). Dopo 10 giorni, allo scopo di favorire un'infestazione omogenea sull'intera superficie dei frutti, questi venivano ruotati di 180°, permettendo agli insetti di colonizzarne anche la parte superiore. In questo modo, in soli 20 giorni e con un limitato impiego di risorse, sono stati ottenuti dei frutti omogeneamente infestati sia in termine di superficie colonizzata che di età degli individui, su cui sono stati effettuati i successivi trattamenti con le miscele insetticide.

Preparazione delle miscele

L'olio essenziale di *Artemisia arborescens* utilizzato per la prova è stato ottenuto per distillazione in corrente di vapore di materiale vegetale proveniente da piante presenti allo stato spontaneo nel territorio di Trabia (PA), che al momento della raccolta (primavera 2010) si trovavano allo stadio vegetativo. Il processo di distillazione, condotto per 3 ore, ha consentito di ottenere una resa di 0.32 (% v/w) di un olio di colore blu intenso e dal tipico odore balsamico. L'olio ottenuto è stato sottoposto ad analisi GC-MS, risultando caratterizzato dalla presenza di camazulene (32.86 %), β -thujone (28.21 %), canfora (9.52 %) e germacrene D (2.98 %), (Tab 14.2.1).

L'individuazione della corretta metodologia di emulsione per l'ottenimento di una formulazione omogenea e stabile nel tempo ha richiesto diversi tentativi. Volendo escludere da subito saponi da laboratorio quali *Tween 20* e *Tween 80* e solventi organici quali acetone ed etanolo, le prove di emulsione sono state effettuate con sapone di Marsiglia (prodotto di origine vegetale) e con lecitina di soia, provando l'emulsione sia a caldo (40°C) che a freddo. I risultati migliori sono stati ottenuti a freddo con la lecitina di soia. Per le prove successive, pertanto, è stata utilizzata un'emulsione di olio essenziale di *A. arborescens* ottenuta ponendo in 100 ml di acqua distillata una dose ridotta (0.1% w/v) di lecitina di soia in polvere ("Vigor", Santiveri, Madrid, Spagna), agitando energicamente l'emulsione per 60-100 secondi (fino al completo scioglimento della polvere), aggiungendo in seguito l'olio essenziale nelle dosi previste dal protocollo sperimentale ed agitando energicamente per 3 minuti. La miscela così ottenuta veniva addizionata a comune olio minerale (Laincoil-Lainco, Barcelona, Spagna), ottenendo così i trattamenti che sono stati sottoposti alla verifica sperimentale.

Tabella 14.2.1 Attività insetticida dell'olio essenziale di *A. arborescens* L.; composizione chimica dell'olio utilizzato nelle prove su *Aoenidiella aurantii*.

Composti	IK	t		
<i>cis</i> -salvene	856	t		
α -thujene	930	0.24	±	0.02
α -pinene	939	0.92	±	0.1
camphene	954	0.83	±	0.37
sabinene	975	3.25	±	0.41
β -pinene	979	t		
myrcene	990	2.05	±	0.71
α -phellandrene	1002	0.17	±	0.12
α -terpinene	1014	0.86	±	0.17
p -cymene	1024	0.30	±	0.02
limonene	1029	0.20	±	0.11
<i>l,8</i> cineole	1031	0.17	±	0.01
γ - terpinene	1054	2.20	±	0.06
<i>cis</i> -sabinene hydrate	1070	1.22	±	0.02
linalol	1096	t		
terpinolene	1088	0.22	±	0.04
methyl butil 2 methyl hydrate	1100	0.53	±	0.22
α -thujone	1102	0.58	±	0.44
β -thujone	1114	32.23	±	1.21
menth-2-en-1-ol	1121	t	±	
camphor	1146	8.46	±	1.88
borneol	1169	0.19	±	0.02
terpinen-4-ol	1177	1.37	±	0.07
α -terpineol	1188	0.22	±	0.1
bornyl acetate	1288	t		
carvacrol	1299	1.74	±	1.01
α -Copaene	1376	t		
β -Bourbonene	1388	0.25	±	0.01
β -caryophyllene	1419	0.82	±	0.5
α -humulene	1454	t		
dehydro-sesquicineole	1471	0.20	±	0.01
germacrene D	1484	3.15	±	1.21
bicyclogermacrene	1500	t		
α -farsene	1505	t		
caryophyllene oxide	1583	t		
geranyl isovalerate	1607	0.24	±	0.05
chamazulene	1731	34.30	±	3.41
		96.90		

Esecuzione dei trattamenti

I trattamenti posti a confronto, costituiti da olio minerale, olio minerale addizionato di olio essenziale di *A. arborescens*, e un controllo con acqua, sono riportati in tabella 14.2.2. In ogni miscela sono stati immersi 10 frutti di limone per 3 secondi, successivamente seccati all'aria. Dopo il trattamento i frutti sono stati posti in camera termostata (T 28 °C, U.R. 70%, fotoperiodo 18/6 ore).

Tabella 14.2.2- Attività insetticida dell'olio essenziale di *A. arborescens* L.; sono state messe a confronto diverse formulazioni binarie di olio essenziale ed olio minerale.

Codice	Olio Minerale (%)	Olio essenziale di <i>A. arborescens</i> (%)
M05	0,5	acqua
M1	1	acqua
M2	2	acqua
M2A2	2	2
M1A1	1	1
M0,5A1	0,5	1

Esecuzione dei rilievi e trattamento statistico dei dati

Dopo 15 giorni dall'esecuzione dei trattamenti, è stata rilevata la mortalità di 50 individui di cocciniglia per ogni frutto, considerando morti gli individui che non avevano portato a termine il passaggio dal primo stadio di sviluppo al secondo.

Tutti i dati ottenuti sono stati trasformati in valori angolari e quindi sottoposti ad un'ANOVA preliminare, adoperando la procedura GLM messa a disposizione dal pacchetto statistico SAS per Windows v. 2.1 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA). Allo scopo di valutare l'effetto esercitato sulla mortalità degli insetti dall'aggiunta di olio essenziale di *A. arborescens* alla miscela insetticida, la differenza tra le medie dei trattamenti è stata apprezzata applicando il test HSD di Tukey per $P \leq 0.05$; per effettuare una comparazione tra i principali gruppi sperimentali è stata invece adoperata la tecnica dell'analisi dei contrasti ortogonali, raggruppando tutti i dati negli insiemi più significativi (Gomez e Gomez, 1984).

14.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

Effetto dell'olio minerale sulla mortalità

L'applicazione di olio minerale è ancora oggi una strategia ampiamente diffusa per il controllo di *A. aurantii* sugli agrumi. Dal grafico 14.3.1 che mostra i valori percentuali della mortalità in *A. aurantii* rilevata in tutti i trattamenti, è possibile in primo luogo notare come l'unica tesi statisticamente non differente dal controllo non trattato (C) risulti la M0,5 (olio minerale alla dose dello 0,5 %), in cui la mortalità degli insetti è solo lievemente superiore (+3.6%) alla mortalità naturale. Un effetto abbastanza marcato si nota invece raddoppiando la dose (M1, olio minerale all'1%), trattamento in cui si ottiene una differenza significativa rispetto al controllo (+35.6%). I risultati più elevati sono stati ottenuti con la dose massima ammissibile di prodotto (M2, olio minerale al 2%), in cui è stata registrata una mortalità molto elevata (+43.2%), anche se a

questa dose è molto probabile la comparsa di sintomi da fitotossicità soprattutto su frutti di arancia nel periodo estivo (Riehl et al., 1959; Rongai et al., 2008). E' stato comunque possibile confermare l'efficacia dei trattamenti a base di olio minerale alla dose massima e media, nonché l'opportunità di effettuarli nella fase corretta di sviluppo dell'insetto.

Tabella 14.3.1- Attività insetticida dell'olio essenziale di *A. arborescens* L.; attività insetticida su *Aoenidiella aurantii*; mortalità espressa in percentuale su 500 individui.

Tests	Olio Essenz. %	Olio Min. %	Mortalità %	Err. Std.	Sign.
Controllo	-	-	44.9	± 1.718	
M2	-	2	88.1	± 3.138	***
M1	-	1	80.5	± 3.668	***
M0,5	-	0.5	48.5	± 2.919	n.s.
M2 A2	2	2	97.8	± 1.931	***
M1 A1	1	1	97.4	± 1.570	***
M0,5 A1	1	0.5	78.1	± 1.020	***
M vs C					***
A vs C					***
A vs M					***
M05A1 vs C					***
M05A1 vs M05					***

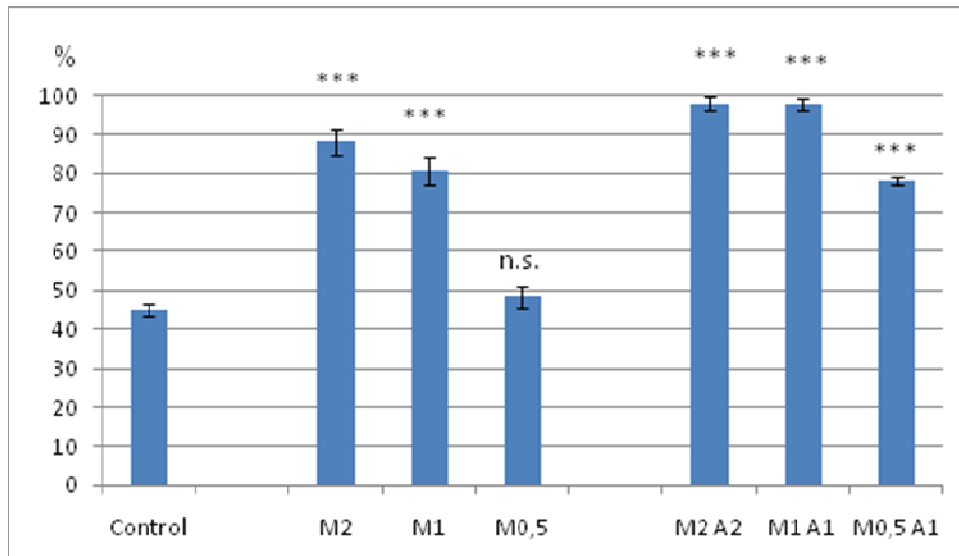
Effetto della miscela con olio essenziale di Artemisia sulla mortalità

La formulazione a base di olio minerale miscelato con olio essenziale di *A.arborescens* alla dose massima (M2A2, 2% di olio minerale + 2 % di olio essenziale di *Artemisia*) evidenzia una mortalità molto elevata (97,8%) e comunque superiore a quanto ottenuto dal solo trattamento con olio minerale (88.1%). Con il dimezzamento delle dosi sia di olio minerale che di olio essenziale sono stati ottenuti risultati molto interessanti; rispetto al trattamento con solo olio minerale (80.5%), infatti, l'aggiunta dell'olio essenziale in formulazione ha causato una mortalità quasi totale dell'insetto (97,4 %). In linea generale, l'aggiunta di olio essenziale di artemisia sembra potenziare l'effetto del trattamento con oli minerali: l'analisi dei contrasti ortogonali mostra infatti un incremento altamente significativo ($P \leq 0.001$) del livello complessivo di mortalità passando dai trattamenti con solo olio minerale (in media 75.8 %) ai trattamenti con aggiunta di olio essenziale di artemisia (in media 93.2 %).

L'esperimento si è concluso con l'applicazione di una formulazione costituita dalla minima dose di olio minerale, come da obiettivo prefissato, al fine di individuare l'efficacia della formulazione.

I risultati ottenuti sono stati molto incoraggianti (+23.2%) evidenziando come il controllo risulta essere più efficace della sola somministrazione di olio minerale in dose minima (0,5%) e non significativamente differente dalla dose media (1%) (fig. 14.3.2)

Figura 14.3.2- Attività insetticida dell'olio essenziale di *A. arborescens* L.; mortalità di *Aoenidiella aurantii* trattata con una miscela binaria di olio minerale ed olio essenziale di *A.arborescens* L.; le barre verticali rappresentano l'errore standard di ogni media; gli asterischi rappresentano la significatività della differenza rispetto al controllo (***) = differenza significativa per $P \leq 0.001$; n.s. = differenza non significativa)".



CONCLUSIONI E PROSPETTIVE DI RICERCA

Il lavoro sin qui svolto costituisce un'analisi preliminare delle potenzialità biocide di *Artemisia arborescens* L., una Asteracea arbustiva diffusamente presente negli ambienti Mediterranei, la cui valorizzazione, indirizzata verso una possibile introduzione della specie nell'ambito delle colture di interesse industriale, potrebbe costituire una risorsa economica non indifferente per numerose aree marginali o a rischio di marginalizzazione. A questo scopo, è stata in primo luogo esaminata la composizione chimica dell'olio essenziale della specie e sono stati sottoposti a valutazione quei fattori che possono determinarne variazioni più o meno ampie.

Fitochimica

Gli studi condotti sull'olio essenziale ottenuto per distillazione in corrente di vapore hanno permesso di chiarire alcuni aspetti:

- sulla base dei dati riportati in bibliografia e di quelli ottenuti da questo studio è possibile affermare che i marker specifici dell'olio essenziale di *Artemisia arborescens* L. sono il camazulene ed il β thujone, sempre presenti nell'olio come composti maggioritari. Questi possono essere presenti in diversi rapporti reciproci, originando quelli che attualmente sono ipotizzati come chemiotipi.
- Il confronto tra differenti ambienti di crescita non ha fatto emergere differenze significative tra questi, evidenziando una buona "stabilità" della specie; solo in un caso la composizione chimica è risultata differente sia relativamente ai composti principali che riguardo a quelli secondari. In quest'ultimo caso è possibile ipotizzare la presenza di un chemiotipo differente, ma la validazione dell'ipotesi richiede ulteriori approfondimenti di tipo sia chimico che fisiologico e soprattutto genetico.
- La fase fenologica della pianta risulta influenzare in maniera significativa la frazione monoterpenica dell'olio, che in fase di fioritura risulta quantitativamente più elevata (69.01% contro il 61.80% rilevato in fase vegetativa).
- Il tempo di distillazione influenza in modo sostanziale la composizione chimica e la resa, in considerazione del fatto che i primi 60 minuti del processo forniscono una resa già superiore al 70% del totale, con produzione di un olio essenziale ricco di monoterpeni ma scarsamente dotato della frazione sesquiterpenica, che essendo più pesante richiede un tempo di estrazione più lungo. Per ottenere una buona composizione qualitativa dell'olio essenziale ed un buon rendimento complessivo, il processo di distillazione può interessare l'intera pianta e deve preferibilmente completarsi in 120 minuti.

Germinabilità del Seme

La prova effettuata per studiare le condizioni ottimali di temperatura ed illuminazione per la germinazione della specie ha consentito di concludere che:

- il processo di germinazione risulta essere abbastanza omogeneo sia in condizioni di luce che di buio, mostrando un T.M.G (Tempo Medio di Germinazione) alla luce di 8.3 giorni (6.9-9.8 giorni), e nel caso della germinazione al buio oscillante tra 7.7 e 9.5 giorni.
- Il range ottimale di temperatura è risultato molto ampio e compreso tra i 5 ed i 10°C in condizioni di luce, e di 5 e 10°C in condizione di oscurità; mentre al di sopra dei 20 °C la percentuale di germinazione sembra ridursi significativamente.
- Dal punto di vista ecologico, sembra così trovare una motivazione il fatto che in natura le giovani piante di *A. arborescens* si ritrovano in maggior numero in primavera e in autunno, quando cioè le temperature si aggirano intorno ai 10 °C, mentre a temperature superiori, tipiche della stagione estiva, i flussi di emergenza vengono parzialmente inibiti.

Radicazione delle talee

La prova, mirata ad individuare un protocollo di produzione per piantine ad uso vivaistico, ha preso in considerazione diversi periodi di raccolta del materiale propagativo, diversi substrati di radicazione e l'uso di un ormone radicante (NAA) sulla percentuale di attecchimento; fornendo importanti informazioni:

- Il periodo di prelevamento del materiale di propagazione con la più elevata percentuale di attecchimento è stato quello invernale con una radicazione pari al 40%.
- L'uso di substrati diversi e la somministrazione di ormone radicante non influenzano significativamente il processo di radicazione.

Prova di coltivazione

Il trasferimento in pieno campo di piantine ottenute sia da seme che da talea ha permesso di studiare le fasi di adattamento della pianta alle condizioni di coltivazione; inoltre è stata effettuata una prova sull'altezza di taglio per la raccolta del materiale vegetale da avviare al processo di estrazione dell'olio essenziale

- La specie sembra adattarsi piuttosto bene alla coltivazione in pieno campo, anche in condizioni di input tecnici limitati. L'attecchimento delle piantine è rapido ed omogeneo, e al momento non sembrano sussistere problemi di ordine fitosanitario degni di rilievo.
- Le piante ottenute da seme risultano, rispetto a quelle ottenute per talea, caratterizzate da una maggiore espansione in larghezza e in grado di fornire, al secondo anno dell'impianto, produzioni di biomassa complessivamente superiori.
- La produzione di biomassa è proporzionale alla severità del taglio, ma le piante sottoposte a un taglio più drastico consentono una produzione di nuova biomassa complessivamente superiore rispetto alle altre. Il fenomeno è probabilmente da porre in relazione con la rimozione nelle tesi sottoposte a taglio più basso di un numero di gemme piuttosto consistente, che permette alle restanti un livello inferiore di competizione per le risorse disponibili nella pianta.
- Data la maggiore presenza di biomassa di neo formazione, è da verificare l'ipotesi che fra le due modalità di taglio possano manifestarsi variazioni delle caratteristiche qualitative dell'olio essenziale.

Attività Antimicrobica

La verifica condotta sull'attività di *A. arborescens* nei confronti delle più diffuse specie batteriche (*Enterobacter*, *L. monocytogenes* e *Salmonella*) responsabili di intossicazioni alimentari, ha consentito di ricavare alcune interessanti informazioni:

- le specie Gram-negative (*Salmonella* spp. e *Enterobacter* spp.) si sono mostrate insensibili al trattamento con l'olio essenziale, mentre un maggior grado di sensibilità è stato osservato sulle specie Gram-positive (*Listeria* spp.).
- Le sopra citate potenzialità dell'olio essenziale di *A. arborescens* permetterebbero di ipotizzarne un possibile utilizzo industriale come conservante naturale nel settore alimentare; in considerazione delle forti caratteristiche aromatiche del prodotto, tuttavia, resta ancora da verificare la risposta del consumatore dal punto di vista organolettico.

Attività fungicida

Uno screening iniziale sull'attività inibente dell'olio essenziale sullo sviluppo miceliare di vari funghi d'interesse agrario (*Phytophthora*, *Verticillium*, *Botrytis*, *Penicillium*, *Rizoctonia*, *Fusarium* e *Pythium*), ha portato alla riduzione del campo d'indagine alle sole specie che si sono mostrate in qualche modo sensibile all'attività dell'olio (*Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthii*; *Verticillium dahliae*, *Phytophthora citrophthora* e *Botrytis cinerea*). Con l'obiettivo di circoscrivere il range di composti chimici a cui ricondurre l'attività inibitoria, sono stati messi a confronto 3 oli essenziali a composizione differente.

- Dei tre oli provati, quello con maggior presenza di camazulene ha provocato il maggior livello di

inibizione su *Verticillium*.

- L'attività d'inibizione sembra essere legata all'azione sinergica di più composti chimici quali canfora e β -cariofillene, mentre il β -tujone non ha prodotto effetto inibente su nessuna delle specie fungine provate.

Attività Erbicida

L'attività dell'olio essenziale di *A.arborescens* è stata provata su alcune specie infestanti tipiche degli agrumeti mediterranei (*Conyza*, *Araujia* e *Portulaca*) valutandone la capacità di inibizione sulla germinazione dei semi.

- Delle tre specie infestanti in prova solo due (*Conyza* e *Arauja*) hanno mostrato una certa sensibilità al trattamento mentre la *Portulaca* è risultata del tutto indifferente.
- Tra le dosi in prova (0.125, 0.250, 0.5 e 1 ppm), solo le più elevate hanno mostrato efficacia sull'attività germinativa inibendo completamente la germinazione; alla dose di 0.25 ppm si è invece ottenuta una inibizione pari al 50%, ma l'azione di controllo è stata mantenuta solo fino al terzo giorno di prova.
- Su *Araujia sericifera* l'olio essenziale ha portato ad una mancata germinazione dei semi nelle dosi più elevate mentre un evidente effetto sull'accrescimento della plantula è stato evidenziato già alle dosi più basse.

Attività Insetticida

- L'aggiunta di olio essenziale di *A. arborescens* sembra potenziare l'effetto del trattamento con oli minerali: e la specie sembra pertanto idonea a sostituire i prodotti fosfororganici anche quando l'olio essenziale viene inserito nella formulazione a dosi minime.

PROSPETTIVE DI RICERCA

L'ampio spettro d'indagine affrontato nel corso di questo studio ha sicuramente permesso di ottenere alcune importanti indicazioni operative ai fini della propagazione della specie e della valorizzazione delle sue potenzialità agronomiche, nonché di ampliare il panorama conoscitivo sulla specie riguardo all'attività biocida del suo olio essenziale.

La specie ha infatti confermato in larga parte le numerose e interessanti potenzialità suggerite dalla letteratura; alla luce dei risultati ottenuti, soprattutto nel settore microbiologico ed entomologico è auspicabile l'approfondimento delle linee di ricerca tracciate, con l'obiettivo di definire dosi e modalità di intervento con il livello di accuratezza richiesto dall'industria. Da non trascurare anche l'ampliamento dello screening dell'attività fungicida, che ha fornito risultati estremamente interessanti.

CONCLUSIONS AND FUTURE PROSPECTS

This work is a preliminary analysis of the biocidal potential of *Artemisia arborescens* L., a shrub from Asteraceae that is widely spread throughout the Mediterranean environments. The cultivation of such species with industrial purposes could be a considerable economic resource for many areas that are claimed to be “marginal” or “at risk of marginalization”. With this purpose, many aspects have been taken into consideration, firstly including the chemical composition of plant’s essential oil.

Phytochemistry

The studies about the essential oil of *A. arborescens*, obtained by steam distillation, allowed to elucidate a few points:

- Based on both literature data and data obtained from the present study, it was possible to state that specific chemical markers of the essential oil of *Artemisia arborescens* L. are chamazulene and β -thujone, always found in the oil as majority compounds. These compounds can be retrieved at various reciprocal ratios, suggesting the hypothesis that in such species diverse chemotypes may be found.
- The comparison between essential oils obtained from plants grown in different areas did not show significant differences, showing a good "stability" of the species; in one case only, the chemical composition was rather different with respect to all other oils, with differences concerning both main and secondary compounds. This allowed to hypothesize the occurrence of a different chemotype, but the validation of such hypothesis requires further chemical, physiological and genetic studies.
- the phenological stage of the plant significantly influenced the monoterpene fraction of the oil, that at flowering time was represented in a higher quantity (69.01% vs. 61.80% obtained at vegetative stage).
- The distillation time significantly influenced both oil yield and chemical composition. In the first 60 minutes, the process was able to provide more than 70% of total yield. The oil obtained so far was rich in monoterpenes and poor as for the sesquiterpene fraction, which is heavier and requires a longer extraction time. In order to obtain a good qualitative composition of the essential oil and to get a good overall performance, the distillation process must use the entire plant and should preferably be completed in 120 minutes.

Seed germination:

The test was carried out to study the optimal temperature and light conditions for *A. arborescens* seed germination. It was possible to come to the following conclusions:

- The germination process is fairly homogeneous in conditions of both light and dark, showing a TMG (Mean Germination Time) of 8.3 days (6.9-9.8 days) in the light and between 7.7 and 9.5 days in the dark.
- The highest germination level of seeds was found to occur in the dark and at the lowest temperature level (5 °C), whereas if seeds are exposed to the light, the germination process is faster when the temperatures are ranging between 20 and 25 °C. No germination occurs when mean temperatures are enhanced to 30 °C.
- From the ecological point of view, it seems to find a reason the higher occurrence of young plants of *A. arborescens* in the wild in spring and autumn, while with higher temperatures the emergency flows are partially inhibited.

Rooting of cuttings:

The trial was aimed to point out a protocol for nursery plants production, and took into consideration different periods of collection of the plant material for propagation, different rooting substrates and the use of a rooting hormone (NAA) on rooting percentage, giving the following information:

- The best period for picking up the propagation material, i.e. the period when rooting percentage was higher, was winter time, with a rooting rate of 40%.
- The use of different substrates and the treatment with a rooting hormone did not significantly affect the rooting process.

Field trial:

The transplanting in open field of young plants, obtained from rooted cuttings or from seed, has allowed us to study the adaptability of the plant to such growing conditions. The effect of cutting harvest height on the overall plant performance was also studied, and the following conclusions could be driven:

- The species seems to fit rather well to the cultivation in open field, even under conditions of limited technical inputs.
- The plants obtained from rooted cuttings, with respect to those obtained from seeds, were generally characterized by a stronger enlargement in width and capable to provide, in their second life year, a higher total biomass production.
- Biomass production is somehow proportional to the severity of the cut, but the plants subjected to more drastic cuts allow in the following year a higher total production of new biomass. This phenomenon should probably be analyzed in conjunction with the removal in the lower part of the plant of a fairly larger number of buds, that allows a lower level of in-plant competition for the available resources.

Antimicrobial activity

The trial conducted on the activity of *A. arborescens* against the most common bacterial species (*Enterobacter*, *Salmonella* and *L. monocytogenes*) responsible for food alteration, has allowed some interesting considerations:

- Gram-negative species (*Salmonella* spp. and *Enterobacter* spp.) were found to be insensitive to treatment with the essential oil, while a greater degree of sensitivity was observed on Gram-positive species (*Listeria* spp.).
- This activity of the essential oil of *A. arborescens* allows to hypothesize a possible industrial use as a natural preservative in the food sector; in view of the strong aromatic characteristics of the product, however, the response from consumers remains to be ascertained.

Fungicidal activity

An initial screening on the inhibitory activity of the essential oil on mycelial growth of various fungi of agricultural interest (*Phytophthora*, *Verticillium*, *Botrytis*, *Penicillium*, *Rizoctonia*, *Fusarium* and *Pythium*), has led to a reduction of the scope of the survey to those species that had shown somewhat sensitive to the activity of the oil (*Fusarium oxysporum* f.sp. *Diantha*, *Verticillium dahliae* and *Phytophthora citrophthora*). With the aim to narrow the range of chemical compounds which bring the inhibitory activity, 3 different essential oils composition were compared.

- Among the three tested oils, the highest level of inhibition of *Verticillium* was caused by the one with the largest presence of chamazulene.
- The inhibition activity appears to be related to the synergistic action of a few chemical compounds, such as camphor and β – caryophyllene, while β – thujone produced no inhibitory effect on any of the fungal species tested.

Herbicide activity

The activity of the essential oil of *A. arborescens* was tested on some weed species typical of Mediterranean citrus orchards (*Conyza*, *Araujia* and *Portulaca*) assessing their ability in inhibiting the germination of seeds.

- Among the three tested weed species, only two (*Conyza* and *Arauja*) showed some sensitivity to the treatment, while *Portulaca* was completely indifferent.
- Among the tested doses (0.125, 0.250, 0.5 and 1 ppm), only the highest showed an activity, giving a complete inhibition of weeds seed germination; the dose of 0.25 ppm gave instead a 50% inhibition rate, but the control action was maintained only until the third day of trial.
- On *Araujia sericifera*, the use of the *A. arborescens* essential oil led to a lack of seed germination at the higher doses, whereas an evident effect on seedlings growth was already shown at the lower doses.

Insecticide activity

- The addition of essential oil of *A. arborescens* showed to potentiate the effect of treatment with mineral oils: it seems therefore appropriate to replace the organophosphate products, even when the essential oil is included in the formulation at low doses.

FUTURE PROSPECTS

The broad spectrum of investigation followed in this study has certainly allowed us to obtain some important operational guidelines for the propagation of *A. arborescens* and the enhancement of its agricultural potentialities, and to broaden the knowledge about the biocidal activity of its essential oil. As a matter of fact, the species has confirmed many of the interesting possibilities suggested by the literature; especially in the field of microbiology and entomology, however, it should be desirable to go further with the advancement of such research lines, with the aim to define doses and mode of intervention, at the accuracy level required by industry. It is not to ignore the deepening of studies about fungicidal activity, which provided interesting results.

BIBLIOGRAFIA

- Abdelgaleil S.A.M., Abbassy M.A., Belal A.S.H., Abdel Rasoul M.A.A. 2008.** Bioactivity of two major constituents isolated from the essential oil of *Artemisia judaica* L. *Bioresource Technology* 99: 5947–5950.
- Abderrahim A., Belhamel K., Chalchat J-C., Figuéredo G. 2010.** A Chemical Composition of the Essential Oil from *Artemisia arborescens* L. Growing Wild in Algeria. *Records Of Natural Products* 4 (1): 87-90.
- Adams R.P. 2007.** Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, fourth ed. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, USA.
- Agbo C.U., Obi I.U. 2008.** Patterns of vegetative propagation of stem-cuttings of three physiological ages of *Gongronema latifolia* BENTH. over two seasons in Nsukka. *Journal of Tropical Agriculture, Food, Environment and Extension* 7 (3): 193–198.
- Akhila A., Tyagi B.R., Naqvi A. 1984.** Variation of essential oil constituents in *Cymbopogon martinii* Wats. (var. *Motia*) at different stages of plant growth. *Indian Perfum.* 25: 126-128.
- Akoumianaki-Ioannidou A., Alexiou P., Fasseas C., 2010.** *Propagation of Pteroccephalus perennis by cuttings and its evaluation as ornamental.* *Acta Hort.* 885: 21-25.
- Al-Reza S.M., Rahman A., Lee J., Kang S.C. 2010.** Potential roles of essential oil and organic extracts of *Zizyphus jujuba* in inhibiting food-borne pathogens. *Food Chem* 119: 981–986.
- Alvarez-Cordero E., Mckell C.M., 1979.** Stem cutting propagation of big sagebrush: *Artemisia tridentata*. *Journal of Range Management* 32 (2): 141-143.
- Ameziane N., Boubaker H., Boudyach H., Jilan A., Benaoumar A. 2007.** Antifungal activity of Moroccan plants against citrus fruit pathogens. *Agron. Sustain. Dev.* 27: 273-277.
- Amin G., Salehi Sourmaghi M.H., Azizzadeh M., Yassa N., Asgari T. 2008.** Seasonal Variation of the Essential Oil Composition of Cultivated Yarrow in Tehran-Iran. *Journal of essential oil bearing plants* 11 (6): 628–633.
- Aminah H., Dick J.M.C.P., Leakey R. R. B., Grace J., Smith R.I., 1995.** Effect of indole butyric acid (IBA) on stem cuttings of *Shorea leprosula*. *Forest Ecology and Management* 72: 199-206.
- Amri E., Lyaruu H.V.M., Nyomora A.S., Kanyeka Z.L., 2010.** Vegetative propagation of African Blackwood (*Dalbergia melanoxylon* Guill. & Perr.): effects of age of donor plant, IBA treatment and cutting position on rooting ability of stem cuttings. *New Forests* 39, 183–194.
- Angelini L.G., Carpanese G., Cioni P-L., Morelli I., Macchia M., Flamini G. 2003.** Essential Oils from Mediterranean Lamiaceae as Weed Germination Inhibitors. *J. Agric. Food Chem.* 51: 6158-6164.
- Angelopoulou D., Demetzos C., Perdetzoglou D. 2001.** Diurnal and seasonal variation of the essential oil labdanes and clerodanes from *Cistus monspeliensis* L. leaves. *Biochemical Systematics and Ecology* 30: 189–203.
- Anonymous, 2004.** Riproduzione e valutazione della coltivazione di specie aromatiche indigene della montagna Lombarda. Regione Lombardia. Relazione attività del progetto. Fondazione Minoprio (in Italian). Available on-line: <http://www.fondazioneminoprio.it/userfiles/attach/progetti/aromatiche%20di%20montagna.pdf> [last accessed 2 September, 2011].
- Arnou I. 1992.** Agriculture in dry lands, principles and practice. *Developments in Agricultural and Managed-Forest Ecology*, 26. Elsevier Science Publ.: 979 pp.
- Atkins P.W. 1997.** *Chimica Fisica*, Zanichelli Ed., Bologna, 1997.
- Bai Y., Romo J.T., Young J.A., 1995.** Influences of temperature, light and water stress on germination of fringed sage. *Weed Science* 43, 219-225.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. 2008.** Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* 46:446–475.

- Bakker J.D., 2010.** Plant Propagation Protocol for *Artemisia Tridentata* ESRM 412 Native Plant Production Spring 2010. Available on-line: <http://courses.washington.edu/esrm412/protocols/ARTR2.pdf> [last accessed 2 September, 2011].
- Baldoni G., Benvenuti S. 2001.** Germinazione ed emergenza. In: Catizone P. e Zanin G., Malerbologia, Patron Ed., Bologna : 113-121.
- Baldoni G., Benvenuti S. 2001a.** Dispersione dei propaguli nel tempo. In: Catizone P. e Zanin G., Malerbologia, Patron Ed., Bologna : 99-112.
- Beatty A., Watson D., Stevens M., Rae D., Spooner-Hart R. 2002.** Spray oil beyond 2000. Sustainable pest and disease management. University of Western Sydney, 2002: 22-28.
- Bedford E.C.G. 1996.** Problems which we face bringing red scale, *Aonidiella aurantii* (Maskell), under biological control in citrus in South Africa. Proceedings of the International Society of Citriculture 1: 485-492.
- Benvenuti S. 2010.** "Wildflower Strips" come innovazione agronomica dedicata alla tutela degli impollinatori. In: Sarli G., Alvino A., Cervelli C. (a cura di), IV Convegno Nazionale Piante Mediterranee - Le potenzialità del territorio e dell'ambiente. Raccolta degli Atti: 514-518.
- Betto P., Casinovi C.G., Gabriele R. Grandolini G., Menichini F. 1988.** Estudio sistematico de los componentes menores de la *Artemisia arborescens* L. de Calabria. Rev. Latinoamer. Quim. 19/1: 40-42.
- Biondi, E., Valentini, G., Bellomaria, B. and Zuccarello, V. 1993.** Composition of essential oil in *Artemisia arborescens* L. from Italy. Acta Hort. (ISHS) 344:290-304 http://www.actahort.org/books/344/344_33.htm.
- Bradley Rowe D., Cregg B.M., 2002.** Effect of Incorporating Controlled-release Fertilizer on Adventitious Rooting and Growth of *Artemisia*, *Gaura*, and *Nepeta*. J. Environ. Hort. 20 (1), 1-6.
- Bruneton J. 1995.** Pharmacognosy, phytochemistry, Medicinal Plants. Lavoisier Publ., Paris 427 - 466.
- Burt S. 2004.** Essential oils: their antibacterial properties and potential application in foods—a review. Int J Food Microbiol 94: 223-253.
- Bussotti F., Piccini C., Piotta B., Cervelli C. 2005.** La macchia mediterranea: la vegetazione e il suo rapporto con l'uomo. In: Le specie arbustive della macchia mediterranea. Un patrimonio da valorizzare. Cervelli C. (Ed.), Collana Sicilia Foreste 26: 10-36.
- Caligani P., Adamo A. 1987.** Le macchine per le officinali. Terra e vita 10: 62-70.
- Calsamiglia S., Busquet M., Cardozo P.W., Castillejos L., Ferret A. 2007.** Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. J Dairy Sci 90: 2580-2595.
- Carl E.S., Deyton D.E. 2001.** Botanical and Fish oils: history, chemistry, refining, formulation and current uses. In: "Spray oils beyond 2000: sustainable pest & disease management: an international conference" Final report (Horticultural Research & Development Corporation): Andrew James Beattie, Horticultural Research & Development Corporation, Horticulture Australia Ed.
- Carlini C.R., Grossi-de-Sa M.F. 2002.** Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. Toxicon 40: 1515-1539.
- Carrubba A., Calabrese I. 1998.** Antioxidant compounds in some herbaceous aromatic plants. Acta Hort. 457: 85-93.
- Carrubba A., Catalano C., Militello M. 2009^b.** La *Calendula* (*Calendula officinalis* L.) come prodotto erboristico e strumento per la conservazione e la salvaguardia della biodiversità in ambiente semi-arido. Poster in XV congresso nazionale di Fitoterapia - Tivoli Terme (Roma), 29-31 MAGGIO 2009.
- Carrubba A., Catalano C. 2009^a.** Essential Oil Crops for Sustainable Agriculture - a review. In: Lichtfouse E. (Ed) "Climate change, intercropping, pest control and beneficial microorganisms": Dijon, Springer: 137-188.
- Carrubba A., Catalano C., Militello M. 2009.** La *Calendula* (*Calendula officinalis* L.) come prodotto erboristico. XV congresso nazionale di Fitoterapia - Tivoli Terme (Roma), 29-31 maggio.
- Catizone P., Marotti M., Toderi G., Tetenyi P. 1986.** Coltivazione delle piante medicinali e aromatiche. Patron ed., Bologna: 399 pp.

- Cella R., Collu M. 2004.** Utilizzo di substrati artificiali nel recupero ambientale: modellizzazione della crescita di *Artemisia arborescens* L. su diversi substrati. Rendiconti Seminario Facoltà Scienze Università Cagliari (74): 1-2.
- Cervelli C., Piotta B., Camoriano L., Ciccacese L., Burchi G., Contri L. 2008.** Gli arbusti mediterranei: contesti e problematiche del settore vivaistico. In: Le specie arbustive della macchia mediterranea. Un patrimonio da valorizzare. 2a parte. Cervelli C. (Ed.), Collana Sicilia Foreste, 37: 9-49.
- Chalchat J.C., Garry R.P., Lamy J. 1994.** Influence of harvest time on yield and composition of *Artemisia annua* oil produced in France. J. Essent. Oil Res. 6:261-268.
- Chen C., Zheng J., Xie J., Xie X., Mao R. 2009.** Pest management based on petroleum spray oil in navel orange orchard in Ganzhou, South China. J Pest Sci 82: 155–162.
- Chericoni S., Flamini G., Campeol E., Cioni P.L., Morelli I. 2004.** GC–MS analyses of the essential oil from the aerial parts of *Artemisia verlotiorum*: variability during the year. Biochemical Systematics and Ecology. 32: 423–429.
- Chermenskaya T.D., Petrova M.O., Savelieva E.I. 2007.** Laboratory and field evaluation of biological active substances of plant origin against greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* Westw. (Homoptera: Aleyrodidae). Archives of Phytopathology and Plant Protection 1: 10.
- Chiasson H., Be Langer A., Bostanian N., et al. 2001** Acaricidal Properties of *Artemisia absinthium* and *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) Essential Oils Obtained by Three Methods of Extraction. J. Econ. Entomol. 94 (1): 167-171.
- Collins P.J., Lambkin T.M., Bodnaruk K.P. 2007.** Suspected resistance to methidathion in *Aonidiella aurantii* (Maskell) (Hemiptera: Diaspididae) from Queensland. Australian Journal of Entomology 33: 325-326.
- Copes D.L., Mandel N.L., 2000.** Effect of IBA and NAA treatments on rooting Douglas-fir stem cutting. New Forests 20: 249-257.
- Costa R., De Fina M. R., Valentino M. R., Rustaiyan A., Dugo P., Dugo G., Mondello L. 2009.** An investigation on the volatile composition of some *Artemisia* species from Iran. Flavour Fragr. J. 24: 75–82.
- Cristofori V., Roupheal Y., Rugini E., 2010.** Collection time, cutting age, IBA and putrescine effects on root formation in *Corylus avellana* L. cuttings. Scientia Hort. 124 (2): 189–194.
- Crum-Cianflone N.F. 2008.** Salmonellosis and the gastrointestinal tract: more than just peanut butter. Curr Gastroenterol Rep 10: 424–431.
- Cseke L.J., Kaufman P.B. 2006.** Regulation of Metabolite Synthesis in Plants. In: Natural products from plants- 2nd ed.
- Davidson P.M., Naidu A.S. 2000.** Phyto-phenols. In: Naidu A.S. (ed) Natural food antimicrobial systems. CRC Press, Boca Raton: 265–293.
- Dayan F.E., Cantrell C.L., Duke S.O. 2009.** Natural products in crop protection. Bioorganic & Medicinal Chemistry 17, 12: 4022-4034.
- Dellacecca V. 1996.** Ricerche sulla menta piperita (*Mentha x piperita* L.). Proc. Int. Conf. “Coltivazione e miglioramento delle piante officinali”, Trento (Italy), June 2-3 1994: 201-212.
- Depege C., Lizzani L., Loiseau M., Cabrol Bass D., Ferreira M.J.P., Brant A.J.C., Militao J.S.L.T., Emerenciano V.P. 2006.** Chemotaxonomic Study of *Artemisia*. An approach based on multivariate statistics of skeletal types retrieved from essential oils. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas. 5 (4): 72-83.
- Dessi M.A., Deiana M., Rosa A., Piredda M., Cottiglia F., Bonsignore L., Deidda D., Pompei R., Corongiu F.P., 2001.** Antioxidant Activity of Extracts from Plants Growing in Sardinia. Phytother. Res. 15, 511–518.
- Dharmagadda V.S.S., Naik S.N., Mittal P.K., Vasudevan P. 2004.** Larvicidal activity of *Tagetes patula* essential oil against three mosquito species. Bioresource Technology. 96: 1235–1240.

- Di Gregorio R., Toscano S., Scuderi D., Romano D. 2010.** La germinazione di specie autoctone dell'ambiente mediterraneo. In: Sarli G., Alvino A., Cervelli C. (a cura di), IV Convegno Nazionale Piante Mediterranee - Le potenzialità del territorio e dell'ambiente. Raccolta degli Atti: 262-276.
- Di Pasqua R., De Feo V., Villani F., Mauriello G. 2005.** In vitro antimicrobial activity of essential oils from Mediterranean Apiaceae, Verbenaceae and Lamiaceae against foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Ann Microbiol* 55: 139-143.
- Digilio M.C., Mancini E., Voto E., De Feo V. 2008.** Insecticide activity of Mediterranean essential oils. *Journal of Plant Interactions*. 1 (3): 17-23.
- Dirr A.M., Heuser C.W. Jr 1987.** The reference manual of woody plant propagation: from seed to tissue culture. Athens, GA, USA.
- D'Ischia M. 2002.** La chimica organica in laboratorio. Ed. Piccin, Padova: 799-801.
- Drevets D.A., Bronze M.S. 2008.** *Listeria monocytogenes*: epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. *FEMS Immunol Med Microbiol* 53: 151-165.
- Dudai N., Poljakoff-Mayber A., Mayer A.M., Putievsky E., Lerner H.R. 1999.** Essential oils as allelochemicals and their potential use as bioherbicides. *J Chem Ecol* 25: 1079-1089.
- Duke S.O., Romagni J.G., Dayan F.E. 2000.** Natural products as sources for new mechanisms of herbicidal action. *Crop Protection* 19: 583-589.
- Duke S.O., Dayan F.E., Rimando A.M., Schrader K.K. 2002.** Chemicals from nature for weed management. *Weed Science* 50: 138-151.
- EDQM 2011.** European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. 2011. European Pharmacopoeia - 7th Edition. Strasbourg.
- El-Sakhawy F.S., El-Tantawy M.E., Ross S.A., El-Sohly M.A. 1998.** Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Murraya exotica* L. *Flav Fragr J* 13: 59-62.
- Escudero A., Albert M.J., Pita J.M., Perez-Garcia F. 2000.** Inhibitory effects of *Artemisia herba-alba* on the germination of the gypsophyte *Helianthemum squamatum*. *Plant Ecology* 148: 71-80.
- European Commission. 2003.** Opinion of the scientific committee on food on Thujone. Expressed on 2nd Dec 2002. European Commission—Health and Consumer Protection Directorate-General, Scientific Committee on Food—SCF/CS/FLAV/FLAVOUR/23 ADD2 Final, 6 February 2003.
- Falk C.L., van Voorthuizen H., Wall M.M., Guldán S.J., Martin C.A., Kleitz K.M. 2000.** An Economic analysis of transplanting versus direct seeding of selected medicinal herbs in New Mexico. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants* 7, 4: 15-29.
- Farber J.M. 2000.** Present situation in Canada regarding *Listeria monocytogenes* and ready-to-eat seafood products. *Int J Food Microbiol* 62: 247-251.
- Farzaneh M., Ghorbani-Ghouzhi H., Ghorbani M., Hadian J. 2006.** Composition and antifungal activity of essential oils of *Artemisia sieberi*. *Pakistan Journal of biological science* 9(10): 1979-1982.
- Fascella G., Zizzo G.V. 2009.** Efficient propagation technique of *Euphorbia x lomi* Thai hybrids. *HortScience* 44 (2): 495-498.
- Fascella G., Zizzo G.V., Agnello S., 2008.** In vivo propagation of *Euphorbia milii* × *lophogona* hybrids for pot plant production. *Acta Hort.* 766: 163-168.
- Ferreira J.F.S., Ritchey K.D., Cassida K.L., Turner K.E., Gonzalez J.M. 2006.** Agrotechnological aspects of the anti-malarial plant *Artemisia annua* and its potential use in animal health in Appalachia. *Revue des Régions Arides - Numéro spécial - Actes du séminaire international "les Plantes à Parfum, Aromatiques et Médicinales"*: 797-804.
- Fiorini C., Fourasté I., David B., Bessière J.M. 1997.** Composition of the Flower, Leaf and Stem Essential Oils from *Laurus nobilis*. *Flavour Fragr J.* 2 (12): 91-93.
- Forster L.D., Luck R.F., Grafton-Cardwell E.E. 1995.** Life stages of California red scale and its parasitoids. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources Pub. 21529, Oakland, CA.

- Franz C., Novak J. 2010.** Source of Essential oil". In: Baser K.H.C. (ed) "Handbook of essential oils: science, technology, and applications". Gergard Buhbauer: 39-73.
- Fulzele D.P., Heble M.R., Rao P.S., 1995.** Production of terpenoid from *Artemisia annua* L. plantlet cultures in bioreactor. *Journal of Biotechnology* 40: 139-143.
- Garcia S., Garnatje T., Twibell J.D., VallèsGuo J. 2006.** Genome size variation in the *Artemisia arborescens* complex (Asteraceae, Anthemideae) and its cultivars. *Genome* 49: 244–253.
- Gillij Y.G., Gleiser R.M., Zygadlo J.A. 2008.** Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. *Bioresource Technology* 99: 2507–2515.
- Giordani R., Hadeif Y., Kaloustian J. 2008.** Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. *Fitoterapia* 79: 199-203.
- Glasl S., Presser A., Werner I., Wawrosch Ch., Kastner U., Jurenitsch J., Haslinger E., Kubelka W. 1999.** Two proazulenes from *Achillea ceretanica* Sennen. *Phytochemistry*. 4(50): 629-631.
- Gomez K.A., Gomez A.A. 1984.** Statistical procedures for agricultural research. John Wiley & sons Inc., New York, USA.
- Goulet V., Hedberg C., Le Monnier A., de Valk H. 2008.** Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. *Emerg Infect Dis* 14: 734–740.
- Gourine N., Yousfi M., Bombarda I., Nadjemi B., Gaydou E. 2010.** Seasonal Variation of Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oil from *Pistacia atlantica* Desf. Leaves. *J Am Oil Chem Soc.* 87: 157–166.
- Govindaraj S., Bollipo D.R.K. 2007.** Efficient in vitro micropropagation and regeneration of *Artemisia vulgaris* L. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 7, 117-124.
- Govindaraj S., Bollipo D.R.K, Cioni P.L., Flamingi G. 2008.** Mass propagation and essential oil analysis of *Artemisia vulgaris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 3 (105), 176–183.
- Grafton-Cardwell E., Ouyang Y., Striggow R., Vehrs S. 2001.** Armored scale insecticide resistance challenges San Joaquin Valley citrus growers. *California Agriculture* 55: 20-25.
- Grover R.K., Moore J.D. 1961.** Adaptation of *Sclerotinia fructicola* and *Sclerotinia laxa* to higher concentrations of fungicides. *Phytopathology* 51: 399-401.
- Guo X., Fu X., Zang D., Ma Y. 2009.** Effect of auxin treatments, cuttings collection date and initial characteristics on *Paeonia* 'Yang Fei Chu Yu' cutting propagation. *Scientia Hort.* 119 (2), 177–181.
- Gupta S.C. 1996.** Variation in herbage yield, oil yield and major component of various *Ocimum* species/varieties (chemotypes) harvested at different stages of maturity. *J. Essent. Oil Res.* 8: 275-279.
- Haraguchi H. 2001.** Antioxidative plant constituents. In: Tringali C (ed) *Bioactive compounds from natural sources isolation characterisation and biological properties*. Taylor & Francis, London: 337–377.
- Hartmann H.T., Kester D.E., Davies F.T., Geneve R.L., 1997.** *Plant propagation: principles and practises*. 7th ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J., USA.
- Haider F., Dwivedi P., Singh S., Naqvi A.A., Bagchi G. 2004.** Influence of transplanting time on essential oil yield and composition in *Artemisia annua* plants grown under the climatic conditions of sub-tropical north India. *Flavour Fragr. J.*; 19: 51–53.
- Hayat M.Q., Ashraf M., Khan M.A., Mahmood T., Ahmad M., Jabeen S. 2009.** Phylogeny of *Artemisia* L.: Recent developments. *African Journal of Biotechnology* Vol. 8 (11), pp. 2423-2428.
- Healy B., Cooney S., O'Brien S., Iversen C., Whyte P., Nally J., Callanan J.J, Fanning S. 2010.** *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*): an opportunistic food-borne pathogen. *Foodborne Pathog Dis* 7: 339–350.
- Hwang Y.S., Wu K.H., Kumamoto J., Axelrod H., Mulla S. 1985.** Isolation and identification of mosquito repellents in *Artemisia vulgaris*. *Journal of Chemical Ecology*. 9 (11)
- Ibanez-Torres A. 2004.** Rooting experiments with *Euphorbia lagascae* cuttings. *Ann. Biol.* 26, 101–104.
- Isman M.B. 2000.** Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection* 19: 603-608.

- Isman M.B. 2006.** Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol.* 51: 45–66.
- Jacobson L. 2008.** Listeriosis. *Pediatr. Rev.* 29: 410–411.
- Jeppson L.R., Jesser M.J., Complin T.O. 1958.** Resistance of the citrus red mite to organic phosphates in California. *Jour. Econ. Ent.* 51(2): 232-233.
- Jerkovic I., Mastelic J., Milos M., Juteau F., Masotti V., Viano J. 2003.** Chemical variability of *Artemisia vulgaris* L. essential oils originated from the Mediterranean area of France and Croatia. *Flavour Fragr. J.* 18: 436–440.
- Jeyabalan D., Arul N., Thangamathi P. 2003.** Studies on effects of *Pelargonium citrosa* leaf extracts on malarial vector, *Anopheles stephensi* Liston. *Bioresource Technology.* 89: 185–189.
- Jovanovic Z., Kostic M., Popovic Z. 2007.** Grain-protective properties of herbal extracts against the bean weevil *Acanthoscelides obtectus* Say. *Industrial Crops and Products.* 26: 100–104.
- Karapinar M., Aktug S.E. 1987.** Inhibition of foodborne pathogens by thymol, eugenol, menthol and anethole. *Int J Food Microbiol* 4: 161–166.
- Kelmanson J.E., Jager A.K., Van Staden J. 2000.** Zulu medicinal plants with antibacterial activity. *J Ethnopharmacol* 69: 241–246.
- Khan R., Islam B., Akram M., Shakil S., Ahmad A., Ali S.M., Siddiqui M., Khan A.U. 2009.** Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MDR) strains of bacteria and fungus of clinical origin. *Molecules* 14: 586–597.
- Kordali S., Cakir A., Mavi A., Kilic H., Yildirim A. 2005.** Screening of chemical composition and antifungal and antioxidant activities of the essential oils from three Turkish *Artemisia* Species. *J Agric Food Chem* 53: 1408–1416.
- Kordali S., Cakir A., Ozer H., Cakmakci R., Kesdek M., Mete E. 2008.** Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. *Bioresource Technology.* 99: 8788–8795.
- Krisantini S., Johnston M., Williams R.R., Beveridge C. 2006.** Adventitious root formation in *Grevillea* (Proteaceae), an Australian native species. *Scientia Hort.* 107 (2): 171-175.
- Kuiate J.-R., Amvam Zollo P.-H., Lamaty G., Bessi re J.-M., Menut C. 1999.** Composition of the essential oil from leaves and flowers of *Dichrocephala integrifolia* (L.) O. Kuntze Chev. from Cameroon. *Flavour and Fragrance Journal.* 6 (14): 419–420.
- Lai F., Loy G., Manconi M., Manca M.L., Fadda A.M. 2007.** *Artemisia arborescens* L Essential Oil Loaded Beads: Preparation and Characterization. *AAPS PharmSciTech* 8 (3).
- Lai F, Wissing SA, Mu ller RH, Fadda AM. 2006.** *Artemisia arborescens* L essential oil–loaded solid lipid nanoparticles for potential agricultural application: preparation and characterization. *AAPS PharmSciTech*, 7 (1) Article 2 <http://www.aapspharm.scitech.org>.
- Lamharrar A., Idlimam A., Ethmane Kane C.S., Jamali A., Abdenouri N., Kouhila M. 2007.** Sorption Isotherms and Drying Characteristics of *Artemisia arborescens* Leaves. *Journal of Agronomy* 6(4):488-498.
- Lentini F., Venza F. 2007.** Wild food plants of popular use in Sicily. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 3: 15-27.
- Leto C., Carrubba A., Trapani P. 1994.** “Tassonomia, ecologia, proprietà ed utilizzazioni del genere *Origanum*”. *Atti conv. Int. “Coltivazione e miglioramento delle piante officinali”*. – Trento, 2-3 giugno 1994: 343-354.
- Levitin E., Cohen E. 1998.** The involvement of acetylcholinesterase in resistance of the California red scale *Aonidiella aurantii* to organophosphorus pesticides. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 88: 115-122.
- Liu C.H., Mishra A.K., Tan R.X., Tang C., Yang H., Shen Y.F. 2006.** Repellent and insecticidal activities of essential oils from *Artemisia princeps* and *Cinnamomum camphora* and their effect on seed germination of wheat and broad bean. *Bioresource Technology* 97: 1969–1973.
- Liu C.H., Zou W.X., Lu H., Tan R.X. 2001.** Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. *Journal of Biotechnology* 88: 277–282.

- Liu C.Z., Murch S.J., El-Demerdash M., Saxena P.K. 2004.** *Artemisia judaica* L.: micropropagation and antioxidant activity. *Journal of Biotechnology* 110: 63–71.
- Liu C.Z., Wang Y.C., Ouyang F., Ye H.C., Li G.F. 1998.** Production of artemisinin by hairy root cultures of *Artemisia annua* L in bioreactor. *Biotechnology Letters* 20 (3): 265–268.
- Lo Presti M., Crupi M.L., Zellner B.d'A., Dugo G., Mondello L. 2007.** Characterization of *Artemisia arborescens* L. (Asteraceae) leaf-derived essential oil from Southern Italy. *J. Essent. Oil Res.* 19: 218-224.
- Lopes-Lutz D., Alviano D.S., Alviano C.S., Kolodziejczyk P.P. 2008.** Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry* 69: 1732–1738.
- Lym R.G. 1992.** Propagation of *Euphorbia esula* for leafy spurge biocontrol agents. *Weed Science* 40: 326-332.
- Macêdo M.E, Consoli R.A.G.B., Grandi T.S.M., dos Anjos A.M.G., de Oliveira A.B, Mendes N.M., Queiróz R.O., Zani C.L. 1997.** Screening of Asteraceae (Compositae) Plant Extracts for Larvicidal Activity against *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 92 (4): 565-570.
- Machial C.M., Shikano I., Smirle M., Bradbury R., Isman M.B. 2010.** Evaluation of the toxicity of 17 essential oils against *Choristoneura rosaceana* (Lepidoptera: Tortricidae) and *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Management Science* 66: 1116–1121.
- Malik A.A., Ahmada J., SMirb R., Ali M., Abdinc M.Z. 2009.** Influence of chemical and biological treatments on volatile oil composition of *Artemisia annua* Linn. *Industrial Crops and Products* 30 (3): 380-383.
- Mallavarapu G.R., Kulkarni R.N., Baskaran K., Rao L., Ramesh S. 1999.** Influence of Plant Growth Stage on the Essential Oil Content and Composition in *Davana* (*Artemisia pallens* Wall.). *J. Agric. Food Chem.* 47: 254-258.
- Marongiu B., Piras A., Porcedda S. 2006.** Comparative analysis of the oil and supercritical CO₂ extract of *Artemisia arborescens* L. and *Helichrysum splendidum* (Thunb.) Less.. *Nat. Prod. Res.* 20: 421-428.
- Marotti M., Piccaglia R. 1992.** The influence of distillation conditions on the essential oil composition of three varieties of *Foeniculum vulgare* Mill. *J. Essent. Oil Res.* 4: 569-576.
- Martínez M.A., Soto A., Garcia-Marí F. 2005.** Prospección de la eficacia de clorpirifos en poblaciones del cóccido *Aonidiella aurantii* (Homoptera: Diaspididae) en parcelas de cítricos de la Comunidad Valenciana. *Levante Agrícola: Revista internacional de cítricos* 375: 348-356.
- Masango P. 2005.** Cleaner production of essential oils by steam distillation. *Journal of Cleaner Production.* 13: 833-839.
- Mascarello C. 2008.** Appendice 2. La propagazione agamica. In: *Le specie arbustive della macchia mediterranea. Un patrimonio da valorizzare. 2a parte.* Cervelli C. (Ed.), Collana Sicilia Foreste, 37: 185-195.
- Masotti V., Juteau F., Bessie J.M., Viano J. 2003.** Seasonal and Phenological Variations of the Essential Oil from the Narrow Endemic Species *Artemisia molinieri* and Its Biological Activities. *J. Agric. Food Chem.* 51: 7115-7121.
- Maurya P., Sharma P., Mohan L., Batabyal L., Srivastava C.N. 2009.** Evaluation of the toxicity of different phytoextracts of *Ocimum basilicum* against *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus*. *Journal of Asia-Pacific Entomology.* 12: 113–115.
- Meepagala K.M., Kuhajek J-M., Sturtz G.D., Wedge D.E. 2003.** Vulgarone B, the antifungal constituent in the steam-distilled fraction of *Artemisia douglasiana*. *Journal of Chemical Ecology* 29 (8): 1771-1780.
- Meepagala K.M., Sturtz G., Wedge D.E. 2002.** Antifungal Constituents of the Essential Oil Fraction of *Artemisia dracuncululus* L. Var. *dracuncululus*. *J. Agric. Food Chem.* 50: 6989-6992.
- Mennone C. 2006.** Uso dell'olio minerale in agrumicoltura. *Informatore Agrario* 16: 60-64.
- Mesh F., Newton A.C., Leakey R.R.B., 1997.** Vegetative propagation of *Cordia alliodora* (Ruiz & Pavon) Oken: the effects of IBA concentration, propagation medium and cutting origin. *Forest Ecology and Management* 92, 45-54.

- Meyer S.E. e Monsen S.B. 1991.** Habitat-Related variation in mountain Big-Sagebrush (*Artemisia tridentata* ssp.) seed germination patterns. *Ecology*, 72(2), pp. 739-742.
- Militello M., Settanni L., Aleo A., Mammina C., Moschetti G., Giammanco G.M., Blazquez M.A., Carrubba A. 2011.** Chemical composition and antibacterial potential of *Artemisia arborescens* L. Essential Oil. *Curr Microbiol* 62: 1274–1281.
- Miret J.-A.J., Garcia-Marí F. 2001.** Side-effects of pesticides on selected natural enemies occurring in citrus in Spain. *Pesticides and Beneficial Organisms IOBC/wprs Bulletin* 24 (4): 103 – 112.
- Mirjalili M.H., Tabatabaei S.M.F., Hadian J., Nejad Ebrahimi S., Sonboli A. 2007.** Phenological Variation of the Essential Oil of *Artemisia scoparia* Waldst. et Kit from Iran. *J. Essent. Oil Res.* 19: 326–329.
- Morris S.E., Davies N.W., Brown P.H., Groom T. 2006.** Effect of drying conditions on pyrethrins content. *Industrial Crops and Products* 23: 9–14.
- Moura-Costa P.H., Lundoh L., 1994.** The effects of auxins (IBA, NAA AND 2,4-D) on rooting of dry *Obalanops lanceolata* (KAPUR - DIPTEROCARPACEAE) cuttings. *Journal of Tropical Forest Science* 7 (2), 338-340.
- Mulas, M., Mulas, G., 2005.** Cultivar selection from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) spontaneous populations in the Mediterranean area. *Acta Horticulturae* 676: 127–133.
- Muller-Riebau F.J., Berger B.M., Yegen O., Cakir C. 1997.** Seasonal Variations in the Chemical Compositions of Essential Oils of Selected Aromatic Plants Growing Wild in Turkey. *J. Agric. Food Chem.* 45: 4821-4825.
- Muyima N.Y.O., Zulu G., Bhengu T., Popplewell D. 2001.** The potential application of some novel essential oils as natural cosmetic preservatives in an aqueous cream formulation. *Flavour Fragr J.* 17: 258-266.
- Myers J.R., Still S.M., 1979.** Propagating London plane tree from cuttings. *Plant Propagator* 25: 8-9
- Nath S.C., Pathak M.G., Baruah A. 1996.** Benzyl benzoate, the major component of the leaf and stem bark oil of *Cinnamomum zeylanicum* Blume. *Journal of essential oil research.* 8 (3): 327-328.
- National Toxicology Program. 2010.** Testing status of agents at NTP (US National Toxicology Program—Department of Health and Human Services) Alpha-Thujone; alpha/beta-Thujone mixture. US. <http://ntp.niehs.nih.gov/?objectid=BDC8D329-123F-7908-7B2AAA991BD579CE> . [Last accessed 01 December 2011].
- Negahban M., Moharramipour S., Sefidkon F. 2006a.** Chemical Composition and Insecticidal Activity of *Artemisia scoparia* Essential Oil against Three Coleopteran Stored-Product Insects. *J. Asia-Pacific Entomol.* 9 (4): 381-388.
- Negahban M., Moharramipour S., Sefidkon F. 2006b.** Insecticidal Activity and Chemical Composition of *Artemisia sieberi* Besser Essential Oil from Karaj, Iran. *J. Asia-Pacific Entomol.* 9 (1): 61-66.
- Nemeth G. 1986.** Induction of rooting. In *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol.1. Trees (Bajaj YPS, ed). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag: 49-64.
- Nguyen T.P.T., Nguyen T.T., Tran M.H., Tran H.T. 2004.** *Artemisia vulgaris* L. from Vietnam: chemical variability and composition of the oil along the vegetative life of the plant. *J. Essent Oil Res* 16: 358–361.
- Nikaido H. 1994.** Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* 264: 382–388.
- NIST 98. 1998.** NIST/EPA/NIH Mass Spectral Database, Standard Reference Database 1; Standard Reference Database 1, Standard Reference Data Program, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD.
- Nychas G.J.E., Tassou C.C., Skandamis P. 2003.** Antimicrobials from herbs and spices. In: Roller SM (ed.) *Natural antimicrobials for the minimal processing of foods*. Woodhead Publishers, CRC Press, New York: 176–200.
- Noge K., Becerra J.X. 2009.** Germacrene D, A Common Sesquiterpene in the Genus *Bursera* (Bursaceae). *Molecules* 14: 5289-5297.

- Odello L. 1990.** La distillazione delle essenze. Demetra s.r.l.: 22-48.
- Ofori D.A., Newton A.C., Leakey R.R.B., Grace J., 1996.** Vegetative propagation of *Militia excelsa* by leafy stem cuttings: effects of auxin concentration, leaf area and rooting medium. *Forest Ecology and Management* 84: 39-48.
- Omolo M.O., Okinyo D., Ndiege I.O., Lwande W., Hassanali A. 2005.** Fumigant toxicity of the essential oils of some African plants against *Anopheles gambiae* sensu stricto. *Phytomedicine*. 12: 241–246.
- Orosi G. 1857.** *Farmacologia teorica e pratica o farmacopea italiana*. Terza edizione corredata di notabili aggiunte (3° parte). Livorno, Vincenzo Mansi Editore: 1174-2171.
- Pala-Paul J., Perez-Alonso M.J., Velasco-Negueruela A., Pala-Paul R., Sanz J., Conejero F. 2001.** Seasonal variation in the chemical constituents of *Santolina rosmarinifolia* L. ssp. *rosmarinifolia*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 29, 663–672.
- Panetsos K.P., Scaltsoyiannes A.V., Alizoti P.G., 1994.** Vegetative propagation of *Platanus orientalis* x *P. occidentalis* F1 hybrids by stem cuttings. *Forest Genetics* 1, 125-130.
- Pappas R., Sheppard-Hanger S. 2000.** *Artemisia arborescens* - essential oil of the Pacific Northwest: a high-chamazulene, low-thujone essential oil with potential skin-care applications. <http://atlanticinstitute.com/artemisia.pdf>
- Pascual-Villalobos M.J., Robledo A. 1998.** Screening for anti-insect activity in Mediterranean plants. *Industrial Crops and Products* 8: 183–194.
- Pascual-Villalobos M.J., Robledo A. 1999.** Anti-insect activity of plant extracts from the wild flora in southeastern Spain. *Biochemical Systematics and Ecology* 27: 1- 10.
- Patočka J., Plucar B. 2003.** Pharmacology and toxicology of absinthe. *Journal of Applied Biomedicine* 1: 199–205.
- Pemonge J., Pascual-Villalobos M.J., Regnault-Roger C. 1997** Effects of Material and Extracts of *Trigonella foenum-graecum* L. Against the Stored Product Pests *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). *J. stored Prod. Ref.* 33 (3): 209-217.
- Peng F., Sheng L., Liu B., Tong H., Liu S. 2004.** Comparison of different extraction methods: steam distillation, simultaneous distillation and extraction and headspace co-distillation, used for the analysis of the volatile components in aged flue-cured tobacco leaves. *Journal of Chromatography A*, 1040: 1–17.
- Perez-Alonso M.J., Velasco-Negueruela A., Pala-Paul J., Sanz J. 2003.** Variations in the essential oil composition of *Artemisia pedemontana* gathered in Spain: chemotype camphor-1,8-cineole and chemotype davanone. *Biochemical Systematics and Ecology*. 31: 77–84.
- Pignatti S. 1982.** *Flora d'Italia*. Edagricole, Bologna.
- Piotto B, Di Noi A. (Ed.) 2001.** Propagazione per seme di alberi e arbusti della flora mediterranea. ANPA, Roma: 212 pp.
- Pooter H.L., Aboutabl E.A., El-Shabrawy A.O. 2006.** Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of leaf, stem and rhizome of *Alpinia speciosa*. *Flavour Fragr. J.* 10 (2): 63–67.
- Priadjati A., Smits W.T.M., Tolhamp G.W. 2010.** Vegetative propagation to assure a continuous supply of plant material for forest rehabilitation. In: *The Balance between Biodiversity Conservation and Sustainable Use of Tropical Rain Forests*. The Tropenbos Foundation, Wageningen, the Netherlands.
- Pridham A.M.S., 1963.** Propagation of *Artemisia vulgaris* from stem cuttings for herbicide test purposes. *Proc. Northeastern Weed Contr. Conf.* 17, 332.
- Regnault-Roger C. 1997.** The potential of botanical essential oils for insect pest control. *Integrated Pest Management Reviews*. 2: 25–34.
- Richter J., Schellenberg I. 2007.** Comparison of different extraction methods for the determination of essential oils and related compounds from aromatic plants and optimization of solid-phase microextraction/gas chromatography. *Anal Bioanal Chem* 387:2207–2217.
- Riehl L.A., Ladue J.P., Rodriguez J.P. Jr. 1959.** Efficiency of Ethion in Oil Spray against California Red Scale and Citrus Red Mite. *Journal of Economic Entomology* (52), 5.

- Romagni J.G., Duke S.O., Dayan F.E. 2000.** Inhibition of plant asparagine synthetase by monoterpene cineoles. *Plant Physiol.* 123:725–732.
- Rongai D., Cerato C., Lazzeri L., Palmieri S., Patalano G. 2008.** Vegetable oil formulation as biopesticide to control California redbelt (Aonidiella aurantii Maskell). *J Pest Sci* 81: 179–185.
- Rongai D., Cerato C., Martelli R., Ghedini R. 1998.** Aspects of insecticide resistance and reproductive biology of aphid gossypii glover on seed potatoes. *Potato Research* 41: 29-37.
- Ruta C., Perrini R., Blanco A., Morone Fortunato I. 2006.** Ottimizzazione del protocollo di micropropagazione per l'*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. Proc. III conv. naz. "Piante Mediterranee", Bari (Italy), Sept. 27 – Oct. 1: 142.
- Sacco T., Frattini C., Bicchi C. 1983.** Constituents of Essential oil *Artemisia arborescens*, *Planta Med.* 47: 49-51.
- Saddi M., Sanna A., Cottiglia F., Chisu L., Casu L., Bonsignore L., De Logu A. 2007.** Antiherpesvirus activity of *Artemisia arborescens* essential oil and inhibition of lateral diffusion in Vero cells. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 6, 10.
- Salamon I. 2009.** Chamomile biodiversity of the essential oil. Qualitative–quantitative characteristics. In: Sener B. (ed) "Innovations in chemical biology". Springer Science Business Media, Dordrecht: 83–90.
- Salamone A., Lazzara S., Verdeguer M., Boira H., Blázquez M.A. 2011.** Antifungal and herbicidal activity of *Rosmarinus officinalis* L. and *Pelargonium odoratissimum* (L.) L'Hér. essential oil. *Modern Fungicides and Antifungal Compounds VI, DPG Spectrum Phytomedizin*: 347:354.
- Salamone A., Scarito G., Camerata Scovazzo G., Fascella G. 2009.** Control of powdery mildew in cut roses using natural products in the greenhouse. *Floriculture and Ornamental Biotechnology* 3 (Special Issue 1): 121-125.
- Salido S., Valenzuela L. R., Altarejos J., Nogueras M., Sanchez A., Cano E. 2004.** Composition and infraspecific variability of *Artemisia herba-alba* from southern Spain. *Biochemical Systematics and Ecology* 32: 265–277.
- Sangwan N.S., Farooqi A.H.A., Shabih F., Sangwa R.S. 2001.** Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation* 34: 3–21.
- Saranga J., Cameron R., 2006.** Adventitious root formation in *Anacardium occidentale* L. in response to phytohormones and removal of roots. *Scientia Hort.* 111 (2), 164-172.
- Sarker S.D., Latif Z., Gray A.I. 2006.** Natural Product Isolation - An Overview; in: Sarker S.D, Zahid Latif Z. and Gray A.I. (eds.), "Natural products isolation" – 2nd ed.: 1-26.
- Šatović Z. 2004.** Legal protection, conservation and cultivation of medicinal and aromatic plants in Croatia. Medicinal and Aromatic Plants (ECP/GR) Working Group. *Gozd Martuljek*: 34–38.
- Schneider E. 2004.** The origin of medicinal plants in Central Europe—An ecological approach. Medicinal and Aromatic Plants (ECP/GR) Working Group, *Gozd Martuljek*: 21–24.
- Schroeder J.R., Le duc A. 1996.** Propagation of selected culinary and ornamental herbs. *HortScience* 31 (4): 633-634.
- Secoy D.M., Smith A.E. 1983.** Use of Plants in Control of Agricultural and Domestic Pests. *Economic Botany*.37 (1): 28-57.
- Sereshti H., Samadi S. 2007.** Comparison of hydrodistillation-headspace liquid phase microextraction techniques with hydrodistillation in determination of essential oils in *Artemisia Haussknechtii* Boiss. *JSUT* 33 (2): 7-17.
- Settanni L., Corsetti A. 2008.** Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *Int J Food Microbiol* 121: 123–138.
- Sharma S.D., Aier N.B. 1989.** Seasonal rooting behavior of cuttings of plum cultivars as influenced by IBA treatments. *Scientia Hort.* 40 (4), 297–303.
- Sharma J., Knox G.W., Ispida M.L. 2006.** Adventitious rooting of stem cuttings of yellow-flowered *Magnolia* cultivars is influenced by time after budbreak and indole-3-butyric acid. *HortScience* 41 (1): 202-206.

- Shekari M., Sendi J.J., Etebari K., Zibae A., Shadparvar A. 2008.** Effects of *Artemisia annua* L. (Asteraceae) on nutritional physiology and enzyme activities of elm leaf beetle, *Xanthogaleruca luteola* Mull. (Coleoptera: Chrysomellidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 91: 66–74.
- Shetty K., Carpenter T.L., Kwok D., Curtis O.F., Potter T.L. 1996.** Selection of high phenolics-containing clones of Thyme (*Thymus vulgaris* L.) using *Pseudomonas* Sp. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 3408–3411.
- Shiembo P.N., Newton A.C., Leakey R.R.B. 1996.** Vegetative propagation of *Irvingia gabonensis*, a West African fruit tree. *Forest Ecology and Management* 87, 185–192.
- Schippmann U., Leaman D.J., Cunningham A.B. 2002.** Impact of cultivation and gathering of Medicinal Plants on biodiversity: global trends and issues. In: FAO, 2002. “Biodiversity and the ecosystem approach in Agriculture, Forestry and Fisheries”. Satellite event on the occasion of the Ninth Regular Session of the Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture, Oct. 12–13 2002. Inter-Departmental Working Group on Biological Diversity for Food and Agriculture, Rome: 21 pp.
- Sinchaisri N., Roongsook D., Chungsamarnyart N. 1991.** Insecticidal Activity of plant crude-extracts on Diamondback Moth Larvae. *Nat.Sci.Suppl.*25: 106–110.
- Singh H.P., Mittal S., Kaur S., Batish D.R., Kohli R.K. 2009.** Chemical composition and antioxidant activity of essential oil from residues of *Artemisia scoparia*. *Food Chemistry* 114: 642–645.
- Sinico C. De Logu A., Lai F., Valenti D., Manconi M., Loy G., Bonsignore L., Fadda A.M. 2005.** Liposomal incorporation of *Artemisia arborescens* L. essential oil and in vitro antiviral activity. *Eur J Pharm Biopharm* 59: 161–168.
- Skoula M. 2006.** Conservation and use of wild plants of the Mediterranean region. Proc. III conv. naz. “Piante Mediterranee”, Bari (Italy), Sept. 27 – Oct. 1: 17.
- Smallfield B.M., van Klink J.W., Perry N.B., Dodds K.G. 2001.** Coriander Spice Oil: Effects of fruit Crushing and Distillation Time on Yield and Composition. *J.Agric. Food. Chem.* 49:118–123.
- Soloway S.B. 1976.** Naturally Occurring Insecticides; *Environmental Health Perspectives*. 14: 109–117.
- Spencer J.S. 1992.** Distillation water composition from field distillation of peppermint and spearmint; a time study. *Twelfth International Congress of Essential Oils and Flavours*: 306–313.
- Spreatico L. 1978.** L’analisi delle sementi. Quaderno n. 34 dell’ENSE. Ente Nazionale Sementi Elette, Milano: 35 pp.
- Sujatha G., Ranjitha Kumari B.D. 2008.** Micropropagation, encapsulation and growth of *Artemisia vulgaris* node explants for germplasm preservation. *South African Journal of Botany* 74: 93–100.
- Swaminathan B., Gerner-Smidt P. 2007.** The epidemiology of human listeriosis. *Microb Infect* 9: 1236–1243.
- Tchoundjeu Z., Avana M.L., Leakey R.R.B., Simons A.J., Asaah E., Duguma B., Bell J.M., 2002.** Vegetative propagation of *Prunus africana*: effects of rooting medium, auxin concentrations and leaf area. *Agroforestry Systems* 54, 183–192.
- Tewtrakul S., Yuenyongsawad S., Kummee S., Atsawajaruwan L. 2005.** Chemical components and biological activities of volatile oil of *Kaempferia galanga* Linn. *Songklanakarin J Sci Technol* 27: 503–507.
- Torrell M., Vallès J. 2001.** Genome size in 21 *Artemisia* L. species (Asteraceae, Anthemideae): Systematic, evolutionary, and ecological implications. *Genome* 44: 231–238.
- Tripathi A.K., Aggarwal K.K., Khanuja S.P.S., Kumar S., Parjapati V. 2000.** Repellency and toxicity of oil from *Artemisia annua* to certain stored-product beetles. *Journal of Economic Entomology* 93: 43–47.
- Trongtokit Y., Rongsriyam Y., Komalamisra N., Apiwathnasorn C. 2005.** Comparative Repellency of 38 Essential Oils against Mosquito Bites. *Phytother. Res.* 19: 303–309.
- Tworokski T. 2002.** Herbicide effects of essential oils. *Weed Science* 50:425–431.
- Vallès J., McArthur E. D. 2001.** *Artemisia* Systematics and Phylogeny: Cytogenetic and Molecular Insights. USDA Forest Service Proceedings RMRS-P-21.

- Vehrs S.L., Grafton-Cardwell E.E. 1994.** Chlorpyrifos effect on armored scale (Homoptera: Diaspididae) populations in San Joaquin Valley citrus. *Journal of Economic Entomology* 87: 1046-1057.
- Velickovic D.T., Ristic M.S., Randjelovic N.V., Smelcerovic A.A. 2002.** Chemical Composition and Antimicrobial Characteristic of the Essential Oils Obtained from the Flower, Leaf and Stem of *Salvia officinalis* L. Originating from Southeast Serbia. *J. Essential Oil Res.* 14 (6): 453-458.
- Verdeguer M., Blazquez M. A., Boira H. 2009.** Phytotoxic effects of *Lantana camara*, *Eucalyptus camaldulensis* and *Eriocephalus africanus* essential oils in weeds of Mediterranean summer crops. *Biochemical Systematics and Ecology* 37: 362-369.
- Vicidomini S. 2007.** Proprietà alternative dei fitoestratti di *Artemisia* (Asteraceae): check-list di Virus, Procarioti, Micoti, trattabili con fitoestratti di *Artemisia*. Contributo sulla agro-ecologia delle colture oggetto del progetto Co.Al.Ta. *Il Naturalista Campano* 10: 1-16.
- Wagner C., Friedt W., Marquard R.A., Ordon F. 2005.** Molecular analyses on the genetic diversity and inheritance of (-)- α -bisabolol and chamazulene content in tetraploid chamomile (*Chamomilla recutita* (L.) Rausch.). *Plant Sci* 169: 917-927.
- Wang J., Zhu F., Zhou X.M., Niu C.Y., Lei C.L. 2006.** Repellent and fumigant activity of essential oil from *Artemisia vulgaris* to *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *J. Stored Prod. Res.* 42: 339-347.
- Weglarz Z., Zalecki R., 1984.** Evaluation of southernwood *Artemisia-abrotanum* semi hardwood cuttings as a reproductive material. *Herba Polonica* 30 (2), 101-108.
- WHO – World Health Organization. 2003.** WHO guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants. Geneva, Switzerland: 72 pp.
- Xu H.X., Lee S.F. 2001.** Activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant bacteria. *Phytother Res* 15: 39-43.
- Yang R.Z., Tang C.S. 1988.** Plants Used for Pest Control in China: A Literature Review; *Economic Botany*. 42 (3): 376-406.
- Yarom I., Blumberg D., Ishaaya I. 1988.** Effects of Buprofezin on California Red Scale (Homoptera: Diaspididae) and Mediterranean Black Scale (Homoptera: Coccidae). *Journal of Economic entomology* 81 (6): 1581-1585.
- Young J.A., Evans R.A., 1975.** Germinability of Seed Reserves in a Big Sagebrush Community. *Weed Science*, 23 (5), 358-364.
- Yuenyongsawad S., Tewtrakul S. 2005.** Essential oil components and biological activities of *Coleus parvifolius* leale. *Songklanakarin J Sci Technol* 27: 497-502.
- Zarga M.A., Qauasmeh R., Sabri S., Munsoor M., Abdalla S. 1995.** Chemical Constituents of *Artemisia arborescens* and the Effect of the Aqueous Extract on Rat Isolated Smooth Muscle. *Planta Med.* 61 (3): 242-245.
- Zia M., Rehman R., Chaudhary M.F. 2007.** Hormonal regulation for callogenesis and organogenesis of *Artemisia absinthium* L. *African Journal of Biotechnology* 6 (16): 1874-1878.
- Zobolo A.M. 2010.** Effect of temperature, light intensity and growth regulators on propagation of *Ansellia africana* from cuttings. *African Journal of Biotechnology* 9 (34): 5566-5574.
- Zuzarte M., Gonçalves M.J., Cavaleiro C., Canhoto J., Vale-Silva L., Silva M.J., Pinto E., Salgueiro L. 2011.** Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lavandula viridis* L'Hér. *Journal of Medical Microbiology* 5 (60): 612-618.
- Zygadlo J.A., Grosso N.R. Guzman C.A. 1994.** Antifungal properties of the leaf oils of *Tagetes minuta* L. and *Tagetes filifolia* Lag. *J. Essent. Oil Res.* 6: 617-621.



FOTOGRAFIE





Artemisa Artese



Artemisia Torto

Artemisa arborescens L. – Artese

Località : Termini Imerese GPS : (N 37°58'28", E 13°44'13", 10 m s.l.m.);

Descrizione del luogo: L'area è caratterizzata da una intensa presenza antropica; le piante crescono su di una scarpata esposta a Nord nella zona retrostante i frangiflutti posti a protezioni dell'area portuale.

Il substrato è caratterizzato dal terreno di riporto del vicino cantiere stradale della strada che unisce la zona industriale al centro abitato e all'area portuale di Termini Imerese.

Artemisia arborescens L. – Torto

Località : Fiume Torto GPS : (N 37°57'53", E 13°46'30", 55 m s.l.m.),

Descrizione del luogo: L'area è caratterizzata da una ridotta presenza antropica legata prevalentemente alle opere realizzate per la protezione dell'alveo del fiume. Le piante crescono su delle scarpate realizzate con gabbie di pietra tufacea esposta a Nord –Est.

Il substrato è caratterizzato da un ridottissimo strato di suolo che solo in pochi casi supera i 20 cm mentre le zone di contatto tra le gabbie il suolo accumulato perfette una buona espansione degli apparati radicali.



Artemisia Diga



Artemisia Felice

Artemisia arborescens L. – Diga

Località : Diga Rosamarina GPS : (N 37°57'23", E 13°39'05", 198 m s.l.m.),

Descrizione del luogo: L'area è caratterizzata da una evidente presenza antropica che ha generato un ambiente del tutto artificiale. Le piante crescono su di un percorso non accessibile al transito di veicoli che probabilmente segue il percorso di un'antica regia trazzera risalente al periodo precedente alla realizzazione della diga.

Il substrato è caratterizzato da un suolo con evidente matrice argillosa ed evidentemente indisturbato.

Artemisia arborescens L. – Felice

Località : Ventimiglia di Sicilia - GPS : (N 37°56'44", E 13°36'38", 484 m s.l.m.);

Descrizione del luogo: L'area è caratterizzata da una lieve presenza antropica legata prevalentemente alla presenza di una strada asfaltata che collega i centri abitati di Trabia e Ventimiglia di Sicilia.

Le piante crescono in una ristretta area costituita dall'inpluvio di un corso d'acqua a carattere torrentizio.

Il substrato è caratterizzato da un suolo di matrice argillosa ed evidentemente indisturbato.



Artemisia 725



Artemisia Petru

Artemisia arborescens L. – 725

Località : Ventimiglia di Sicilia - GPS : (N 37°56'39", E 13°36'37", 431 m s.l.m.);

Descrizione del luogo: L'area è caratterizzata da una ridotta presenza antropica legata alla presenza di una coltivazione limitrofa di tipo estensivo. Le piante crescono in un'ampia area costituita da una piccola vallata esposta a nord-ovest.

Il substrato è caratterizzato da un suolo di matrice argillosa caratterizzato da un evidente presenza di scheletro ed uno strato piuttosto ridotto di suolo.

Artemisia arborescens L. – Petru

Località : Trabia - GPS : (N 37°59'46", E 13°38'53", 69 m s.l.m.);

Descrizione del luogo: L'area è caratterizzata da una consistente presenza antropica legata all'espansione del centro abitato di Trabia nell'ultimo ventennio; precedentemente l'area risultava disabitata ed utilizzata quasi esclusivamente come pascolo.

Le piante crescono nelle prossimità dell'unica strada di accesso alla zona, pertanto molto trafficata.

Il substrato è caratterizzato da un suolo di matrice argillosa caratterizzato da un evidente presenza di scheletro e roccia affiorante, lo strato di suolo si presenta piuttosto ridotto ed esposto a Nord.



Artemisia monte cane



Artemisia Agrigento

Artemisia arborescens L. – Monte Cane

Località : Santa Flavia - GPS : (38°06'47.74" N, 13°31'16.38" E, 31 m s.l.m.).

Descrizione del luogo: L'area è caratterizzata da una evidente presenza antropica legata alla realizzazione di un terrazzamento per la fruizione pubblica di un area di ricreazione estiva.

Le piante crescono nel terrazzamento che risulta essere abbandonato da un ventennio nelle prossimità dell'area costiera della frazione Mongerbino.

Il substrato è caratterizzato da un suolo di riporto proveniente dal rimescolamento del suolo originario manipolato durante la realizzazione dell'opera; lo strato di suolo disponibile risulta piuttosto variabile ma con un evidente presenza di drenaggio ed esposizione a Nord.

Artemisia arborescens L. – Agrigento

Località : Valle dei Templi

Descrizione del luogo: L'area è caratterizzata da una evidente presenza antropica legata alla realizzazione di area di pubblica fruizione. Le piante crescono in gruppi sparsi costituiti mediamente da 3 o 4 piante.

Il substrato è caratterizzato da un suolo di riporto proveniente dal rimescolamento del suolo originario manipolato durante la realizzazione dell'opera; lo strato di suolo disponibile, verosimilmente molto ridotto, presenta un evidente scheletro ed esposizione a Est.



Artemisia arborescens L. – Eremo



Artemisia arborescens L. – Sparacia (AG)

Artemisia arborescens L. – Eremo

Località: Ventimiglia di Sicilia - eremo di San Felice

Descrizione del luogo: L'area è caratterizzata da una ridottissima presenza antropica dovuta al recente recupero di un eremo medioevale utilizzato saltuariamente come campo base scout.

Le piante crescono lungo un "costone" roccioso ed in piccoli gruppi costituiti mediamente da 3 piante.

Il substrato è caratterizzato da suolo argilloso di ridottissimo spessore e con un evidente presenza di scheletro.

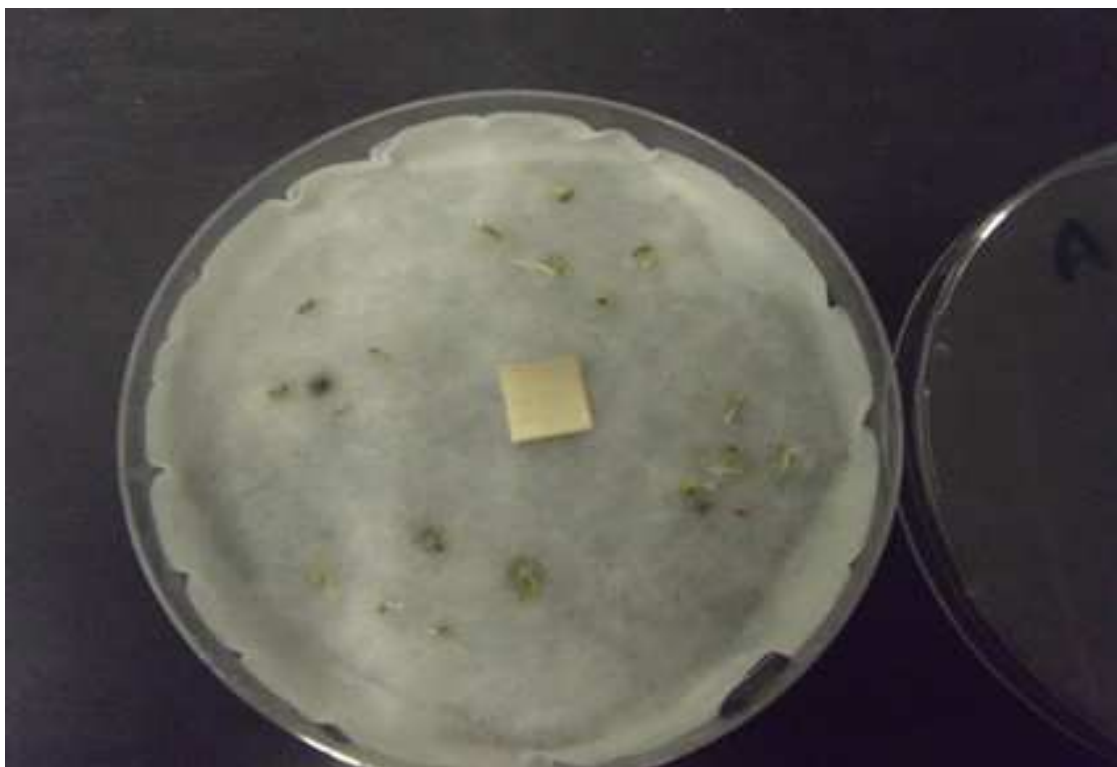
Artemisia arborescens L. – Sparacia

Località: Sparacia – Cammarata – Agrigento.

Descrizione del luogo: L'area è caratterizzata da una discreta attività antropica dovuta alla realizzazione e manutenzione delle sponde di un bacino idrico artificiale ad uso irriguo.

Le piante si ritrovano lungo tutto l'argine esposto a Nord-ovest con una elevata uniformità spaziale.

Il substrato evidenzia un'elevata presenza di argilla e limo con frequente formazione di crosta superficiale; apparentemente il sito presenta uno strato di suolo piuttosto elevato.



Germinazione artemisia



Germinazione Artemisia – radichetta allo stereomiscopio

Artemisia arborescens L. - Germinazione

Attività germinativa in piastra Petri:

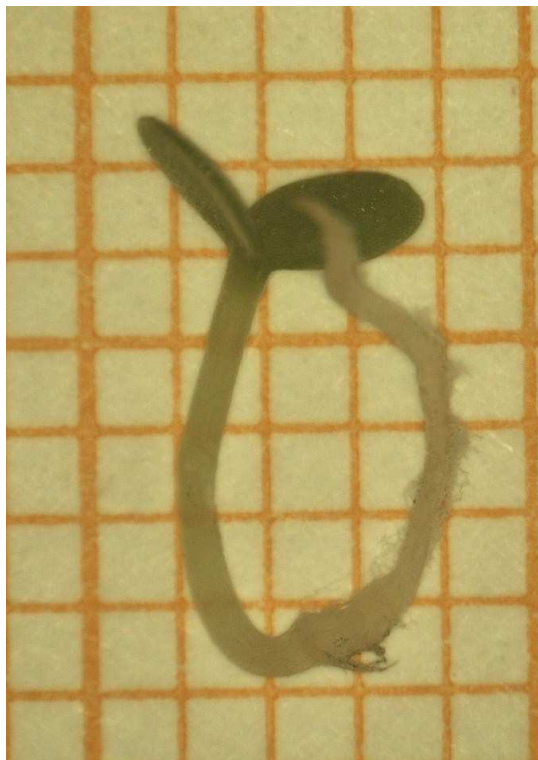
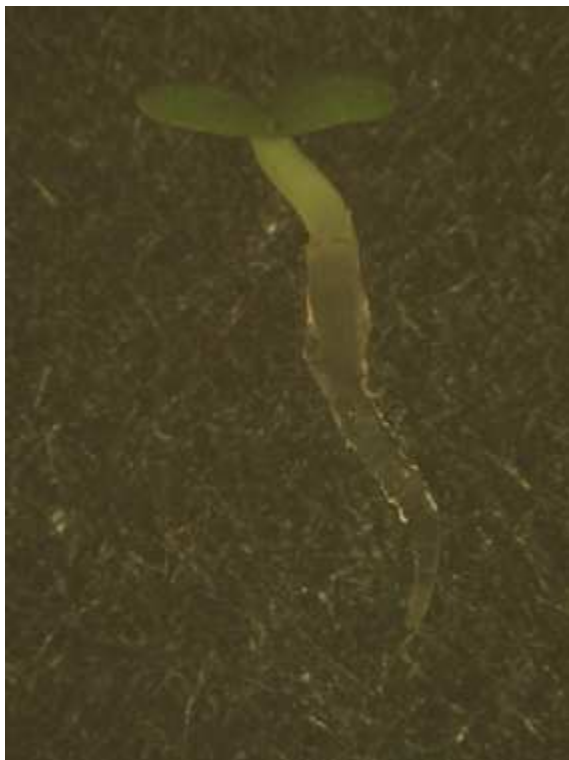
La prova di germinazione è stata condotta, presso il C.R.A. – SFM di Bagheria (PA), in piastra Petri ponendo i semi a germinare su della carta sterile imbibita di acqua e poste a germinare in camera termostata a diverse temperature e condizioni di luce.

Nella foto è possibile vedere i semi al momento della fuoriuscita della radichetta.

Artemisia arborescens L. - Germinazione

La foto, effettuata allo stereo microscopio ottico, mostra la fuoriuscita della radichetta dal seme in fase di germinazione.

L'apice radicale, in alto a destra, è identificabile per il colore bianco; subito a sinistra, di colore verde scuro, è distinguibile il seme. A seguire, con un colore grigio chiaro, la struttura del peduncolo che molto spesso rimane attaccato al seme.



Germinazione Artemisia – Plantula allo stereomicriscipio



Germinazione Artemisia – Plantula germinata in plateau

Artemisia arborescens L. – Germinazione

La foto, effettuata allo stereo microscopio elettronico mostra la plantula in fase di distensione dei cotiledoni.

E' possibile distinguere facilmente la porzione radicale dal colletto e la plantula.

Artemisia arborescens L. – Germinazione

In foto è riportata la germinazione in vivo dei semi di *Artemisia arborescens*.

E' possibile vedere come si presenta la plantula nella fase di emissione della "prima foglia vera"; in questa fase le plantule presentano un apparato radicale già molto più sviluppato di quello aereo.



Germinazione Artemisia – Pianta al momento del trapianto



Talea radicata al momento del trapianto

Artemisia arborescens L. - Germinazione

La foto mostra la piantina al momento del primo trapianto dopo 50 giorni dalla semina in vivo.

E' possibile notare come l'apparato radicale abbia già colonizzato il substrato; è evidente come nelle piantine provenienti da seme l'apparato radicale sia più sviluppato di quello aereo.

Artemisia arborescens L. – Radicazione talee

La prova di radicazione è stata condotta presso le strutture del C.R.A. SFM di Bagheria.

Nella foto, alcune talee radicate al momento del trapianto dal substrato di radicazione al vasetto di accrescimento.

Gli apparati radicali sono evidentemente meno sviluppati rispetto a quelli presenti nelle piantine provenienti da seme; mentre la parte aerea è molto più sviluppata nelle talee.

Le radici, seppur più corte ed in numero ridotto presentano una consistenza superiore alle radici delle piantine provenienti da seme.



Sparacia (AG) – Prova di taglio



Sparacia (AG)- Prova di taglio- piante tagliate

Artemisia arborescens L. – Sparacia (Ag)

Foto del campo sperimentale realizzato presso l'azienda sperimentale universitaria "Sparacia".

Il campo è stato realizzato per studiare le fasi di accrescimento delle piante, provenienti da diverse tecniche di propagazione, poste pieno campo. E' stato possibile inoltre avviare una prova di confronto tra altezza di taglio differenti per la raccolta del materiale da avviare alla distillazione.

Artemisia arborescens L. – Prova di taglio

In foto è possibile notare le differenti altezze di taglio in prova; in primo piano le piante vengono tagliate a 40 cm di altezza (TA) mentre in fondo è possibile vedere una pianta tagliata a 25 cm dal suolo (TB)



Estrattore per Oli essenziali – Albrigi Luigi



Olio Essenziale di *Artemisia arborescens* L.

Estrattore per oli essenziali Albrigi Luigi

Il dispositivo utilizzato per l'estrazione dell'olio essenziale è costituito da un distillatore in corrente di vapore, della capacità nominale di 20 litri, dotato di ricircolo delle acque di vegetazione.

Per il riscaldamento del distillatore è stato utilizzato un bruciatore a gas butano.

Artemisia arborescens L. – Olio essenziale

In foto è possibile notare il colore azzurro intenso che caratterizza l'olio essenziale di Artemisia arborescens dovuto all'alto contenuto di Chamazulene.

L'olio si caratterizza, oltre che per il colore, per un intenso odore balsamico dovuto al contenuto canfora.

Inoltre è possibile notare come l'elevata densità dell'olio permette l'adesione dell'olio lungo le pareti della colonna.



Dispositivo infestazione artificiale – DIAR



Attività insetticida di olio essenziale di *Artemisia arborescens*

Attività Insetticida dell'olio essenziale di Artemisia arborescens

Il dispositivo per l'infestazione artificiale è stato sviluppato, grazie alla collaborazione con IAM dell'università Politecnica di Valencia, per garantire l'approvvigionamento di frutti infestati in tutte le fasi della prova

Il dispositivo è stato sviluppando partendo dall'analisi della bibliografia presente sulle fasi di infestazione di *Aoenidiella aurantii* e cercando di riprodurre le medesime condizioni di umidità e luminosità presenti in campo nei periodi di massima infestazione.

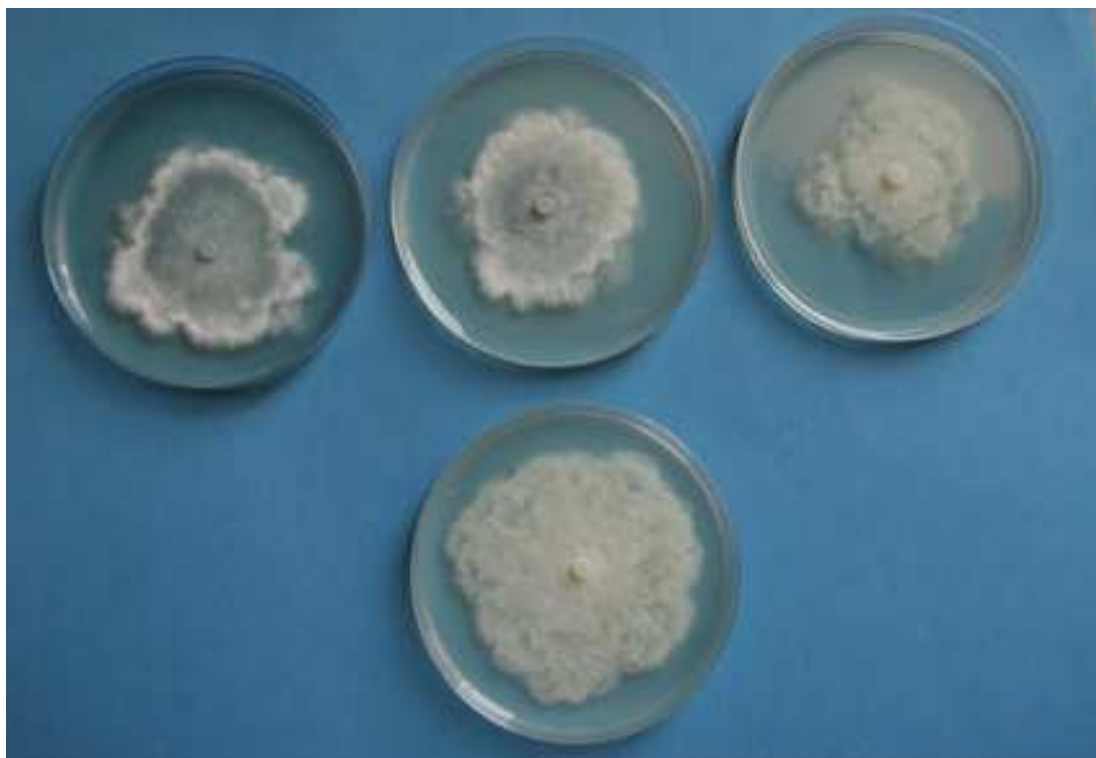
Il dispositivo ha permesso di ottenere, per un periodo di circa 5 mesi, frutti infestati con un numero di individui compatibile con le esigenze della prova.

Attività insetticida dell'olio essenziale di Artemisia arborescens.

La foto mostra l'emulsione utilizzata per i trattamenti ed il frutto dopo il trattamento.

Sul frutto sono stati marcati gli individui (50 per frutto) in modo da facilitarne il conteggio nelle fasi successive della prova.

La formulazione è stata ottenuta emulsionando l'olio essenziale, lecitina di soia e acqua.



Attività fughicida dell'olio essenziale – *Phytophthora citrophthora*



Attività erbicida dell'olio essenziale – *Portulaca oleracea*

Attività fungicida dell'olio essenziale di *Artemisia arborescens*.

Le prove sono state condotte presso i laboratori della sezione di Patologia del C.R.A. SFM di Bagheria.

L'inoculo del micelio fungino è stato posto al di sopra di un disco di substrato recante una dose nota di olio essenziale.

L'effetto dell'olio essenziale è stato valutato in funzione dell'inibizione dell'accrescimento del micelio fungino posto in condizioni ottimali di sviluppo.

La foto mostra l'effetto dell'olio essenziale su *Phytophthora citrophthora* alle dosi di 1000, 500 e 100 ppm (da sinistra a destra in alto, sotto il controllo con acqua).

Attività erbicida dell'olio essenziale di *Artemisia arborescens*.

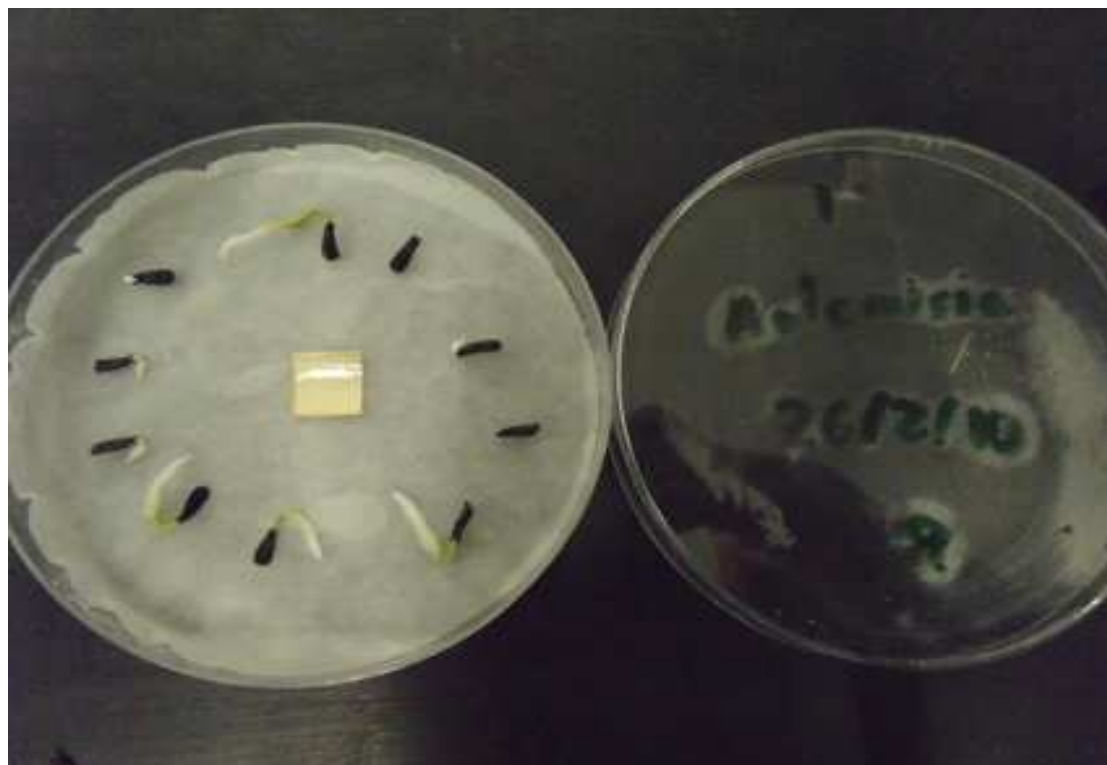
Le prove sono state condotte presso i laboratori di Risorse Naturali dell'Istituto Agroforestal Mediterraneo dell'Università Politecnica di Valencia.

I semi delle essenze infestanti sono stati posti su di un disco di carta sterile imbibita con acqua ed un dose conosciuta di olio essenziale.

Le piastre una volta sigillate sono state poste in camera termostata per garantire le condizioni ottimali di germinabilità.

Da conteggi successivi è stato possibile valutare l'attività inibente dell'olio essenziale.

Nella foto è possibile notare come la *Portulaca oleracea* non ha mostrato alcuna sensibilità al trattamento effettuato con la dose massima di olio essenziale.



Attività erbicida dell'olio essenziale – Arauja sericifera

Attività erbicida dell'olio essenziale di Artemisia arborescens.

Le prove sono state condotte presso i laboratori di Risorse Naturali dell' Istituto Agroforestal Mediterraneo dell' Università Politecnica di Valencia.

I semi delle essenza infestanti sono stati posti su di un disco di carta sterile imbibita con acqua ed un doe conosciuta di olio essenziale.

Le piastre una volta sigillate sono state poste in camera termostata per gatanire le condizioni ottimali di germinabilità.

Da conteggi successivi è stato possibile valutare l'attività inibente dell'olio essenziale.

Nella foto è possibile notare come la Araujia sericifera ha mostrato una certa sensibilità al trattamento effettuato con la dose massima di olio essenziale; le plantule, seppur presenti, non hanno mostrato una buona vitalità.

***Artemisia arborescens* L.: essential oil composition and effects of plant growth stage in some genotypes from Sicily.**

Marcello Militello, Alessandra Carrubba*

Dipartimento dei Sistemi Agro-Ambientali, Facoltà di Agraria, Università degli Studi di Palermo, Viale delle Scienze s/n, 90128 Palermo, Italia.

María Amparo Blázquez

Departament de Farmacologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de València, Avda Vicent Andrés Estellés s/n, E-46100 Burjassot, Spain

Abstract

Essential oils from aerial parts of several *Artemisia arborescens* L. populations, collected in five different localities of Sicily were analyzed by GC-FID and GC-MS in order to study the chemical composition and its variability due to phenological stage.

Forty-three compounds, accounting for more than 92% of the oil, were identified. Monoterpene fraction with the exception of Petru population was higher than the sesquiterpene fraction. β -thujone (20.5-55.8 %), chamazulene (15.2-49.4%), camphor (1.3-10.7%) and germacrene D (2.3-3.4%) were the main compounds.

Chemical composition was influenced by phenological stage, with an increase in the monoterpene fraction at flowering stage; in both stages, the main compounds were always the oxygenated monoterpene β -thujone and the sesquiterpene hydrocarbon chamazulene.

Key Word Index

Artemisia arborescens L.; essential oil; distillation time; phenological stage; chamazulene; β -thujone; camphor; germacrene D.

Introduction

Artemisia is a genus belonging to *Asteraceae* family, widely distributed throughout the temperate regions, including many species largely employed as ornamental plants. Although some of them are known as toxic due to their high content in thujone, mainly α -thujone isomer, some *Artemisia* species are also popular in folk medicine as digestive, stimulants or as anti-inflammatory agents, and their aromatic leaves are used as culinary herbs or in flavouring beverages (1, 2, 3). In Italy, about 20 species belonging to the *Artemisia* genus are reported and only 5 species are described in Sicilian flora (4). *A. arborescens* L., the most represented inside the region, is a morphologically highly variable species; it is a perennial woody shrub, about 1 m in height, erect, many-branched, more or less tomentose, whitish and silvery in the youngest parts and bearing many yellow flowers (1, 2, 4).

Some difficulty arises in botanical classification of some *Artemisia* species due to their high morphological similarity, and some Authors (4, 6, 7) suggest that the high variability in chemical composition of *Artemisia* essential oils could be considered as a chemiotaxonomic marker of the genus. As a matter of fact, the composition of *Artemisia* essential oils was found to vary greatly according to the species and the growing site (8, 9, 10), and inside each species some studies have recognized the

occurrence of different chemotypes (11, 12, 13). Hence, the investigations about *Artemisia* essential oils could allow a chemotaxonomical clarification of the systematic position of such species on the basis of their chemical composition (3, 5). The major compounds reported in *A. annua* L. (10, 14) were artemisia ketone, β -caryophyllene and 1,8-cineole respectively; in *A. campestris* L. (15) α -pinene, p-cymene and camphor; in *A. herba-alba* Asso. (16) α and β -thujone, camphor and borneol. In *A. vulgaris* essential oil the main compound was found to be caryophyllene oxide when plants were growing in Cuba, whereas in cultivated plants from Croatia and France they were 1,8-cineole or α -phellandrene (17). In the essential oil of *A. afra* Jacq. ex Willd. from South Africa, α -thujone, β -thujone, 1,8-cineole and camphor have been described as the main compounds, whereas artemisyl acetate and yomogi alcohol were found in majority when the plants were harvested in Ethiopia, and artemisia ketone, 1,8-cineole and α -copaene/camphor in plants grown in Zimbabwe (18).

In *A. arborescens* L. three chemotypes have been identified, namely a chamazulene type (American oil), a β -thujone type (Morocco oil) and a β -thujone/chamazulene type (19, 20). Steam-distilled plant samples from two Italian locations showed sabinene, thujone, terpinen-4-ol and chamazulene as major compounds, expressing as their

main difference the amount of camphor, detected as a "principal component" in the accession from Sardinia, and almost absent from the sample collected in Liguria (21). A trial carried out about *A. arborescens* grown in three localities of Southern Italy showed a very similar chemical profile of the obtained essential oils, in all three cases characterized by a high content in camphor and chamazulene, whereas a few differences showed up only concerning the less represented compounds (22).

The relationship between the composition of essential oil and the development stage of plants has been deepened on a few botanical families different from *Asteraceae*. In Turkey, an important correspondence was found between plant growing stage and chemical composition in some wild species from *Labiatae* (23). In Algeria, the essential oil of *Pistacia atlantica* Desf. showed a significant relationship between seasonal variation and antioxidant activity (24). The modifications of essential oil throughout plant development phases was also studied in Italy on *Salvia sclarea* L. (25) and *Coriandrum sativum* L. (26). Similar works were carried out on some species from genus *Artemisia* as *A. pallens* Wall. in India (11), *A. molinieri* Quézel, M.Barbero & R.J.Loisel in France (12), *A. annua* L. in India (14) and *A. scoparia* Waldst. & Kit. in Iran (13).

The aim of this work was to analyse the essential oils of different populations of *Artemisia arborescens* collected from various localities of Sicily during both vegetative and flowering stage, in order to:

- Characterize the populations from the chemical point of view;
- State the variations in essential oil composition between plants from the same population collected in different phenological stages.

Experimental

Plant material: Fresh plant samples of *A. arborescens* growing in Sicily were collected from 5 different sites: PETRU (N 37°59'46", E 13°38'53", 69 m); DIGA (N 37°57'23", E 13°39'05", 198 m), FELICE (N 37°56'44", E 13°36'38", 484 m), TORTO (N 37°57'53", E 13°46'30", 55 m), ARTESE (N 37°58'28", E 13°44'13", 10 m) in January 2010, when the plants were at the vegetative stage (all sites) and in July-August 2010 when they were at flowering stage (only in the first three sites). Voucher specimens were deposited in the Herbarium Mediterraneo, at the Botanical Garden of the Università degli Studi di Palermo (PAL). The collected aerial parts were subjected to hydrodistillation for 3 h by means of a specific apparatus (Estrattore Albrigi Luigi – Verona, IT), yielding in average 0.35 ± 0.04 , (% v/w), of a bluish essential oil. The oil obtained was dried with anhydrous sodium sulphate and stored at 4-6 °C until it was analyzed by capillary gas liquid chromatography (GC) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

Analysis of the essential oils: GC was performed using a Clarus 500GC Perkin–Elmer apparatus equipped with a flame ionization detector (FID), a Hewlett–Packard HP-1 (cross-linked methyl silicone) capillary column 30 m long

and 0.2 mm i.d., with 0.33 μm (micrometer) film thickness. The column temperature program was 60 °C for 5 min, with 3 °C increases per min to 180 °C, then 20 °C increases per min to 280 °C which was maintained for 10 min. The carrier gas was helium at a flow-rate of 1 ml/min. Both the FID and injector port temperature were maintained at 250 °C and 220 °C respectively. GC-MS analysis was carried out with a Varian Saturn 2000 equipped with a Varian C.S VA-5MS capillary column 30 m long and 0.25 mm i.d. with 0.25 μm film thickness. The same working conditions used for GC and split mode injection (ratio 1:25) were employed. Mass spectra were taken over the m/z 28–400 range with an ionizing voltage of 70 eV. Retention indices were calculated using co-chromatographed standard hydrocarbons. The individual compounds were identified by mass spectra and their identity was confirmed by comparing their retention indices, relative to C8–C32 n-alkanes. Identification of individual compound was carried out by matching mass fragmentation pattern with those from the available authentic samples or with NIST 2005 Library and literature (27).

Results and Discussion

Characterization of essential oils: The qualitative and quantitative composition of the essential oils obtained from 5 populations of *A. arborescens* are given in Table I, whereas an example of GC-FID chromatogram relative to one of the obtained essential oils (Petru) is reported in figure 1.

INSERT FIGURE 1 HERE

In Table I, all compounds are classed by phytochemical groups and listed in order of their elution on a methyl silicone HP-1 column. A total of 43 compounds, accounting for 92 - 99% of total oil, were identified. As shown, no significant differences were detectable in the qualitative composition of the oils obtained from the diverse populations, whereas some quantitative variations were found. All the essential oils were dominated by monoterpene fraction, with 13 monoterpene hydrocarbons (6.3 - 15.7 %) and 14 oxygenated monoterpenes (37.5 - 65.0 %) identified. Among the monoterpene hydrocarbons only camphene, sabinene, β -pinene, myrcene, α - and γ -terpinene reached percentages higher than 1%. Among the oxygenated monoterpenes, β -thujone (20.5 - 55.9 %), camphor (1.3 - 10.7 %), terpinen-4-ol (1.0 - 3.9 %), α -terpineol (0.5 - 2.5 %) and carvacrol (0.1 - 1.6 %) were the main compounds. On the other hand in the sesquiterpene fraction, only 13 compounds were identified. The sesquiterpene hydrocarbons constituted the second most important group with chamazulene (15.2 - 49.4 %), germacrene-D (2.3 - 3.4 %) and β -caryophyllene (0.6 - 0.9 %) as the main compounds in all populations. Three oxygenated sesquiterpenes, dehydro-sesquiceneole, germacrene-D-4-ol and caryophyllene oxide were identified. This fraction reached 0.2 - 0.4 % of the total

essential oil. The quantitative prevalence of β -thujone and chamazulene can be considered a preminent chemical characteristic of the essential oil of the Sicilian *Artemisia arborescens* populations under observation. A comparison between our data and other coming from similar areas (22) shows some differences as concerns the relative quantities of a few compounds, the most significant being β -thujone that in four cases over five reached values higher than 41 %. In this respect, a similarity in chemical composition could be found between our essential oils and those described by other authors (20, 28) in genotypes growing in different areas of the Mediterranean basin; no variation could be definitively attributed to geographical provenance of the plants, and it showed up the necessity to carry out further studies about the relationships between the chemical profile of the essential oils and other environmental variables, e.g., as suggested by some Authors (28) soil type.

Effect of phenological stage: The composition of the essential oils, obtained from plants collected at two phenological stage, is given in Table II, where the compounds are listed in order of their elution on a methyl silicone HP-1 column. Only the major compounds are reported, with a total of 36 compounds accounting for 95% of total oil. The chemical composition of the samples is very similar, with β -thujone and chamazulene as the main compounds, followed by camphor and germacrene D. In this case also, the results obtained show differences in the quantitative but not in the qualitative composition, as sketched in figure 2.

INSERT FIGURE 2 HERE

The monoterpene fraction reached values of 61.8 % and 69.0 % in vegetative and flowering stage respectively, being the most important compounds β -thujone (33.4 % - 42.6 %) and camphor (7.5 % - 5.5 %).

In sesquiterpene fraction a decrease was found from 34.7 % to 29.2 %, mostly due to the variation in chamazulene (28.1 % - 24.4 %) and germacrene D (3.6 % - 2.8 %) content.

In conclusion, our study demonstrates that:

- The main compounds that describe the chemical profiles of the populations under observation are chamazulene and β -thujone; in the examined essential oils, furthermore, the monoterpene fraction is more abundant than the sesquiterpene fraction.
- The phenological stage exerts a clear effect on the quantitative rather than on qualitative composition of essential oil, and a definite increase of monoterpenes and decrease of sesquiterpenes is detectable as plants pass from vegetative to flowering stages.

Acknowledgements

The Authors are grateful to Prof. Herminio Boira and Prof. Mercedes Verdeguer of the Instituto Agroforestal Mediterráneo de Valencia (Spain), for their help in botanical identification of the species.

References

1. R. Costa, M. R. De Fina, M. R. Valentino, A. Rustaiyan, P. Dugo, G. Dugo and L. Mondello, An investigation on the volatile composition of some *Artemisia* species from Iran. *Flavour Fragr. J.*, **24**, 75–82 (2009).
2. A. Lamharrar, A. Idlimam, C.S. Ethmane Kane, A. Jamali, N. Abdenouri and M. Kouhila, Sorption Isotherms and Drying Characteristics of *Artemisia arborescens* Leaves. *Journal of Agronomy*, **6**, 4: 488-498 (2007).
3. M. Q. Hayat, M. Ashraf, M. A. Khan, T. Mahmood, M. Ahmad and S. Jabeen, Phylogeny of *Artemisia* L.: Recent developments. *African Journal of Biotechnology*, **11**, **8**: 2423-2428 (2009).
4. S. Pignatti, *Flora d'Italia* - Vol.III., Edagricole, Bologna, Italy (1982). In Italian.
5. C. Depege, L. Lizzani, M. Loiseau, D. Cabrol Bass, M. J. P. Ferreira, A. J. C. Brant, J. S. L. T. Militao and V. P. Emerenciano, Chemotaxonomic Study of *Artemisia*. An approach based on multivariate statistics of skeletal types retrieved from essential oils. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, **5**, **4**: 72-83 (2006).
6. C. Sinico, A. De Logu, F. Lai, D. Valenti, M. Manconi, G. Loy, L. Bonsignore and A. M. Fadda, Liposomal incorporation of *Artemisia arborescens* L. essential oil and in vitro antiviral activity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **59**: 161–168 (2005).
7. A. Abderrahim, K. Belhamel, J.C. Chalchat and G. Figuéredo. Chemical Composition of the Essential Oil from *Artemisia arborescens* L. Growing Wild in Algeria. *Rec. Nat. Prod.*, **4**: 87-90 (2010)
8. K. W. Davies, J. D. Bates and R. F. Miller, Environmental and vegetation relationships of the *Artemisia tridentata* spp. *wyomingensis* alliance. *Journal of Arid Environments*, **70**: 478–494 (2007).
9. N.S. Sangwan, A. H. A. Farooqi, F. Shabih and R. S. Sangwan, Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation*, **34**: 3–21 (2001).
10. S. Khangholi and A. Rezaeinodehi, Effect of drying temperature on essential oil content and composition of sweet wormwood (*Artemisia annua*) growing wild in Iran. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **6**, **11**: 934-937 (2008).
11. G. R. Mallavarapu, R. N. Kulkarni, K. Baskaran, L. Rao and S. Ramesh, Influence of plant growth stage on the essential oil content and composition in *Davana* (*Artemisia pallens* Wall.). *J. Agric. Food Chem.*, **47**: 254-258 (1999).
12. V. Masotti, F. Juteau, J. M. Bessiere and J. Viano, Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. *J. Agric. Food Chem.*, **51**: 7115-7121 (2003).
13. M. H. Mirjalili, S. M. F. Tabatabaei, J. Hadian, S. Nejad Ebrahimi and A. Sonboli, Phenological variation of the essential oil of *Artemisia scoparia* Waldst. et Kit from Iran. *J. Essent. Oil Res.*, **19**: 326-329 (2007).
14. F. Haider, P. Dwivedi, S. Singh, A. A. Naqvi and G. Bagchi, Influence of transplanting time on essential oil yield and composition in *Artemisia annua* plants grown under the climatic conditions of sub-tropical north India. *Flavour Fragr. J.*, **19**: 51–53 (2004).
15. A. Akrouf, R. Chemli, I. Chreif and M. Hammami, Analysis of the essential oil of *Artemisia campestris* L. *Flavour Fragr. J.*, **16**: 337–339 (2001).
16. H. Mohsen and F. Ali, Essential Oil Composition of *Artemisia herba-alba* from Southern Tunisia, *Molecules*, **14**: 1585-1594 (2009).
17. I. Jerkovic, J. Mastelic, M. Milos, F. Juteau, V. Masotti and J. Viano, Chemical variability of *Artemisia vulgaris* L. essential oils originated from the Mediterranean area of France and Croatia. *Flavour Fragr. J.*, **18**: 436–440 (2003).
18. L. S. Chagonda, C. Makanda and J.-C. Chalchat, The essential oil of cultivated *Artemisia afra* (Jacq.) from Zimbabwe. *Flavour Fragr. J.*, **14**: 140-142 (1999).
19. R. Pappas and S. Sheppard-Hanger, *Artemisia arborescens* - essential oil of the Pacific Northwest: a high-chamazulene, low-thujone essential oil with potential skin-care applications. Atlantic institute (2004) <http://www.atlanticinstitute.com/artemisia.pdf> [last accessed April 19th 2011]
20. B. Marongiu; A. Piras; and S. Porcedda, Comparative analysis of the oil and supercritical CO₂ extract of *Artemisia arborescens* L. and *Helichrysum splendidum* (Thunb.) Less. *Natural Product Research*, **5**, **20**: 421-428 (2010).
21. T. Sacco, C. Frattini and C. Bicchi. Constituents of essential oil of *Artemisia arborescens*. *Planta Medica*, **47**: 49-51 (1983).
22. M. Lo Presti, M. L. Crupi, B. d'A. Zellner, G. Dugo, L. Mondello, P. Dugo and S. Ragusa. Characterization of *Artemisia arborescens* L. (*Asteraceae*) leaf-derived essential oil from Southern Italy. *J. Essent. Oil Res.*, **19**, 218–224 (May/June 2007).
23. F.J. Muller-Riebau, B.M. Berger, O. Yegen and C. Cakir, Seasonal variations in the chemical compositions of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey, *J. Agric. Food Chem.*, **45**: 4821-4825 (1997).
24. N. Gourine, M. Yousfi, I. Bombarda, B. Nadjemi and E. Gaydou, Seasonal variation of chemical composition and antioxidant activity of essential oil from *Pistacia atlantica* Desf. leaves. *J Am Oil Chem Soc*, **87**: 157–166 (2010).
25. A. Carrubba, R. la Torre, R. Piccaglia and M. Marotti, Characterization of an Italian biotype of clary sage (*Salvia sclarea* L.) grown in a semi-arid Mediterranean environment. *Flavour Frag. J.*, **17**: 191-194 (2002).

26. A. Carrubba, V. Ascolillo, A.T. Pagan Domenech, F. Saiano and P. Aiello, Modifications over time of volatile compounds in Coriander (*Coriandrum sativum* L.), *Acta Horticulturae* **826**: 43-49 (2009).
27. R. P. Adams, Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, fourth ed. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, USA (2007).
28. E. Biondi, G. Valentini, B. Bellomaria and V. Zuccarello, Composition of essential oil in *Artemisia arborescens* L. from Italy, *Acta Horticulturae*, **344**: 290-304 (1993).

Table I - Chemical composition of essential oils from five populations of *A. arborescens* growing in Sicily.

	COMPOUNDS	RI _L	RI _C	PETRU [%]	Std. Er.	DIGA [%]	Std. Er.	FELICE [%]	Std. Er.	ARTE [%]	Std. Er.	VENTI [%]	Std. Er.
	Monoterpene Hydrocarbons			7.6		6.3		11.2		12.2		15.7	
1	<i>cis</i> -Salvene	856	856	0.1	0.01	0.1	0.00	0.1	0.00	t		t	
2	α -Thujene	930	930	0.2	0.02	t		t		t		t	
3	α -Pinene	939	938	0.9	0.00	0.3	0.01	0.6	0.31	1.0	0.25	0.8	0.12
4	Camphene	954	955	0.6	0.18	0.2	0.00	1.5	0.00	1.0	0.32	0.6	0.14
5	Sabinene	975	977	1.3	0.49	t		1.4	0.66	2.0	0.28	3.0	0.40
6	β -Pinene	979	979	t		1.4	0.20	0.2	0.00	0.1		t	
7	Myrcene	990	992	1.6	0.70	2.5	0.48	5.1	2.70	5.4	0.85	6.8	0.84
8	α -Phellandrene	1002	1009	t		0.2	0.02	0.1	0.00	0.2	0.02	0.2	0.03
9	α -Terpinene	1017	1020	0.4	0.00	0.4	0.04	0.5	0.27	0.5	0.20	1.2	0.30
10	<i>p</i> -Cymene	1024	1030	0.8	0.15	0.2	0.03	0.2	0.09	0.3	0.07	0.3	0.06
11	Limonene	1029	1034	t		t		0.2	0.06	0.3	0.09	0.2	0.00
12	γ -Terpinene	1054	1063	1.6	0.26	0.9	0.14	1.1	0.52	1.0	0.38	2.4	0.55
13	Terpinolene	1088	1089	0.3	0.05	0.1	0.00	0.3	0.15	0.4	0.00	0.3	0.09
	Oxygenated Monoterpenes			37.5		55.1		65.0		62.1		56.8	
14	1,8-Cineole	1031	1039	0.4	0.14	0.2	0.01	0.2	0.04	0.2	0.01	0.2	0.01
15	<i>cis</i> -Sabinene hydrate	1070	1077	1.3		0.9	0.20	1.2	0.46	2.3	0.30	2.6	0.32
16	<i>trans</i> -Sabinene-hybrate	1098	1100	t		t		t		t		t	
17	Linalol	1096	1106	1.5		t		t		t		t	
18	α -Thujone	1102	1111	0.9	0.25	1.0	0.18	1.5	0.32	0.8	0.02	0.5	0.02
19	β -Thujone	1114	1121	20.5	3.40	49.5	1.09	55.9	3.35	44.0	3.64	41.7	6.79
20	<i>cis-p</i> -Menth-2-en-1-ol	1121	1127	t		t		0.1	0.02	0.1	0.00	0.2	0.03
21	Camphor	1146	1155	8.4	1.09	1.3	0.42	2.3	1.42	10.7	3.09	6.5	2.08
22	Borneol	1169	1179	t		t		1.0	0.00	0.3	0.00	0.2	0.01
23	Terpinen-4-ol	1177	1186	1.0	0.32	1.2	0.11	1.8	0.22	1.5	0.53	3.9	0.82
24	α -Terpineol	1188	1192	2.5	0.04	0.5	0.01	0.7	0.22	0.5	0.04	0.7	0.02
25	Carvacrol	1299	1301	0.1	0.00	0.2	0.00			1.6	0.49	0.3	0.00
26	Neryl isovalerate	1583	1584	t		t		t		t		t	
27	Geranyl isovalerate	1607	1609	0.8	0.15	0.3	0.04	0.2		0.2	0.04	0.2	0.00
	Sesquiterpene Hydrocarbons			53.9		30.1		19.7		19.4		21.7	
28	α -Copaene	1376	1378	0.4									
29	β -Bourbonene	1388	1388	0.2	0.01	0.3	0.05	0.3	0.04	0.2	0.02	0.2	0.01
30	β -Caryophyllene	1419	1422	0.6	0.11	0.9	0.13	0.8	0.28	0.7	0.05	0.8	0.06
31	α -Humulene	1454	1454	t		t		t		t		t	
32	Germacrene D	1484	1484	2.8	0.31	3.4	0.66	3.1	0.18	2.4	0.25	2.3	0.07
33	Bicyclogermacrene	1500	1500	t		0.1	0.01	0.1	0.00	0.1	0.00	t	
34	α -Farnesene	1505	1507	0.5	0.07	0.4	0.14	0.1	0.01	0.2	0.00	t	
35	Calacorene isomer		1516	t		t		t		t		t	
36	δ -Cadinene	1523	1526	t		t		t		t		t	
37	Chamazulene	1731	1744	49.4	8.59	24.9	2.23	15.2	3.76	15.7	2.51	18.5	1.57
	Oxygenated Sesquiterpenes			0.2		0.4		0.4		0.4		0.3	
38	Dehydro-Sesquicineole	1471	1471	t		0.1	0.01	0.2	0.03	0.1	0.00	0.2	0.00
39	Germacrene D-4-ol	1575	1580	t		t		t		t		t	
40	Caryophyllene oxide	1583	1592	0.2	0.00	0.3	0.00	0.3	0.00	0.3	0.00	0.2	0.00
	Others			t		0.3		0.9		0.6		0.8	
41	6-Methyl-5-hepten-2-one	985	986	t		t		t		t		t	
	Methyl butyl-2-methyl												
42	butyrate	1100	1104	t		0.3	0.04	0.9	0.23	0.6	0.14	0.8	0.12
43	Methyl eugenol	1403	1404	t		t		t		t		t	
				99.1		92.1		97.3		94.7		95.4	

RI_L= retention index from Adams (2007); RI_C= retention index calculated; Std.Err. = standard error; t= traces < 0.1.

Table II - Effect of phenological stage on the chemical composition of *A. arborescens* essential oils.

Compounds	Vegetative stage	Std. Err.	Flowering stage	Std. Err.
Monoterpene Hydrocarbons				
<i>cis</i> -Salvene	0.1	0.02		
α -Thujene	0.1	0.01	0.2	0.00
α -Pinene	0.7	0.07	0.7	0.11
Camphene	0.7	0.07	0.8	0.22
Sabinene	2.3	0.41	2.0	0.31
β -Pinene	0.1	0.00	0.6	0.33
Myrcene	2.4	0.20	4.5	1.05
α -Phellandrene	0.2	0.13	0.2	0.02
α -Terpinene	0.6	0.03	0.7	0.14
<i>p</i> -Cymene	0.4	0.11	0.4	0.12
Limonene	0.2	0.05	0.2	0.02
γ -Terpinene	1.4	0.09	1.4	0.26
Terpinolene	0.4	0.20	0.3	0.04
Oxygenated Monoterpenes				
1,8-Cineole	0.2	0.03	0.2	0.05
<i>cis</i> -Sabinene hydrate	0.9	0.27	1.7	0.32
Linalool	0.3	0.01	1.5	0.01
α -Thujone	0.6	0.11	1.0	0.21
β -Thujone	33.4	4.55	42.6	6.13
<i>cis-p</i> -Menth-2-en-1-ol	0.1	0.01	0.1	0.01
Camphor	7.5	0.92	5.5	1.99
Borneol	0.3	0.10	0.4	0.12
Terpinen-4-ol	1.8	0.24	1.9	0.52
α -Terpineol	0.2	0.03	1.0	0.38
Carvacrol	0.7	0.26	0.4	0.00
Geranyl isovalerate	0.3	0.04	0.3	0.12
Sesquiterpene Hydrocarbons				
α -Copaene	0.7	0.26	0.6	0.12
β -Bourbonene	0.2	0.04	0.4	0.01
β -Caryophyllene	1.2	0.20	0.2	0.03
α -Humulene	0.2	0.01	0.7	0.06
Germacrene D	3.6	0.52	2.8	0.21
Bicyclogermacrene	0.1	0.02	0.1	0.00
α -Farnesene	0.2	0.03	0.3	0.08
Chamazulene	28.1	3.64	24.4	6.56
Oxygenated Sesquiterpenes				
Dehydro-Sesquicineole -	0.2	0.03	0.2	0.02
Caryophyllene oxide	0.2	0.01	0.2	0.02
Others				
Methyl butyl-2-methyl butyrate	0.5	0.14	0.6	0.11

Std.Err. = Standard Error.

Figure 1 - GC-FID chromatogram relative to an *Artemisia arborescens* essential oil (loc. Petru). The peak numbers correspond to the numbers of compounds listed in Table I.

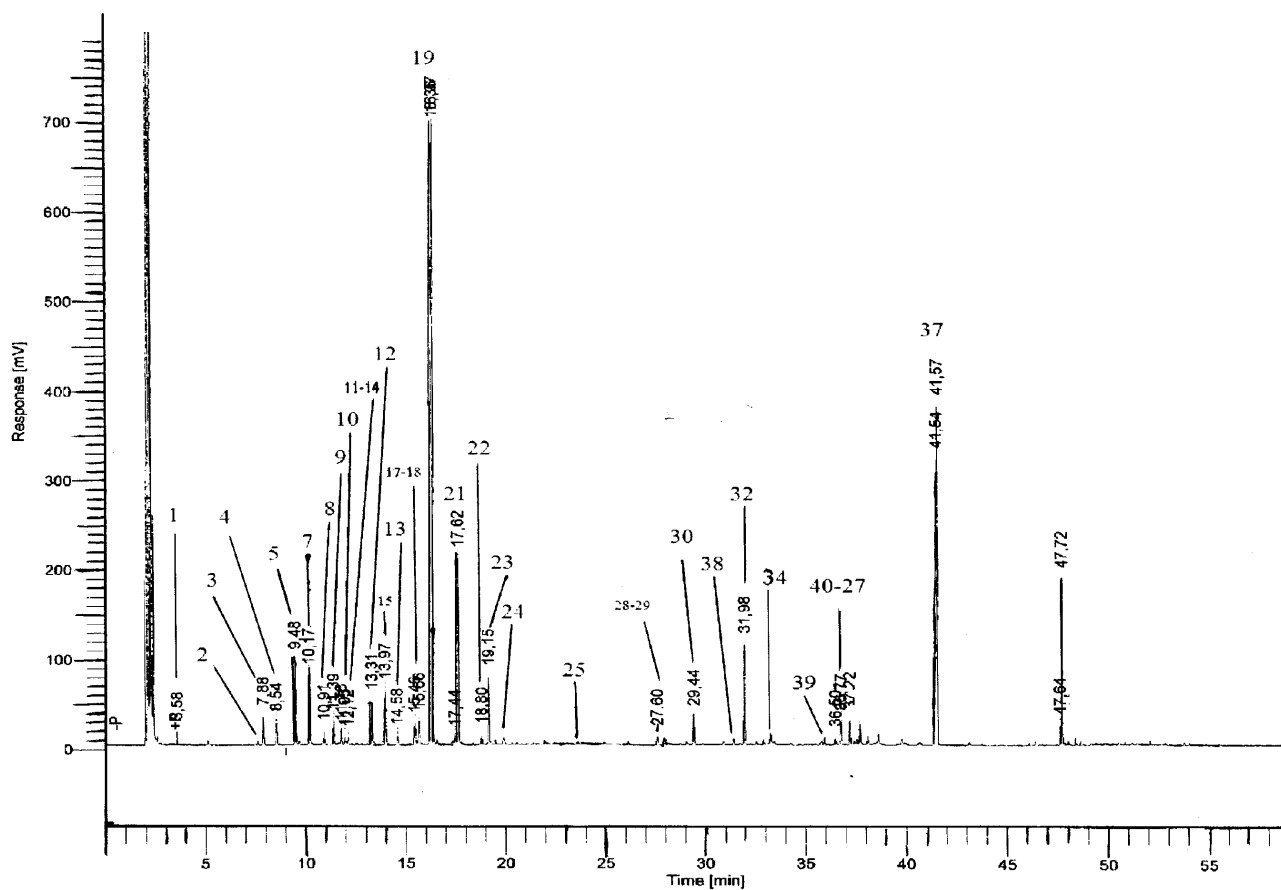
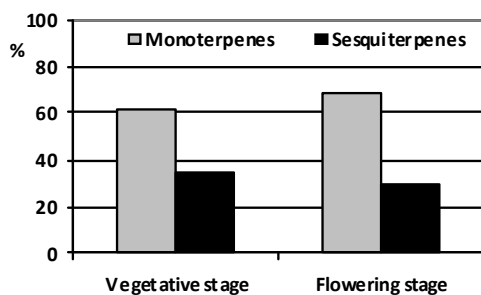


Figure 2 - Effect of phenological stage on the relative composition of total sesquiterpene and monoterpene compounds in *A. arborescens* essential oils.



Captions of figures and tables

Table I - Chemical composition of essential oils from five populations of *A. arborescens* growing in Sicily.

Table II - Effect of phenological stage on the chemical composition of *A. arborescens* essential oils.

Figure 1 - GC-FID chromatogram relative to an *Artemisia arborescens* essential oil (loc. Petru). The peak numbers correspond to the numbers of compounds listed in Table I.

Figure 2 - Effect of phenological stage on the relative composition of total sesquiterpene and monoterpene compounds in *A. arborescens* essential oils.

Chemical Composition and Antibacterial Potential of *Artemisia arborescens* L. Essential Oil

M. Militello · L. Settanni · A. Aleo ·
C. Mammina · G. Moschetti · G. M. Giammanco ·
M. Amparo Blázquez · A. Carrubba

Received: 3 November 2010 / Accepted: 17 December 2010
© Springer Science+Business Media, LLC 2010

Abstract This study was undertaken to characterize the essential oil (EO) of *Artemisia arborescens* growing wild in Sicily. EO, extracted by steam distillation, was examined for its chemical composition and for its capability to inhibit some food-borne pathogen bacteria. A total of 43 compounds (13 monoterpene hydrocarbons, 14 oxygenated monoterpenes, 10 sesquiterpene hydrocarbons, three oxygenated sesquiterpenes and less amount of other three compounds), which account 93.73% of the total oil, were identified by gas chromatography and gas chromatography–mass spectrometry. Oxygenated monoterpenes (57.32%) constituted the main fraction, with β -thujone as the main compound (45.04%), followed by the sesquiterpene hydrocarbon chamazulene (22.71%). Undiluted EO showed a large inhibition spectrum against strains of *Listeria monocytogenes* (34 out of 44), whilst it was ineffective against enterobacteria and salmonellas. The minimum inhibition concentration (MIC) was evaluated for the two

most sensitive strains (*L. monocytogenes* 186 and 7BO) at two cellular concentrations (10^6 and 10^7 CFU ml⁻¹). The lowest MIC (0.625 μ l ml⁻¹, dilution of oil with acetone) was found for strain *L. monocytogenes* 186 at 10^6 CFU ml⁻¹.

Introduction

In recent years, consumers have become particularly aware of the health concerns regarding food additives. “Natural” and “traditional” foods, processed without any added chemical preservative, are becoming more and more attractive [42]. When chemical preservatives are used, the low levels used to avoid health implications expose the food-makers to a risk of poor stability and microbial contamination of the final products, since several microorganisms (pathogens and spoilage agents) may acquire a resistance [47]. In particular, the emergence of pathogens, which are resistant to classical preservatives, has determined an urgent necessity for alternative antimicrobial agents.

Several compounds found in plants, which have long been used as natural agents for food preservation [38], are generally well accepted. Amongst these naturally occurring compounds, essential oils (EOs) and extracts of various species of edible and medicinal plants, herbs and spices are considered by the food industry because of their antimicrobial potential. The aptitude of EOs to inhibit the growth of certain microorganisms is of paramount importance, particularly, when it is expressed against food-borne pathogens. Several microorganisms, especially bacteria, are responsible for food-associated diseases. One of the major microbial threats to the food safety in the past two decades is represented by the Gram-positive

M. Militello · A. Carrubba
Dipartimento di Agronomia Ambientale e Territoriale (DAAT),
Facoltà di Agraria, Università di Palermo, Viale delle Scienze,
90128 Palermo, Italy

L. Settanni (✉) · G. Moschetti
SENFIMIZO Department, Section of Phytopathology and
Agricultural Microbiology, University of Palermo, Viale delle
Scienze 4, 90128 Palermo, Italy
e-mail: luca.settanni@unipa.it

A. Aleo · C. Mammina · G. M. Giammanco
Department of Health Promotion Sciences, “G. D’Alessandro”
University of Palermo, Palermo, Italy

M. A. Blázquez
Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia,
Universitat de València, Avda Vicent Andrés Estellés s/n
Burjassot, 46100 Valencia, Spain

Listeria monocytogenes, which has been recognized as an emerging agent of food-borne diseases [17]. Listeriosis has a very low incidence, but with a high case fatality rate that can exceed 30% [13]. Recently, several European countries are experiencing an apparently increasing incidence of listeriosis, mainly amongst persons aged 65 years and older [20].

Many spices have been consumed daily by mankind for millennia; they are added to the food matrices mainly to improve their taste and flavour; thus, the consumers are quite used to their presence. For these reasons, EOs from spices represent the natural additives easy to employ in the common applications of food preservation. However, the discovery of new active natural components may generate innovative food preservation strategies. Many examples may be found for plant-derived substances useful as food additives, with a broad spectrum of aptitudes including antioxidant [7, 21] and antimicrobial activities [5, 27]. Those characteristics are due to a number of secondary metabolites that may be found in various parts of the plants, and a strong interest is currently addressed to their individuation and exploitation [8]. So far, the approach applied to the study of herbal ingredients has been generally addressed to the identification of specific molecules (or group of molecules), inside the plant or its utilized part, which are directly responsible of a given (antioxidant, antimicrobial, etc.) action, the so-termed “active principles”. As a matter of fact, the biological effect traditionally attributed to a plant-derived material, including EOs, is often due to the occurrence of synergistic and/or antagonistic effects amongst its various components. For food applications, the effectiveness of a specific EO as natural antimicrobial additive is studied considering the EO itself as a whole ingredient, rather than a mixture of components.

Artemisia arborescens (Vaill.) L. is a perennial evergreen woody shrub belonging to the family Asteraceae. The genus *Artemisia* comprises more than 200 species, and some of them (*A. absinthium*, *A. herba-alba*, *A. annua* and *A. vulgaris*), which are traditionally used in many areas as medicines, seasoning items or basic ingredients for the manufacturing of liqueurs, have been targeted to many studies concerning their phytochemical features [31]. Many *Artemisia* species may be found in dry areas of the Northern hemisphere [28]; about 20 species have been detected in Italy, and only five of them grow wild in Sicily [40]. Amongst these, *A. arborescens* is a strongly smelling, morphologically variable species (or mixture of species), up to 150 cm height, erect, many-branched, tomentose and whitish, silvery and glabrous in the youngest parts, bearing at flowering time (June–July) many small yellow flowers. Some authors [39] reported that *A. arborescens* was spread by Moorish invaders and Templar Knights at the time of

Crusades. At present, the species is largely diffused in the Mediterranean area (Italy and North-Africa) and also in the Pacific North America areas.

The scientific interest towards *A. arborescens* goes back to the past decade. The studies carried out on this species were mainly concerned about its phytochemical characteristics [1, 29, 30, 32, 33, 39], but other aspects have been also considered, such as its genomics [19], its antiviral [43], antioxidant [11], anti-mycoplasmal [3] and allelochemical properties [14]. However, to our knowledge, no studies have been carried out on the antibacterial properties of EOs of this species.

This study is part of a project aimed at characterizing the EO of *A. arborescens* growing wild in Sicily. Based on the above considerations, the objectives of this study were to determine the chemical composition of EO and to evaluate its potential against common food-borne pathogens.

Materials and Methods

Plant Material and EO Preparation

Aerial parts of *A. arborescens* L., at the vegetative stage, were collected, in January 2010, from morphologically homogeneous wild populations grown in the North-western area of Sicily (Italy). The fresh plant material was subjected to steam distillation (Estrattore Albrigi Luigi-Verona, Italy) for 3 h to achieve EO.

Gas Chromatography and Mass Spectrometry

EO was first subjected to capillary gas liquid chromatography (GC) analysis using a Clarus 500GC Perkin-Elmer apparatus equipped with a flame ionization detector (FID), a Hewlett-Packard HP-1 (cross-linked methyl silicone) capillary column (30 m long, 0.2 mm i.d. with 0.33 mm film thickness). The column temperature program was 60°C for 5 min, with 3°C increases per min up to 180°C, then 20°C increases per min up to 280°C, which was maintained for 10 min. The carrier gas was helium at a flow rate of 1 ml min⁻¹. The FID and injector port temperature were maintained at 250 and 220°C, respectively.

EO was also analysed by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) in a Varian Saturn 2000 equipped with a Varian C.S VA-5MS capillary column (30 m long, 0.25 mm i.d. with 0.25 mm film thickness). The same working conditions used for GC and split mode injection (ratio 1:25) were employed. Mass spectra were taken over the *m/z* 28–400 range with an ionizing voltage of 70 eV. Kovats retention index (KI) was calculated using co-chromatographed standard hydrocarbons. The individual compounds were identified by MS, and their identity

was confirmed by comparison of their KIs, relative to C₈–C₃₂ *n*-alkanes, and by comparing their mass spectra and retention times with those of pure substances or with data available in the NIST 98 library and in the literature [2].

Microbial Strains

The bacterial strains used as indicators (sensitive to EO) for the inhibition assays belong to the culture collection of the Department of Health Promotion Sciences “G. D’Alessandro” (Palermo, Italy) and represent some species generally associated with food-borne diseases. *L. monocytogenes*, *Enterobacter* spp. and *Salmonella enterica* strains were subcultured in Brain Heart Infusion (BHI) agar (Oxoid) and incubated overnight at 37°C.

Antibacterial Activity Screening

EO of *A. arborescens* was tested for antibacterial activity applying the paper disc diffusion method [26] with a few modifications. An agar base medium consisting of nutrient agar was overlaid with 7 ml of BHI soft agar (0.7% w/v), previously inoculated with approximately 10⁷ CFU ml⁻¹ of a given strain to be tested for sensitivity versus EO. Four sterile filter paper discs (Whatman No. 1) of 6 mm diameter were placed onto the surface of the double agar layer, at a distance of approximately 3 cm from one another. Two discs were used as control and soaked with 10 µl of sterile water (negative control), or streptomycin [(10% w/v), positive control], whilst the remaining two discs were both soaked with 10 µl of EO. Plates were incubated at 37°C for 24 h and the inhibitory activity was evaluated as positive if a definite clear area was detected around the paper disc.

Determination of Minimum Inhibitory Concentration

The antibacterial activity of EO was measured as minimum inhibitory concentration (MIC), which represents the most common expression of EO antibacterial performances [5]. MIC is defined as the lowest concentration of an active compound inhibiting visible growth of test organisms [25]. In brief, a given EO is serially diluted (dilution factor = 2) using an organic solvent and all dilutions are tested against the sensitive strains.

The strains showing the highest sensitivity to the screening assay were used for MIC calculation. The EO was diluted in acetone, added to BHI broth medium and tested employing the sensitive strains at two different final cell concentrations (10⁷ and 10⁶ CFU ml⁻¹), in order to evaluate the effect of the number of cells on the sensitivity of the species. Acetone alone was used as negative control.

Results

Chemical Characterization of EO

Steam distillation produced a dark blue EO with a yield of 0.33% (v/w). This preparation was analysed by GC and GC–MS in order to determine its chemical composition. The qualitative and quantitative composition determined by GC and GC–MS is given in Table 1, where the compounds are classified by phytochemical groups and listed in order of their elution on a methyl silicone HP-1 column. Forty-three compounds were identified, accounting for the 93.37% of total oil. The essential oil was dominated by the monoterpene fraction with 13 monoterpene hydrocarbons (8.32%) and 14 oxygenated monoterpenes (57.32%) identified. Amongst the monoterpene hydrocarbons only sabinene (2.33%), myrcene (2.03%) and γ-terpinene (1.29%) ranged percentages higher than 1%. In the oxygen-containing monoterpenes, β-thujone (45.04%) followed by camphor (6.78%) and terpinen-4-ol (2.16%) were the main compounds.

On the other hand, in the sesquiterpene fraction (27.13%), large amount of the sesquiterpene hydrocarbon, chamazulene (22.71%), and trace amount of three oxygenated sesquiterpenes (dehydro-sesquicineole, germacrene-D-4-ol and caryophyllene oxide) were found.

Inhibition of Bacterial Growth

The antibacterial activity of *A. arborescens* EO is shown in Table 2. The spectrum of inhibition was evaluated against enterobacteria, *Listeria monocytogenes* and salmonellas. The active extract was effective only against listerias: 34 out of 44 strains were inhibited in growth. The strains belonging to this species showed a different level of sensitivity to the treatment. *L. monocytogenes* ATCC 19114^T resulted positive to the test, but its inhibition was low; the width of the clear area was barely 8 mm, including diameter of paper disc (6 mm). The strains showing the most interesting results were *L. monocytogenes* 186 and 7BO, for which a clear zone of 12 mm diameter was detected. For the majority of sensitive strains, an average inhibition diameter of 10 mm was registered. Due to the strongest inhibition determined by EO against *L. monocytogenes* 186 and 7BO, these two strains were further characterized for their sensitivity in terms of MIC. *E. cloacae* 13A was also used as negative control since it was not inhibited by EO.

L. monocytogenes 186 was found to be the most sensitive strain at both concentrations tested. EO showed an MIC of 2.5 and 1.25 µl ml⁻¹ against strain *L. monocytogenes* 7BO at 10⁷ and 10⁶ CFU ml⁻¹, respectively, whilst the MIC was calculated to be 1.25 and 0.625 µl ml⁻¹

Table 1 Chemical composition of EO of *A. arborescens* (Vail.) L. genotype growing wild in Sicily

Chemical compounds	KI ^a	% ^b
Monoterpene hydrocarbons		8.32
<i>cis</i> -Salvene	856	t
α -Thujene	930	t
α -Pinene	939	0.70
Camphene	954	0.61
Sabinene	975	2.33
β -Pinene	979	t
Myrcene	990	2.03
α -Phellandrene	1002	0.34
α -Terpinene	1014	0.69
<i>p</i> -Cymene	1024	0.33
Limonene	1029	t
γ -Terpinene	1054	1.29
Terpinolene	1088	t
Oxygenated monoterpenes		57.32
1,8-Cineole	1031	t
<i>cis</i> -Sabinene hydrate	1070	1.65
linalol	1096	0.22
<i>trans</i> -Sabinene hydrate	1098	t
α -Thujone	1102	0.75
β -Thujone	1114	45.04
Menth-2-en-1-ol	1121	t
Camphor	1146	6.78
Borneol	1169	t
Terpinen-4-ol	1177	2.16
α -Terpineol	1188	t
Carvacrol	1299	t
Neryl isovalerate	1583	t
Geranyl isovalerate	1607	0.72
Sesquiterpene hydrocarbons		27.13
α -Copaene	1376	0.19
β -Bourbonene	1388	t
β -Caryophyllene	1419	0.89
α -Humulene	1454	t
Germacrene-D	1484	3.34
Bicyclogermacrene	1500	t
α -Farsene	1505	t
Calacorene	1516	t
δ -Cadinene	1523	t
Chamazulene	1731	22.71
Oxygenated sesquiterpenes		t
Dehydro-sesquiceneole-	1471	t
Germacrene- D-4-ol	1575	t
Caryophyllene oxide	1583	t
Others		0.96
6-Methyl-5-hepten-2-one	985	t
Methyl-butyl-2-methyl hydrate	1100	0.96
Methyl eugenol	1403	t

Table 1 continued

Chemical compounds	KI ^a	% ^b
Total		94.87

^a KI Kovats retention index relative to C₈–C₃₂ *n*-alkanes

^b Percentage of each compound on the total oil (computed from the total GC peak area)

against strain *L. monocytogenes* 186 at 10⁷ and 10⁶ CFU ml⁻¹, respectively.

Discussion

Plant-derived EOs enjoy a “natural” status and, for this reason, are generally recognized as safe by consumers, which accept well their use for food preservation purposes. Due to their antimicrobial potential, EOs are considered with attention by the food scientists. Furthermore, also the interest of the food industries is on the increase, thanks to the consumer demand for effective natural products. However, it became evident that EOs cannot be employed inappropriately, because of their adverse consequences for humans, e.g. some EOs are characterized by cancer-causing effects [34]. Hence, the evaluation of their safety constitutes an important point for the future application of EOs. Studies on human voluntaries and sensory evaluation by panels of experts are needed in order to test the safety of the plant-derived molecules and their acceptability by consumers. These operations are time-consuming and difficult to realize; thus, before any other evaluation, it is fundamental to test the efficacy of the new natural compounds with supposed antibacterial properties at least against the major food pathogens.

A. arborescens is widespread in Sicily, where it grows spontaneously. The chemical analysis of EO of plants collected within Palermo province (North-western Sicily) revealed that this species elaborated an essential oil rich in β -thujone (45.04%) and chamazulene (22.71%). The main compound, thujone, is an oxygenated monoterpene commonly found in spice and medicinal plants such as sage (*Salvia officinalis* L.), clary sage (*Salvia sclarea* L.), wormwood (*Artemisia absinthium* L.) and tansy (*Tanacetum vulgare* L.). Thujone is present in some alcoholic beverages, but the isomer β -thujone is claimed to be toxic for human consumption [16, 35]. Thus, the use of thujone undergoes several restrictions, although the average intake by consumers is about 100 times lower than the NOEL (no-observed-effect level) derived from a 14-week study in rats [16]. Chamazulene, the second most abundant compound in *A. arborescens* EO, is a sesquiterpene hydrocarbon, characteristic of several plants of Asteraceae family, such

Table 2 Inhibitory activity of *A. arborescens* EO

Bacterial species	Strain (inhibition)	Source of isolation
<i>E. amnigenus</i>	DHPS70B3(-)	Freeze-dried chicken
<i>E. amnigenus</i>	DHPS60A2(-)	Freeze-dried lamb
<i>E. cloacae</i>	DHPS24(-), DHPS25(-)	Milk powder
<i>E. cloacae</i>	DHPS13A(-)	Multi-cereal cream
<i>E. cloacae</i>	DHPS62A(-)	Freeze-dried chicken
<i>E. cloacae</i>	DHPS 32A(-)	Milk flour
<i>E. cloacae</i>	DHPS43B1(-)	Semolina
<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i>	DHPS1(-), DHPS2(-), DHPS6(-), DHPS7(-), DHPS8(-), DHPS11(-), DHPS13 (-), DHPS15(-), DHPS19(-), DHPS31(-)	Milk powder
<i>E. sakazaki</i>	DHPS2B(-)	Rice cream
<i>E. sakazaki</i>	DHPS23A(-)	Green rice cream
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 19114 ^T (+)	Animal tissue
<i>L. monocytogenes</i>	DHPS129(+), DHPS130(+), DHPS131(+), DHPS132(-), DHPS133(-), DHPS134(-), DHPS135 (+), DHPS136(+), DHPS137(+), DHPS138(+), DHPS139(+), DHPS140(+)	Human
<i>L. monocytogenes</i>	DHPS179(+)	Salmon
<i>L. monocytogenes</i>	DHPS180(+), DHPS182(+)	Ricotta cheese
<i>L. monocytogenes</i>	DHPS184(-)	Rice salad
<i>L. monocytogenes</i>	DHPS185(-)	Beef
<i>L. monocytogenes</i>	DHPS186(++)	Mozzarella salad
<i>L. monocytogenes</i>	DHPS187(+)	Roasted chicken
<i>L. monocytogenes</i>	DHPS188(+)	Green salad
<i>L. monocytogenes</i>	DHPS1BO (+), DHPS10BO(+)	Chopped meat
<i>L. monocytogenes</i>	DHPS2BO(+), DHPS 3BO(+)	Fresh salami
<i>L. monocytogenes</i>	DHPS4BO(+), DHPS5BO (+)	3-week ripened salami
<i>L. monocytogenes</i>	DHPS6BO(+), DHPS7BO(++), DHPS8BO(-)	4-week ripened salami
<i>L. monocytogenes</i>	DHPS11BO(+)	Meat factory surfaces
<i>L. monocytogenes</i>	DHPS12BO(+)	1-week ripened salami
<i>L. monocytogenes</i>	DHPS13BO(+), DHPS14BO(-), DHPS15BO(-), DHPS16BO(-), DHPS7BO(+), DHPS18BO(+), DHPS19BO(+), DHPS20BO(+), DHPS21BO(-)	Gorgonzola cheese
<i>L. monocytogenes</i>	DHPS22BO(+), DHPS23BO(+), DHPS24BO(+)	Taleggio cheese
<i>Salmonella</i> Abony	DHPS50398(-)	Human
<i>Salmonella</i> Agona	DHPS50361(-)	Human
<i>Salmonella</i> Blockley	DHPS50314(-)	Human
<i>Salmonella</i> Bredeney	DHPS50374(-)	Human
<i>Salmonella</i> Derby	DHPS50399(-)	Human
<i>Salmonella</i> Enteritidis	DHPS50339(-), DHPS50430(-), DHPS50371(-)	Human
<i>Salmonella</i> Hadar	DHPS50272(-)	Human
<i>Salmonella</i> Infantis	DHPS50356(-)	Human
<i>Salmonella</i> Muenchen	DHPS50393(-)	Human
<i>Salmonella</i> Napoli	DHPS50376(-)	Human
<i>Salmonella</i> Newport	DHPS50404(-)	Human
<i>Salmonella</i> Panama	DHPS50347(-)	Human
<i>Salmonella</i> Saintpaul	DHPS50415(-)	Human
<i>Salmonella</i> Thompson	DHPS50280(-)	Human
<i>Salmonella</i> Typhimurium	DHPS50414(-), DHPS 50384(-)	Human
<i>Salmonella</i> Typhimurium	DHPS50432(-)	Seafood
<i>Salmonella</i> Veneziana	DHPS50391(-)	Human

-, no inhibition; +, clear inhibition (8–10 mm diameter); ++, strong inhibition (>10 mm diameter)

The culture collections are as follows: *DHPS* Department of Health Promotion Sciences “G. D’Alessandro” (Palermo, Italy); *ATCC* American Type Culture Collection (Manassa, VA, USA)

as chamomile and achillea. Indeed, it is an artefact molecule obtained from the precursore prochamazulene contained in plants' tissues [18, 46] during steam distillation. Chamazulene possesses interesting anti-inflammatory properties [41], and for this reason it has a relevant industrial importance. Our results showed that EO of *A. arborescens* growing wild within Palermo province is characterized by high concentrations of both compounds.

So far, *A. arborescens* plants examined for these characters have been divided into two chemotypes, high producers of thujone or high producers of chamazulene. It was also supposed that the biochemical process for the generation of thujone is in competition with that for the production of chamazulene [39]. Thus, this aspect deserves a deeper investigation. However, previous studies carried out on the chemical characterization of *A. arborescens* EO reported a different number of compounds identified, from 21 to 82 [1, 32]. Although chamazulene followed by camphor dominated the EO of plants collected in different areas of South Italy [32], the main compounds recognized from this species collected in the Algerian maritime littoral were the same (chamazulene and β -thujone), with similar high concentrations, found in our study. Thus, a third *A. arborescens* chemotype, dealing with high concentration of both β -thujone and chamazulene, might be proposed, even though other studies are needed to support this hypothesis. It is well known that geographical origin, environmental factors and the stage of plant development, as well as day and night duration, can affect the qualitative/quantitative composition of the oils [24, 36]. Moreover, the results of our study, compared with those previously published by Lo Presti et al. [32], which included also plants collected in Sicily, highlight the observations that different chemotypes may cohabit in restricted geographical areas.

In view of the possible future food application of *A. arborescens* EO, as natural alternative to traditional chemical additives, the antimicrobial activity of this mixture of chemical compounds has been evaluated. The inhibitory spectrum was evaluated against bacterial species (Enterobacteria, *L. monocytogenes* and salmonellas) responsible for human outbreaks commonly associated with food matrices [9, 22, 44]. All Gram-negative species (*Salmonella* spp. and *Enterobacter* spp.) used as test organisms were insensitive to the EO assayed. However, interestingly enough inhibition was observed with several strains of the food-borne pathogen *L. monocytogenes*, the only Gram-positive species used in this study. Also in other studies Gram-positive bacteria were found to be more susceptible to EO and various solvent extracts than Gram-negative bacteria [4, 6, 10]. This effect is related to the presence of an outer membrane on Gram-negative bacteria, which provides a strong impermeable barrier [37].

L. monocytogenes is often reported to be susceptible to EOs [12].

The highest inhibition was obtained with strains *L. monocytogenes* 186 and 7BO, both of food origin (mozzarella salad and ripened salami, respectively). This species has a ubiquitous nature and it is characterized by hardiness. Unlike many pathogens, *L. monocytogenes* survives to the food-processing technologies that rely on acidic or salty conditions [23], and shows a strong ability to multiply, although slowly, at low temperatures; thus, it may be found even in properly refrigerated foods. For all these reasons, this bacterium constitutes a relevant risk for consumers' health and its control by means of natural strategies is desirable. Several components of *A. arborescens* EO, including caryophyllene, caryophyllene oxide, α -humulene and germacrene-D, have been reported as important components of various EOs with enormous potential to inhibit microbial pathogens [15, 45, 48].

The above strains *L. monocytogenes* 186 and 7BO were further characterized for their sensitivity in terms of MIC. The test was carried out at two cell concentrations to determine the effect of the inoculums on the sensitivity level. The results showed that *A. arborescens* EO tested was active against high concentrations (10^7 CFU ml⁻¹) of *L. monocytogenes* 186, although its effect diminished with the increment of cell number.

In conclusion, the results showed by our study indicate that EO of *A. arborescens* is effective against *L. monocytogenes*, one of the major agents of food-borne illnesses; thus, it might represent a natural preservative, alternative to the common chemical additives. Works are being prepared in order to better characterize the in situ efficacy of this EO using food matrices, its suitability in active packaging strategies, and to evaluate its organoleptic acceptability by consumers, as well as its safety.

References

1. Abderrahim A, Belhamel K, Chalchat J-C, Figuéredo G (2010) Chemical composition of the essential oil from *Artemisia arborescens* L. growing wild in Algeria. *Records Nat Prod* 4:87–90
2. Adams RP (2007) Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Allured Publishing Corporation, Carol Stream
3. Al-Momani W, Abu-Basha E, Janakat S, Nicholas RAJ, Ayling RD (2007) In vitro antimycoplasmal activity of six Jordanian medicinal plants against three Mycoplasma species. *Trop Anim Health Prod* 39:515–519
4. Al-Reza SM, Rahman A, Lee J, Kang SC (2010) Potential roles of essential oil and organic extracts of *Zizyphus jujuba* in inhibiting food-borne pathogens. *Food Chem* 119:981–986
5. Burt S (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential application in foods—a review. *Int J Food Microbiol* 94:223–253

6. Calsamiglia S, Busquet M, Cardozo PW, Castillejos L, Ferret A (2007) Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *J Dairy Sci* 90:2580–2595
7. Carrubba A, Calabrese I (1998) Antioxidant compounds in some herbaceous aromatic plants. *Acta Hort* 457:85–93
8. Carrubba A, Catalano C (2009) Essential oil crops for sustainable agriculture—a review. In: Lichtfouse E (ed) *Climate change, intercropping, pest control and beneficial microorganisms*. Springer Science + Business Media, Dijon, pp 137–188
9. Crum-Cianflone NF (2008) Salmonellosis and the gastrointestinal tract: more than just peanut butter. *Curr Gastroenterol Rep* 10: 424–431
10. Davidson PM, Naidu AS (2000) Phyto-phenols. In: Naidu AS (ed) *Natural food antimicrobial systems*. CRC Press, Boca Raton, pp 265–293
11. Dessi MA, Deiana M, Rosa A, Piredda M, Cottiglia F, Bonsignore L, Deidda D, Pompei R, Corongiu FP (2001) Antioxidant activity of extracts from plants growing in Sardinia. *Phytother Res* 15:511–518
12. Di Pasqua R, De Feo V, Villani F, Mauriello G (2005) In vitro antimicrobial activity of essential oils from Mediterranean Apiaceae, Verbenaceae and Lamiaceae against foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Ann Microbiol* 55:139–143
13. Drevets DA, Bronze MS (2008) *Listeria monocytogenes*: epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. *FEMS Immunol Med Microbiol* 53:151–165
14. Dudain N, Poljakoff-Mayber A, Mayer AM, Putievsky E, Lerner HR (1999) Essential oils as allelochemicals and their potential use as bioherbicides. *J Chem Ecol* 25:1079–1089
15. El-Sakhawy FS, El-Tantawy ME, Ross SA, El-Sohly MA (1998) Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Murraya exotica* L. *Flav Fragr J* 13:59–62
16. European Commission (2003) Opinion of the scientific committee on food on Thujone. Expressed on 2nd Dec 2002. European Commission—Health and Consumer Protection Directorate-General, Scientific Committee on Food—SCF/CS/FLAV/FLAVOUR/23 ADD2 Final, 6 February 2003
17. Farber JM (2000) Present situation in Canada regarding *Listeria monocytogenes* and ready-to-eat seafood products. *Int J Food Microbiol* 62:247–251
18. Franz C, Novak J (2010) Sources of essential oils. In: Baser KHC, Buchbauer G (eds) *Handbook of essential oils: science technology and applications*. CRC Press, Boca Raton, pp 39–81
19. Garcia S, Gamatje T, Twibell JD, Vallès J (2006) Genome size variation in the *Artemisia arborescens* complex (Asteraceae, Anthemideae) and its cultivars. *Genome* 49:244–253
20. Goulet V, Hedberg C, Le Monnier A, de Valk H (2008) Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. *Emerg Infect Dis* 14:734–740
21. Haraguchi H (2001) Antioxidative plant constituents. In: Tringali C (ed) *Bioactive compounds from natural sources isolation characterisation and biological properties*. Taylor & Francis, London, pp 337–377
22. Healy B, Cooney S, O'Brien S, Iversen C, Whyte P, Nally J, Callanan JJ, Fanning S (2010) *Cronobacter (Enterobacter sakazakii)*: an opportunistic food-borne pathogen. *Foodborne Pathog Dis* 7:339–350
23. Jacobson L (2008) Listeriosis. *Pediatr Rev* 29:410–411
24. Jerkovich I, Mastelic M, Milos M, Juteau F, Masotti V, Viano J (2003) Chemical variability of *Artemisia vulgaris* L. essential oils originated from the Mediterranean area of France and Croatia. *Flav Fragr J* 18:436–440
25. Karapinar M, Aktug SE (1987) Inhibition of foodborne pathogens by thymol, eugenol, menthol and anethole. *Int J Food Microbiol* 4:161–166
26. Kelmanson JE, Jager AK, Van Staden J (2000) Zulu medicinal plants with antibacterial activity. *J Ethnopharmacol* 69:241–246
27. Khan R, Islam B, Akram M, Shakil S, Ahmad A, Ali SM, Siddiqui M, Khan AU (2009) Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MDR) strains of bacteria and fungus of clinical origin. *Molecules* 14:586–597
28. Kordali S, Cakir A, Mavi A, Kilic H, Yildirim A (2005) Screening of chemical composition and antifungal and antioxidant activities of the essential oils from three Turkish *Artemisia* Species. *J Agric Food Chem* 53:1408–1416
29. Lai F, Wissing SA, Müller RH, Fadda AM (2006) *Artemisia arborescens* L essential oil-loaded solid lipid nanoparticles for potential agricultural application: preparation and characterization. *AAPS PharmSciTech*, 7 (1) Article 2 <http://www.aapspharm.scitech.org>
30. Lai F, Loy G, Manconi M, Manca ML, Fadda AM (2007) *Artemisia arborescens* L essential oil loaded beads: preparation and characterization. *AAPS PharmSciTech*, 8 (3) Article 67 <http://www.aapspharmscitech.org>
31. Lopes-Lutz D, Alviano DS, Alviano CS, Kolodziejczyk PP (2008) Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry* 69:1732–1738
32. Lo Presti M, Crupi ML, Zellner B, Dugo G, Mondello L, Dugo P, Mondello L, Dugo P, Ragusa S (2007) Characterization of *Artemisia arborescens* L. (Asteraceae) leaf-derived essential oil from Southern Italy. *J Essent Oil Res* 19:218–224
33. Marongiu B, Piras A, Porcedda S (2010) Comparative analysis of the oil and supercritical CO₂ extract of *Artemisia arborescens* L. and *Helichrysum splendendum* (Thunb.) Less. *Nat Prod Res* 20: 421–428
34. McGuffin M, Hobbs C, Upton R, Goldberg A (1997) *American herbal products association's botanical safety handbook*. CRC Press, Boca Raton
35. National Toxicology Program (2010) Testing status of agents at NTP (US National Toxicology Program—Department of Health and Human Services) Alpha-Thujone; alpha/beta-Thujone mixture. US. <http://ntp.niehs.nih.gov/go/TSM980059>; <http://ntp.niehs.nih.gov/go/TSM990011>. Last accessed 16 July 2010
36. Nguyen TPT, Nguyen TT, Tran MH, Tran HT (2004) *Artemisia vulgaris* L. from Vietnam: chemical variability and composition of the oil along the vegetative life of the plant. *J Essent Oil Res* 16:358–361
37. Nikaido H (1994) Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* 264:382–388
38. Nychas GJE, Tassou CC, Skandamis P (2003) Antimicrobials from herbs and spices. In: Roller SM (ed) *Natural antimicrobials for the minimal processing of foods*. Woodhead Publishers, CRC Press, New York, pp 176–200
39. Pappas R, Sheppard-Hanger S (2000) *Artemisia arborescens*—essential oil of the Pacific Northwest: a high-chamazulene, low-thujone essential oil with potential skin-care applications. <http://atlanticinstitute.com/artemisia.pdf>
40. Pignatti S (1982) *Flora d'Italia*. Edagricole, Bologna
41. Salamon I (2009) Chamomile biodiversity of the essential oil. Qualitative–quantitative characteristics. In: Sener B (ed) *Innovations in chemical biology*. Springer Science + Business Media, Dordrecht, pp 83–90
42. Settanni L, Corsetti A (2008) Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *Int J Food Microbiol* 121: 123–138
43. Sinico C, De Logu A, Lai F, Valenti D, Manconi M, Loy G, Bonsignore L, Fadda AM (2005) Liposomal incorporation of *Artemisia arborescens* L. essential oil and in vitro antiviral activity. *Eur J Pharm Biopharm* 59:161–168

44. Swaminathan B, Gerner-Smidt P (2007) The epidemiology of human listeriosis. *Microb Infect* 9:1236–1243
45. Tewtrakul S, Yuenyongsawad S, Kummee S, Atsawajaruwan L (2005) Chemical components and biological activities of volatile oil of *Kaempferia galanga* Linn. *Songklanakarin J Sci Technol* 27:503–507
46. Wagner C, Friedt W, Marquard RA, Ordon F (2005) Molecular analyses on the genetic diversity and inheritance of (–)- α -bisabolol and chamazulene content in tetraploid chamomile (*Chamomilla recutita* (L.) Rausch.). *Plant Sci* 169:917–927
47. Xu HX, Lee SF (2001) Activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant bacteria. *Phytother Res* 15:39–43
48. Yuenyongsawad S, Tewtrakul S (2005) Essential oil components and biological activities of *Coleus parvifolius* leale. *Songklanakarin J Sci Technol* 27:497–502

Vegetative propagation of *Artemisia arborescens* L. by stem-cutting

Marcello Militello¹, Giancarlo Fascella^{2}, Alessandra Carrubba¹*

¹D/SAGA (Dipartimento dei Sistemi Agro-Ambientali), University of Palermo, 90128 Palermo, Italy.

²Agricultural Research Council, Research Unit for Mediterranean Flower Species, 90011 Bagheria (Palermo), Italy.

(*)Corresponding author: tel. +39091909090; fax: +39091909089; e-mail: fascella@libero.it
(G. Fascella)

Number of pages: 19

Number of figures: 5

Short title: *In vivo* propagation of *Artemisia arborescens* L.

Main topic: Plant Production

1 **ABSTRACT**

2 *Artemisia arborescens* L. has gained a strong importance worldwide due to its many industrial
3 uses. Some problems arise, however, as concerns the availability of plant material having
4 good quality features; hence, it becomes attractive the pointing out of fast and effective
5 methods for its vegetative propagation. An experiment was conducted to assess the effects of
6 different rooting media (mixtures of sphagnum peat and perlite in ratios of 70:30; 50:50 and
7 30:70 v/v), addition of exogenous auxin (NAA), and harvest period on rooting success of
8 stem cuttings of *A. arborescens* L. Softwood cuttings, collected from wild plants in February,
9 April and November 2010, were placed in a covered bench equipped with a mist nebulization
10 system under natural photoperiod. Cuttings mortality, rooting rate of cuttings, number of
11 roots/cutting and root length were evaluated 40 days after the starting of the experiment. The
12 percentage of rooted cuttings was significantly influenced by the harvest period as cuttings
13 collected in February showed the highest rooting rate, whereas the growing media and the
14 addition of auxin did not show any significant effect on rooting capacity. The best results, in
15 terms of roots number and length, were achieved using a 50:50 sphagnum:perlite mixture,
16 without exogenous hormones.

17

18 **Additional key words:** Silver Wormwood, Tree Wormwood, vegetative propagation, rooting
19 substrates, naphthalene acetic acid, harvest period.

20

21 **Abbreviations used:** ANOVA (Analysis of Variance); D (dead cuttings); IBA (Indole-3-
22 Butyric Acid); NAA (Naphthalene Acetic Acid); NR (alive cuttings but not rooted); R (rooted
23 cuttings; v/v (volume/volume)

24

25

1 **Multiplicación vegetativa de *Artemisia arborescens* L. por esquejes de tallo**

2

3 **RESUMEN**

4 *Artemisia arborescens* L. tiene gran importancia en todo el mundo por sus diversos usos
5 industriales. Sin embargo, es complicado disponer de material vegetal con características de
6 calidad, por lo que es necesario desarrollar métodos rápidos y eficaces para su multiplicación
7 vegetativa. Se realizó un ensayo para evaluar los efectos de los diferentes medios de
8 enraizamiento (sustrato mezcla de turba y perlita en proporciones 70:30, 50:50 y 30:70 v/v),
9 la presencia de auxinas exógenas (NAA), y el período de cosecha sobre el enraizamiento de
10 esquejes de tallo de *A. arborescens*. Para ello, esquejes de madera blanda, obtenidos de
11 plantas silvestres en Febrero, Abril y Noviembre de 2010, fueron colocados en un banco
12 cubierto, equipado con un sistema de nebulización, bajo fotoperiodo natural. La tasa de
13 enraizamiento, el número de raíces y la longitud de la raíz se evaluaron a los 40 días. El
14 porcentaje de estacas enraizadas fue significativamente influenciado por el período de cosecha
15 (el valor mas largo fue anotado en Febrero), mientras los medios de enraizamiento y la
16 adición de auxinas no mostraron efectos significativos. Los mejores resultados, en términos
17 de número de raíces y longitud, se lograron utilizando una mezcla 50:50 sin hormonas
18 exógenas.

19

20 **Palabras clave adicionales:** Plata Ajenjo, Árbol Ajenjo, propagación vegetativa, sustratos,
21 naftaleno ácido acético, período de cosecha.

22

23

24

25

1 INTRODUCTION

2 *Artemisia arborescens* L. is one of the *Artemisia* species (family *Asteraceae*) growing in wild
3 flora of the southern Mediterranean area. It is a woody perennial shrub, bearing green-silvery
4 leaves and yellow flowers that appear throughout the late spring until summer depending on
5 the environmental conditions. The species finds a large number of uses in ethno-medicine
6 (Palmese *et al.*, 2001; Garcia *et al.*, 2006; Vicidomini, 2007) as antispasmodic, antipyretic,
7 anti-inflammatory and abortifacient (Dessi *et al.*, 2001), as antiherpevirus (Saddi *et al.*, 2007),
8 and as active antimicrobial agent against *Listeria monocytogenes* (Militello *et al.*, 2011).
9 Moreover, being an aridoresistant and nitrophilous plant, *A. arborescens* bears a great
10 importance for its potential use in environmental engineering (Cella and Collu, 2004).

11 Seed germination and micropropagation techniques were studied in different *Artemisia*
12 species, such as *A. frigida* Willd. (Bai *et al.*, 1995); *A. tridentata* Nutt. (Alvarez-Cordero and
13 McKell, 1979; Young and Evans, 1975); *A. genipi* Weber and *A. umbelliformis* Lam. (Anon.,
14 2004); *A. judaica* L. (Liu *et al.*, 2004); *A. vulgaris* L. (Govindaraj and Bollipo, 2007;
15 Govindaraj *et al.*, 2008, Sujatha and Ranjitha Kumari, 2008); *A. annua* L. (Liu *et al.*, 1998;
16 Fulzele *et al.*, 1995) and *A. absinthium* L. (Zia *et al.*, 2007), but only few studies are available
17 about the vegetative propagation of this genus, as in *A. ludoviciana* Nutt. (Bradley Rowe and
18 Cregg, 2002); *A. tridentata* Nutt. (Alvarez-Cordero and McKell, 1979, Bakker, 2010) and *A.*
19 *arborescens* (Cella and Collu, 2004).

20 As it is well known, micropropagation and seed multiplication are largely utilized practices,
21 but they are not always suitable to all conditions. As a matter of fact, the first method is
22 expensive (Saranga and Cameron, 2006) and time-consuming in order to obtain a good
23 adaptation from *in vitro* culture to open field conditions, whereas the second one is
24 characterized by high genetic variability and scarcely homogeneous production. Hence,
25 propagation by stem cuttings remains the most valid and alternative method in order to obtain

1 a rapid propagation with reduced costs, and it is advisable its wide application in the nursery
2 activity.

3 Rooting capacity in cuttings is influenced by internal factors, as genotype, nutritional status or
4 phenological stage, and external factors, as temperature and light intensity (Hartmann *et al.*,
5 1997; Agbo and Obi, 2008; Priadjati *et al.*, 2010). Internal factors are strictly related to the
6 amount of phytohormone that is physiologically necessary to the rooting phase (Copes and
7 Mandel, 2000; Guo *et al.*, 2009; Zobolo, 2010; Amri *et al.*, 2010; Ofori *et al.*, 1996); for such
8 reason, it is also important to know the optimal growing conditions for plants (external
9 factors) in order to select suitable rooting media (Cella and Collu, 2004; Tchoundjeu *et al.*,
10 2002; Mesh *et al.*, 1997; Shiembo *et al.*, 1996; Ofori *et al.*, 1996) and environmental
11 parameters.

12 Adventitious root formation is mediated by multiple changes in plant metabolism and it is
13 controlled by interdependent physiological phases where auxins play an important role
14 stimulating the root formation. Exogenous auxins are commonly used to improve natural
15 rooting efficiency in stem cuttings, although it was demonstrated in various plant species that
16 relatively high auxins concentrations are required only during the induction phase, while
17 during development these plant growth regulators become inhibitory (Cristofori *et al.*, 2010;
18 Hartmann *et al.*, 1997).

19 Differently from other genera and botanical families, few studies about propagation in
20 *Artemisia* species are available in literature (Pridham, 1963; Weglarz and Zalecki, 1984);
21 hence, the aim of this work was to define an effective and low-cost propagation protocol by
22 means of stem-cutting method, that is considered cheaper than the micropropagation (Saranga
23 and Cameron, 2006) and that does not require a specific technical equipment. This work
24 reports the results of a trial about different rooting substrates, auxin concentration (NAA) and
25 harvest period, in the vegetative propagation of wild *Artemisia arborescens*.

1

2 **MATERIALS AND METHODS**

3 *Plant material and experimental design*

4 The trial was carried out in 2010/11, in an EW oriented greenhouse (200 m²) with steel
5 structure and polymethacrylate methyl cover, located at the Research Unit for Mediterranean
6 Flower Species near Palermo (38°05'25.22'' N, 13°31'18.15'' E, 23 m above sea level), on
7 the coastal area of North Western Sicily.

8 Softwood cuttings were harvested (38°06'47.74'' N, 13°31'16.38'' E, 31 m a.s.l.) from mother
9 plants of a wild population of *A. arborescens* L. with distinct xerophytic traits growing on
10 rocky shores and rocky slopes located in alkaline and nitrophilous substrates.

11 In order to evaluate the effect of harvest period on rooting capacity, cuttings were collected in
12 February, April and November 2010. For each harvest period, a factorial experimental design
13 (three rooting substrates in presence or absence of NAA), with three replications per
14 treatment, was used. Each replication consisted of 22 cuttings (exp. unit).

15

16 *Auxin addiction and growing media*

17 In 50% of the stem cuttings, after leaves removal, the basal end was treated with 4000 ppm of
18 α -naphthalene acetic acid (NAA) powder formulation (Germon, Gerlach GmbH, Lubbecke,
19 Germany), whereas the remaining cuttings were left untreated. Both treated and untreated
20 cuttings were then inserted in 66-cell polystyrene seed trays containing three rooting media
21 based on different combinations (70:30, 50:50, 30:70 v/v – also named substrate 1, 2 and 3,
22 respectively) of sphagnum peat (TECNIC - Free Peat B.V., Sluiskade, Vriezenveen,
23 Netherlands) and perlite Ø 2-5 mm (AGRIPAN 100, Perlite Italiana s.r.l., Corsico (MI),
24 Italia); organic matter and organic nitrogen content of sphagnum peat were respectively 46%
25 and 0.5%. The seed trays were placed into a bench (6 m x 1.2 m) covered with a polyethylene

1 film and equipped with a mist nebulization system (relative humidity 75%), under natural
2 photoperiod. Maximum and minimum temperature of the bench were monitored during the
3 trial.

4

5 ***Sample collection and measurement***

6 In each treatment, data on cuttings survival rate (%), cuttings rooting rate (%), number of
7 roots/cutting, length of roots (cm) were collected forty days after the beginning of the trial.

8

9 ***Data Analysis***

10 Collected data were subjected to ANOVA by means of the package “Statistica” (V. 6.0 for
11 Windows, Statsoft Inc., Tulsa, OK) to determine treatment effects. Before statistical analysis,
12 cuttings survival and rooting percentages were converted in angular values (arcsin
13 transformation) (Gomez and Gomez, 1984).

14

15 **RESULTS AND DISCUSSIONS**

16 The trend of rooting percentages of *A. arborescens* cuttings in the different harvest moments
17 (Fig. 1) did not evidenced significant differences between rooted and non rooted cuttings in
18 the first counting moment, when all three groups (dead cuttings, alive rooted and alive non
19 rooted) expressed values ranging from about 20 to about 40%.

20 A higher differentiation was recorded in the following observations, when the mortality rate
21 of cuttings decreased sharply to 26% and to 5%, respectively in April and November.

22 Surprisingly, the counting of rooted cuttings did not arise but, on the contrary, decreased from
23 40% (February) to 10% averagely recorded in cuttings collected in April and November (Fig.
24 1). This outcome agrees with that reported by other authors (Alvarez-Cordero and McKell,
25 1979) who observed that cuttings of *Artemisia tridentata* Nutt. obtained in winter showed a

1 greater rooting activity than those collected in other periods.

2 A clear increase throughout counting dates (68 and 82% in April and November, respectively)

3 may be observed in the number of cuttings that, although alive, did not produce roots (NR).

4 The influence of harvest period on rooting efficiency of cuttings, previously reported for

5 several plants (Hartmann *et al.*, 1997; Sharma and Aier, 1989) and attributed to initial

6 physiological characteristics of the vegetal material, often affected cuttings performances.

7 Guo *et al.* (2009), for example, referred that cuttings of *Paeonia* collected in three different

8 periods did not vary on percent mortality and number of roots but significantly differed on

9 rooting percentage as well as on root length.

10 Cristofori *et al.* (2010) stated that the rooting ability of hazelnut cuttings was strongly

11 influenced by the collection time as the highest rooting rate occurred in cuttings collected in

12 late summer, whereas the lowest rate was found in those collected in July.

13 Akoumianaki-Ioannidou *et al.* (2010a), during a year-round propagation trial of *Eleagnus x*

14 *ebbingei*, observed that cuttings taken in autumn had the highest rate of rooting irrespective of

15 hormone concentration. Likewise, for *Pterocephalus perennis* vegetative multiplication

16 (Akoumianaki-Ioannidou *et al.*, 2010b), the maximum rooting success was recorded in

17 cuttings planted at spring with respect to those planted in autumn and summer.

18 The addition of exogenous auxin (NAA) did not help in solving such dormancy problem,

19 with average rooting rates of about 20% recorded in the two treatments; in the same way the

20 percentage of non rooted cuttings remained almost the unchanged (always higher than 50%),

21 with or without auxin application (Fig. 2). This result is in agreement with a study on

22 southernwood (*Artemisia abrotanum* L.) propagation (Schroeder and Le Duc, 1996), where

23 no significant difference was recorded between cuttings treated and untreated with rooting

24 hormone.

25 On the contrary, such a response is not in line with Alvarez-Cordero and McKell (1979) who

1 referred that indolebutyric acid treatment in cuttings of *A. tridentata* increased root formation
2 as a function of increased auxin concentration. The different behavior of the latter species
3 from that of *A. arborescens* could suggest that some propagative characteristics may be
4 genotype-dependant, as observed in *Grevillea* (Krisantini *et al.*, 2006) and in *Magnolia*
5 (Sharma *et al.*, 2006), with a high variability in rooting capacity of the cuttings. Moreover, the
6 better performance of *A. abrotanum* treated with IBA than *A. arborescens* treated with NAA
7 could be related to the different effectiveness of these two hormones, in particular to the
8 higher efficiency of IBA with respect to NAA on promoting rooting, as reported by several
9 authors for other plants (Ibáñez-Torres, 2004; Németh, 1986).

10 The inefficacy of auxin treatments on rooting response of *Artemisia* cuttings seemed to
11 confirm earlier results recorded on different plant species (Myers and Still, 1979; Dirr and
12 Heuser, 1987; Panetsos *et al.*, 1994) where the hormone concentrations used had no effect in
13 cuttings characterized by a natural high rooting potential. Therefore, the absence of
14 differences on rooting percentage between treated and non-treated cuttings of our assay could
15 be linked to a too low/high NAA concentration.

16 The application of unbalanced doses of rooting hormone are often reported in literature:
17 Akoumianaki-Ioannidou *et al.* (2010b), for example, referred that rooting rate of
18 *Pterocephalus perennis* cuttings was higher without the use of IBA than those treated with the
19 same hormone; Grolli *et al.* (2005) reported that auxin treatments were unsuccessful or had
20 negative effects on rooting of cuttings of *Platanus acerifolia* Willd.

21 The adoption of different type of substrates (Fig. 3) did not affect the rooting ability of
22 cuttings, with average values of 20% recorded despite of the treatment; the use of a lower
23 amount of sphagnum peat in the growing mixture (as in the 30:70 peat/perlite substrate),
24 although bringing to a certain increase of dormant cuttings (alive but not rooted, +15% with
25 respect to the 70:30 peat/perlite substrate), did not exert any evident effect on the mortality

1 rate as well as on the number of rooted cuttings (respectively -10% and -5%, compared to the
2 70:30 substrate).

3 Other authors previously observed that a progressive reduction of the peat percentage in the
4 growing media did not significantly affect rooting and growth of cuttings in some *Euphorbia*
5 family species (Fascella and Zizzo, 2009; Lym, 1992).

6 The presence/absence of exogenous auxin did not have any effect on the average number of
7 roots (average 3 roots/cutting) (Fig. 4) as well as on the root length (average 5.8 cm) (Fig. 5),
8 when present. Ibàñez-Torres (2004) observed that hormonal treatment (IBA and NAA
9 applications) did not influence root length of *Euphorbia lagascae* Spreng. cuttings after one
10 month compared to control but differences were evident only after two months, a time that is
11 often considered too long for the nursery industry. Fascella *et al.* (2008), after an experiment
12 on *Euphorbia x lomi* Rauh *in vivo* propagation, did not observe any differences between no-
13 treated and NAA-treated cuttings concerning cuttings viability, root length and plant
14 establishment.

15 A slight difference in number of roots, although not overpassing the threshold of statistical
16 significance, seemed to be linked to the harvest date, and some tendency in counting a lower
17 number of roots may be recognized in the cuttings obtained in the November harvest (2.5
18 roots/cutting) with respect to those harvested in February (4.6) (Fig. 4). In the same way, the
19 cutting period and the substrate type appeared to have some effect on the average length of
20 roots, as in cuttings obtained in the last collection time and grown in the 50:50 peat/perlite
21 media seemed somehow shorter (less than 4 cm) than in those harvested in late spring and
22 grown in the 30:70 peat/perlite substrate (more than 8 cm) (Fig. 5).

23

24 **CONCLUSIONS**

25 The present research tries to provide new useful information for the definition of a vegetative

1 propagation protocol that permits a fast (40 days) and low-cost production of *Artemisia*
2 *arborescens* plants, an aromatic species that could be exploited for many industrial uses as
3 well as for environmental restoration.

4 Results from the present study seem to point out that February was the best period for
5 harvesting softwood cuttings suitable for rooting and that rooting rate, as well root number
6 and length, is not affected by the addition of exogenous auxin like NAA. Moreover, the
7 substrate in which cuttings showed the best growing aptitude (in terms of number and length
8 of roots) may be identified with that one obtained with sphagnum peat and perlite at a 50:50
9 volume ratio.

10 However, further researches are needed to increase rooting performances and to record a more
11 exhaustive response of cuttings by testing different auxin types (IBA, IAA, etc.),
12 concentrations and formulations (dip immersion in water and/or alcoholic solution), as well
13 other periods of the year.

14

15 **REFERENCES:**

16 AGBO C.U., OBI I.U., 2008. Patterns of vegetative propagation of stem-cuttings of three
17 physiological ages of *Gongronema latifolia* BENTH over two seasons in Nsukka. Journal
18 of Tropical Agriculture, Food, Environment and Extension 7 (3), 193 – 198.

19 AKOUMIANAKI-IOANNIDOU A., PAPAGIANNI M., FASSEAS, C., 2010a. Propagation
20 of *Elaeagnus ×ebbingei* by cuttings and its evaluation as an ornamental for use in urban
21 and sub-urban areas. Acta Hort. 885, 27-32.

22 AKOUMIANAKI-IOANNIDOU A., ALEXIOU P., FASSEAS C., 2010b. Propagation of
23 *Pterocephalus perennis* by cuttings and its evaluation as ornamental. Acta Hort. 885, 21-25.

24 ALVAREZ-CORDERO E., MCKELL C.M., 1979. Stem cutting propagation of big
25 sagebrush: *Artemisia tridentata*. Journal of Range Management 32 (2), 141-143.

- 1 AMRI E., LYARUU H.V.M., NYOMORA A.S., KANYEKA Z.L., 2010. Vegetative
2 propagation of African Blackwood (*Dalbergia melanoxylon* Guill. & Perr.): effects of age
3 of donor plant, IBA treatment and cutting position on rooting ability of stem cuttings.
4 *New Forests* 39, 183–194.
- 5 ANONYMOUS, 2004. Riproduzione e valutazione della coltivazione di specie aromatiche
6 indigene della montagna Lombarda. Regione Lombardia. Relazione attività del progetto.
7 Fondazione Minoprio (in Italian). Available on-line:
8 [http://www.fondazioneminoprio.it/userfiles/attach/progetti/aromatiche%20di%20montag](http://www.fondazioneminoprio.it/userfiles/attach/progetti/aromatiche%20di%20montagna.pdf)
9 [na.pdf](http://www.fondazioneminoprio.it/userfiles/attach/progetti/aromatiche%20di%20montagna.pdf) [last accessed 2 September, 2011].
- 10 BAKKER J.D., 2010. Plant Propagation Protocol for *Artemisia Tridentata* ESRM 412 Native
11 Plant Production Spring 2010. Available on-line:
12 <http://courses.washington.edu/esrm412/protocols/ARTR2.pdf> [last accessed 2 September,
13 2011].
- 14 BAI Y., ROMO J.T., YOUNG J.A., 1995. Influences of temperature, light and water stress on
15 germination of fringed sage. *Weed Science* 43, 219-225.
- 16 BRADLEY ROWE D., CREGG B.M., 2002. Effect of Incorporating Controlled-release
17 Fertilizer on Adventitious Rooting and Growth of *Artemisia*, *Gaura*, and *Nepeta*. *J.*
18 *Environ. Hort.* 20 (1), 1–6.
- 19 CELLA R., COLLU M., 2004. Utilizzo di substrati artificiali nel recupero ambientale:
20 modellizzazione della crescita di *Artemisia arborescens* L. su diversi substrati. *Rendiconti*
21 *Seminario Facoltà Scienze Università Cagliari* 1-2 (74) [In Italian]
- 22 COPES D.L., MANDEL N.L., 2000. Effect of IBA and NAA treatments on rooting Douglas-
23 fir stem cutting. *New Forests* 20, 249-257.
- 24 CRISTOFORI V., ROUPHAEL Y., RUGINI E., 2010. Collection time, cutting age, IBA and
25 putrescine effects on root formation in *Corylus avellana* L. cuttings. *Scientia Hort.* 124

1 (2), 189–194.

2 DESSI M.A., DEIANA M., ROSA A., PIREDDA M., COTTIGLIA F., BONSIGNORE L.,
3 DEIDDA D., POMPEI R., CORONGIU F.P., 2001. Antioxidant Activity of Extracts
4 from Plants Growing in Sardinia. *Phytother. Res.* 15, 511–518.

5 DIRR A.M., HEUSER C.W. JR., 1987. The reference manual of woody plant propagation:
6 from seed to tissue culture. Athens, GA, USA.

7 FASCELLA G., ZIZZO G.V., 2009. Efficient propagation technique of *Euphorbia x lomi*
8 Thai hybrids. *HortScience* 44 (2), 495–498.

9 FASCELLA G., ZIZZO G.V., AGNELLO S., 2008. In vivo propagation of *Euphorbia milii* ×
10 *lophogona* hybrids for pot plant production. *Acta Hort.* 766, 163-168.

11 FULZELE D.P., HEBLE M.R., RAO P.S., 1995. Production of terpenoid from *Artemisia*
12 *annua* L. plantlet cultures in bioreactor. *Journal of Biotechnology* 40, 139-143.

13 GARCIA S., GARNATJE T., TWIBELL J-D., VALLES J., 2006. Genome size variation in
14 the *Artemisia arborescens* complex (Asteraceae, Anthemideae) and its cultivars. *Genome*
15 49, 244–253.

16 GOMEZ K.A., GOMEZ A.A., 1984. Statistical procedures for agricultural research. John
17 Wiley & sons Inc., New York, USA.

18 GOVINDARAJ S., BOLLIPO D.R.K, CIONI P.L., FLAMINI G., 2008. Mass propagation
19 and essential oil analysis of *Artemisia vulgaris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*
20 3 (105), 176–183.

21 GOVINDARAJ S., BOLLIPO D.R.K., 2007. Efficient in vitro micropropagation and
22 regeneration of *Artemisia vulgaris* L. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 7, 117-
23 124.

24 GROLLI P.R., MORINI S.,LORETI F., 2005. Propagation of *Platanus acerifolia* Willd. by
25 cutting. *Journal of Hort. Science & Biotechnology* 80 (6), 705-710.

- 1 GUO X., FU X., ZANG D., MA Y., 2009. Effect of auxin treatments, cuttings collection date
2 and initial characteristics on *Paeonia* ‘Yang Fei Chu Yu’ cutting propagation. *Scientia*
3 *Hort.* 119 (2), 177–181.
- 4 HARTMANN H.T., KESTER D.E., DAVIES F.T., GENEVE R.L., 1997. *Plant propagation:*
5 *principles and practises.* 7th ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J., USA.
- 6 IBANEZ-TORRES A., 2004. Rooting experiments with *Euphorbia lagascae* cuttings. *Ann.*
7 *Biol.* 26, 101–104.
- 8 KRISANTINI S., JOHNSTON M., WILLIAMS R.R., BEVERIDGE C., 2006. Adventitious
9 root formation in *Grevillea* (Proteaceae), an Australian native species. *Scientia Hort.* 107
10 (2), 171-175.
- 11 LIU C.Z., MURCH S.J., EL-DEMERDASH M., SAXENA P.K., 2004. *Artemisia judaica* L.:
12 micropropagation and antioxidant activity. *Journal of Biotechnology* 110, 63–71.
- 13 LIU C.Z., WANG Y.C., OUYANG F., YE H.C., LI G.F., 1998. Production of artemisinin by
14 hairy root cultures of *Artemisia annua* L in bioreactor. *Biotechnology Letters* 20 (3),
15 265–268.
- 16 LYM R.G., 1992. Propagation of *Euphorbia esula* for leafy spurge biocontrol agents. *Weed*
17 *Science* 40, 326-332.
- 18 MESH F., NEWTON A.C., LEAKEY R.R.B., 1997. Vegetative propagation of *Cordia*
19 *alliodora* (Ruiz & Pavon) Oken: the effects of IBA concentration, propagation medium
20 and cutting origin. *Forest Ecology and Management* 92, 45-54.
- 21 MILITELLO M., SETTANNI L., ALEO A., MAMMINA C., MOSCHETTI G.,
22 GIAMMANCO G.M., BLAZQUEZ M.A., CARRUBBA A., 2011. Chemical
23 composition and antibacterial potential of *Artemisia arborescens* L. *Essential Oil. Curr*
24 *Microbiol* 62, 1274–1281.
- 25 MYERS J.R., STILL S.M., 1979. Propagating London plane tree from cuttings. *Plant*

- 1 Propagator 25, 8-9.
- 2 NÉMETH G., 1986. Induction of rooting. In *Biotechnology in Agriculture and Forestry*,
3 vol,1. Trees (Bajaj YPS, ed). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, pp 49-64.
- 4 OFORI D.A., NEWTON A.C., LEAKEY R.R.B., GRACE J., 1996. Vegetative propagation
5 of *Militia excelsa* by leafy stem cuttings: effects of auxin concentration, leaf area and
6 rooting medium. *Forest Ecology and Management* 84, 39-48.
- 7 PALMESE M.T., UNCINI MANGANELLI R.E., TOMEI P.E., 2001. An ethno-
8 pharmacobotanical survey in the Sarrabus district (south-east Sardinia). *Fitoterapia* 72,
9 619-643.
- 10 PANETSOS K.P, SCALTSOYIANNES A.V., ALIZOTI P.G., 1994. Vegetative propagation
11 of *Platanus orientalis* x *P. occidentalis* F1 hybrids by stem cuttings. *Forest Genetics* 1,
12 125-130.
- 13 PRIADJATI A., SMITS W.T.M., TOLHAMP G. W., 2010. Vegetative propagation to assure
14 a continuous supply of plant material for forest rehabilitation. In: *The Balance between*
15 *Biodiversity Conservation and Sustainable Use of Tropical Rain Forests*. The Tropenbos
16 Foundation, Wageningen, the Netherlands.
- 17 PRIDHAM A.M.S., 1963. Propagation of *Artemisia vulgaris* from stem cuttings for herbicide
18 test purposes. *Proc. Northeastern Weed Contr. Conf.* 17, 332.
- 19 SADDI M., SANNA A., COTTIGLIA F., CHISU L., CASU L., BONSIGNORE L., DE
20 LOGU A., 2007. Antiherpevirus activity of *Artemisia arborescens* essential oil and
21 inhibition of lateral diffusion in Vero cells. *Annals of Clinical Microbiology and*
22 *Antimicrobials* 6, 10.
- 23 SARANGA J., CAMERON R., 2006. Adventitious root formation in *Anacardium occidentale*
24 L. in response to phytohormones and removal of roots. *Scientia Hort.* 111 (2), 164-172.
- 25 SCHROEDER J.R., LE DUC A., 1996. Propagation of selected culinary and ornamental

- 1 herbs. HortScience 31 (4), 633-634.
- 2 SHARMA, J., KNOX, G.W. AND ISPIDA, M.L., 2006. Adventitious rooting of stem
3 cuttings of yellow-flowered Magnolia cultivars is influenced by time after budbreak and
4 indole-3-butyric acid. HortScience 41 (1), 202-206.
- 5 SHARMA S.D., AIER N.B., 1989. Seasonal rooting behavior of cuttings of plum cultivars as
6 influenced by IBA treatments. Scientia Hort. 40 (4), 297–303.
- 7 SHIEMBO P.N., NEWTON A.C., LEAKEY R.R.B., 1996. Vegetative propagation of
8 Irvingia gabonensis, a West African fruit tree. Forest Ecology and Management 87, 185-
9 192.
- 10 SUJATHA G., RANJITHA KUMARI B.D., 2008. Micropropagation, encapsulation and
11 growth of Artemisia vulgaris node explants for germplasm preservation. South African
12 Journal of Botany 74, 93–100.
- 13 TCHOUNDJEU Z., AVANA M.L., LEAKEY R.R.B., SIMONS A.J., ASAAH E., DUGUMA
14 B., BELL J.M., 2002. Vegetative propagation of *Prunus africana*: effects of rooting
15 medium, auxin concentrations and leaf area. Agroforestry Systems 54, 183-192.
- 16 VICIDOMINI S., 2007. Proprietà alternative dei fitoestratti di Artemisia (Asteraceae): check-
17 list di Virus, Procarioti, Micoti, trattabili con fitoestratti di Artemisia. Contributo sulla
18 agro-ecologia delle colture oggetto del progetto Co.Al.Ta. Il Naturalista Campano 10: 1-
19 16 [In Italian].
- 20 WEGLARZ Z., ZALECKI R., 1984. Evaluation of southernwood Artemisia-abrotanum semi
21 hardwood cuttings as a reproductive material. Herba Polonica 30 (2), 101-108.
- 22 YOUNG J.A., EVANS R.A., 1975. Germinability of Seed Reserves in a Big Sagebrush
23 Community. Weed Science, 23 (5), 358-364.
- 24 ZIA M., REHMAN R., CHAUDHARY M.F., 2007. Hormonal regulation for callogenesis and
25 organogenesis of Artemisia absinthium L. African Journal of Biotechnology 6 (16), 1874-

1 1878.

2 ZOBOLO A.M., 2010. Effect of temperature, light intensity and growth regulators on

3 propagation of *Ansellia Africana* from cuttings. *African Journal of Biotechnology* 9 (34),

4 5566-5574.

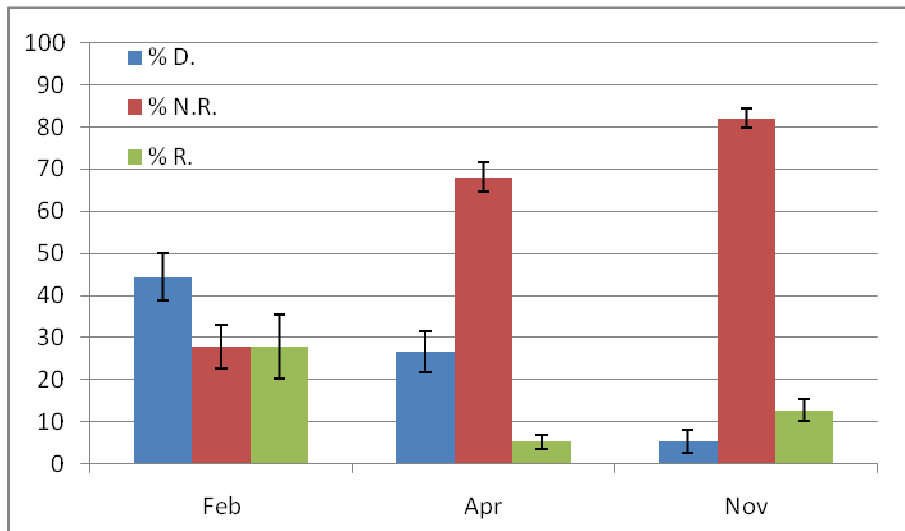


Fig. 1 – Rooting rate of *A. arborescens* cuttings in three harvest moments (mean values across substrate types and presence/absence of auxin). Vertical bars represent the standard error; D: dead cuttings; NR: alive cuttings but not rooted; R: rooted cuttings

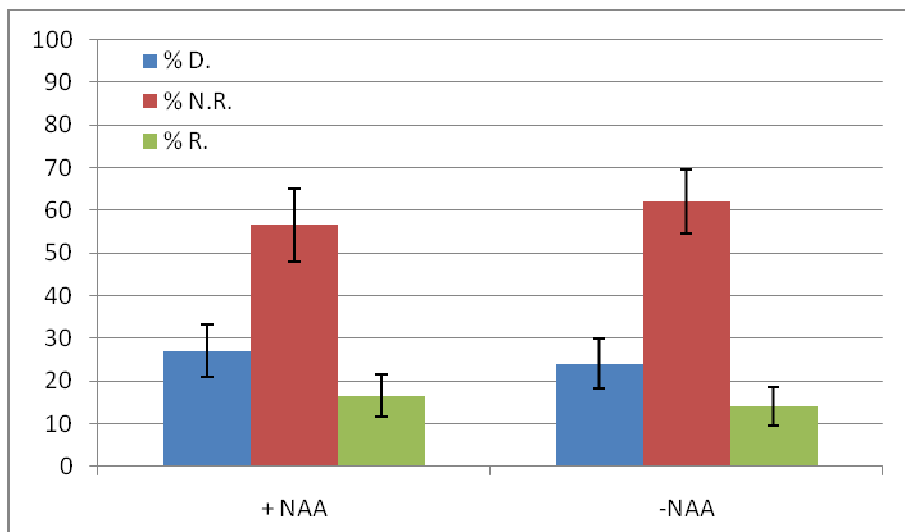


Fig. 2 – Rooting rate of *A. arborescens* cuttings with or without auxin in the growing medium (mean values across substrate types and harvest date). Vertical bars represent the standard error. D: dead cuttings; NR: alive cuttings but not rooted; R: rooted cuttings

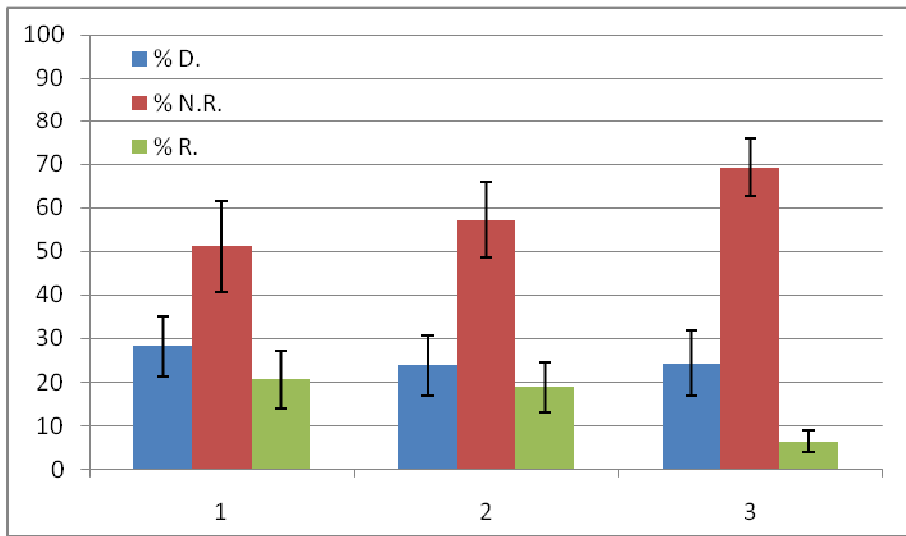


Fig. 3 – Rooting rate of *A. arborescens* cuttings with different growing substrate types (mean values across harvest date and presence/absence of auxin). Vertical bars represent the standard error.

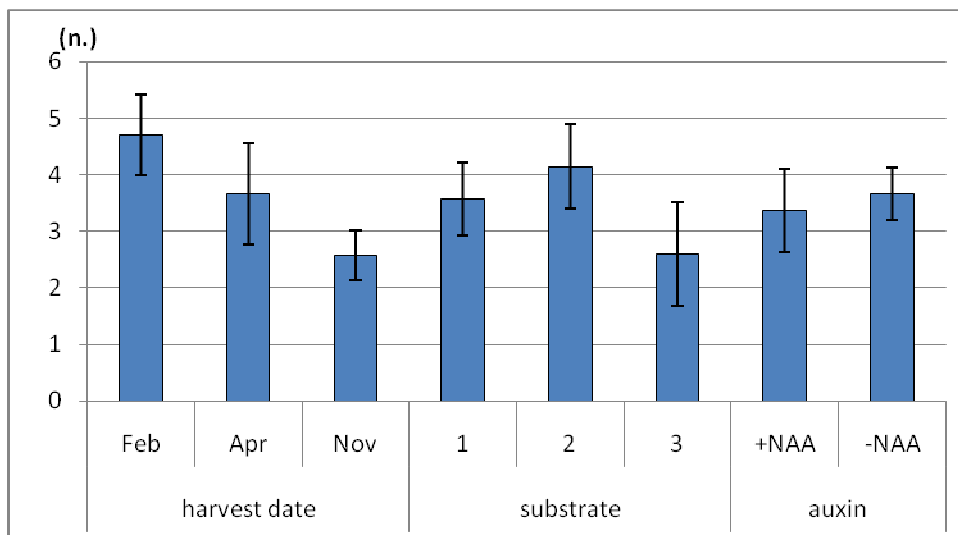


Fig. 4 – Average number of roots of *A. arborescens* cuttings according to date of harvest, substrate type and presence/absence of auxin. Vertical bars represent the standard error.

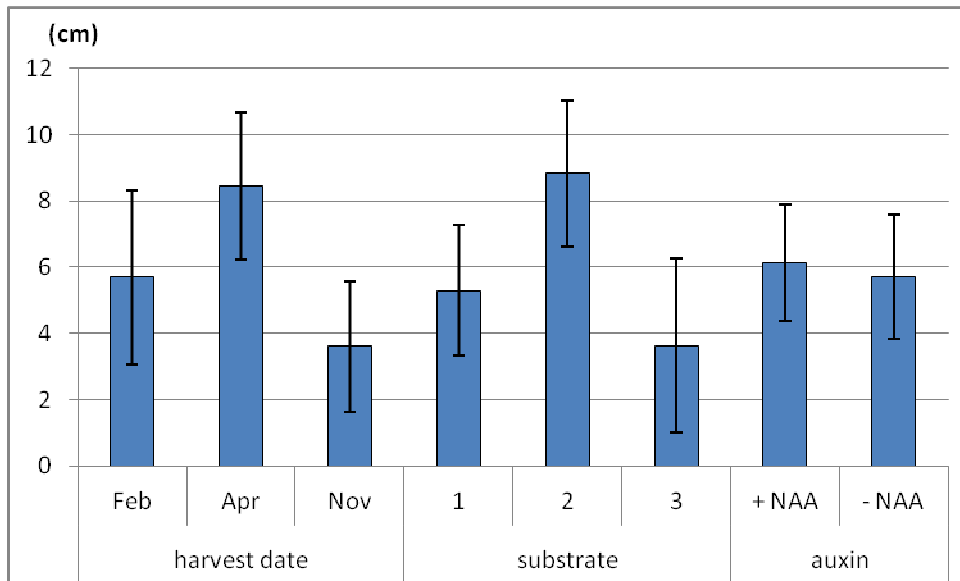


Fig. 5 – Average length of roots of *A. arborescens* cuttings according to date of harvest, substrate type and presence/absence of auxin. Vertical bars represent the standard error.