

Università degli Studi di Palermo
Facoltà di Agraria
Dipartimento dei Sistemi Agro-Ambientali

**Dottorato di ricerca in Agroecosistemi Mediterranei
XXII Ciclo (S.S.D. – AGR 02)**



**Indagini preliminari sulle potenzialità
produttive del piretro (*Chrysanthemum
cinerariaefolium* L.) in ambiente
mediterraneo**

Tesi di dottorato

Tutor:

Prof.ssa Alessandra Carrubba

Dottoranda:

Dott.ssa Caterina Catalano

Coordinatore:

Prof.ssa Adriana Bonanno

Università degli Studi di Palermo
Facoltà di Agraria
Dipartimento dei Sistemi Agro-Ambientali

**Dottorato di ricerca in Agroecosistemi Mediterranei
XXII Ciclo (S.S.D. – AGR 02)**

**Indagini preliminari sulle potenzialità
produttive del piretro (*Chrysanthemum
cinerariaefolium* L.) in ambiente
mediterraneo**

Tesi di dottorato

Tutor:

Prof.ssa Alessandra Carrubba

Dottoranda:

Dott.ssa Caterina Catalano

Coordinatore:

Prof.ssa Adriana Bonanno

Anno accademico 2009-10

*Dio ha dato agli uomini la scienza
perché potessero gloriarsi delle sue meraviglie.*

Siracide 38, 6.

INDICE

Indice.....	I
Indice delle figure.....	III
Indice delle tabelle.....	IV
Sommario.....	1
Ringraziamenti.....	2
I - INTRODUZIONE	3
1. Il piretro come “pianta officinale”	3
1.1 Il piretro come coltura negli ambienti mediterranei.....	3
1.2 Origine, importanza e diffusione della coltura.....	4
1.3 Classificazione botanica e caratteristiche genetiche.....	4
1.4 Descrizione della pianta, biologia ed esigenze ambientali.....	5
1.5 Miglioramento genetico del piretro.....	7
2. Le piante come produttrici di metaboliti secondari	8
2.1 I metaboliti secondari.....	8
2.2 Gli isoprenoidi.....	8
2.3 La biosintesi degli isoprenoidi.....	9
2.4 La biosintesi delle piretrine.....	11
2.5 Le piretrine ed il loro meccanismo d’azione.....	12
2.6 I derivati sintetici delle piretrine.....	13
3. Tecniche di coltura <i>in vitro</i> del piretro	14
3.1 Micropropagazione.....	14
3.2 Coltura di callo embriogenico.....	14
4. Tecniche di isolamento e fusione di protoplasti	16
4.1 Metodologie di isolamento dei protoplasti.....	16
4.2 La digestione enzimatica della parete cellulare.....	16
4.3 Fattori che influenzano l’isolamento dei protoplasti.....	17
II - OBIETTIVI DELLA RICERCA	19
III - PROVE DI COLTURA <i>IN VITRO</i>	20
1. Introduzione <i>in vitro</i>	20
1.1 Materiali e metodi.....	20
1.2 Risultati e discussione.....	21
2. Prove di germinazione	22
2.1 Materiali e metodi.....	22
2.2 Risultati e discussione.....	22
3. Prove di moltiplicazione	24
3.1 Materiali e metodi.....	24
3.2 Risultati e discussione.....	24
4. Prove di acclimatamento <i>ex vitro</i>	26
4.1 Materiali e metodi.....	26
4.2 Risultati e discussione.....	26
5. Formazione di callo embriogenico	30
5.1 Materiali e metodi.....	30
5.2 Risultati e discussione.....	30

IV - PROVE DI ISOLAMENTO DEI PROTOPLASTI	33
1. Isolamento dei protoplasti	33
1.1 Materiali e metodi.....	33
1.2 Risultati e discussione.....	37
V - EFFETTI DI ESTRATTI NATURALI DI PIRETRO SU TETRANYCHUS URTICAE KOCH (ACARIFORMES, TETRANYCHIDAE)	40
1 Materiali e metodi	40
1.1 Materiale vegetale.....	40
1.2 Estrazione di piretrine in esano.....	40
1.3 Trattamento acaricida.....	40
2. Risultati e discussione	41
VI - VALUTAZIONE DELL'ADATTABILITA' DEL PIRETRO AGLI AMBIENTI MEDITERRANEI	44
VII – CONCLUSIONI	46
Bibliografia	47
Publicazioni prodotte durante il triennio di dottorato	54
Appendice A: A. Carrubba, C. Catalano, L. Abbate, A. Motisi, N. Tusa. The genetic improvement of <i>Pyrethrum (Chrysanthemum cinerariaefolium L.)</i> : a biotechnological approach”. Italian Journal of Agronomy , 2008, 3, suppl.3: 577-578. ISSN: 1125-4718.....	56
Appendice B: Carrubba A., Catalano C. - <i>Essential oil crops for sustainable agriculture - A review</i> . E. Lichtfouse (ed.), <i>Climate Change, Intercropping, Pest Control and Beneficial Microorganisms</i> , Sustainable Agriculture Reviews 2, DOI 10.1007/978-90-481-2716-0_8, Springer Science+Business Media B.V. 2009.....	59

INDICE DELLE FIGURE

Figura 1 – Capolini di piretro.....	6
Figura 2 – Via dell'acido mevalonico (mevalonate pathway).....	10
Figura 3 – Sintesi dell'unità isoprenica attiva a C5.....	11
Figura 4 – Possibile biosintesi delle piretrine nel piretro e dei monoterpeni irregolari nel tanaceto.....	12
Figura 5 – Illustrazione schematica delle fasi principali dell'isolamento di protoplasti da mesofillo fogliare di piantine allevate <i>in vitro</i> mediante “digestione” enzimatica della parete.....	17
Figura 6 – Introduzione <i>in vitro</i> del piretro.....	21
Figura 7 – Prove di germinazione nel piretro.....	23
Figura 8 – Prove di moltiplicazione <i>in vitro</i> del piretro.....	25
Figura 9 – Andamento delle altezze nel corso dell'acclimatamento <i>ex-vitro</i>	27
Figura 10 – Fasi dell'acclimatamento <i>ex vitro</i> dal trasferimento in vasetto fino al trapianto in pieno campo.....	28-29
Figura 11 – Formazione di callo nel piretro.....	32
Figura 12 – Prove di isolamento di protoplasti di piretro.....	35-36
Figura 13 – Protoplasti dopo due ore di incubazione (40X).....	38
Figura 14 – Protoplasti dopo quattro ore di incubazione (40X).....	38
Figura 15 – Protoplasti dopo 6 ore di incubazione (40X).....	39
Figura 16 – Protoplasti (10X).....	39
Figura 17 – Prova su acari.....	41
Figura 18 - Mortalità degli stadi giovanili di <i>T. urticae</i> trattati con tre diverse concentrazioni di estratto di piretro naturale, dopo 24h, 48h, 72h e 7 gg dal trattamento.....	42
Figura 19 - Mortalità delle femmine di <i>T. urticae</i> trattate con estratto naturale di piretro (2000 ppm).....	43
Figura 20 – Campo di piretro in fioritura, Sparacia (Cammarata - AG), 2008.....	45
Figura 21 – Campo di piretro in fioritura, Sparacia (Cammarata - AG), 2008.....	45

INDICE DELLE TABELLE

Tabella 1 – Stadi fiorali del piretro e loro durata	6
Tabella 2 – Classi di isoprenoidi, con l'indicazione della funzione fisiologica	9
Tabella 3 – Composizione delle piretrine nei capolini di piretro	11
Tabella 4 – Protocolli utilizzati per la disinfezione degli espianti posti in coltura in vitro.....	20
Tabella 5 – Tasso di crescita dei germogli.....	24
Tabella 6 – Numero e dimensioni delle radici dopo 30 gg dal posizionamento delle talee.....	24
Tabella 7 – Percentuale di espianti che hanno sviluppato callo dopo 1 mese di coltura sui differenti mezzi.....	30
Tabella 8 – Soluzioni enzimatiche impiegate per l'isolamento dei protoplasti.....	33
Tabella 9 – Isolamenti di protoplasti di piretro effettuati.....	37
Tabella 11 – Sparacia (Cammarata - AG), 2008. Piretro (<i>Chrysanthemum cinerariaefolium</i> L.). <i>Medie</i> ± deviazioni standard.....	42

Sommario

Nel corso del triennio del dottorato di ricerca, le attività svolte hanno indagato sulle potenzialità produttive del piretro (*Chrysanthemum cinerariaefolium* L.) in ambiente mediterraneo.

A questo scopo, scegliendo un approccio di tipo biotecnologico, si è in primo luogo tentato di valutare la risposta della specie, considerata “ricalcitante”, alle condizioni di coltura *in vitro*, nei suoi svariati aspetti.

L’attività di ricerca ha previsto, inoltre, la messa a punto di un’adeguata tecnica di isolamento di protoplasti di piretro, per un programma di miglioramento genetico mediante ibridazione somatica.

Ad ulteriore conferma delle ampie possibilità di applicazione del piretro, nel corso dell’ultimo anno del dottorato di ricerca, è stata condotta una prova su acari, in modo da testare l’effetto acaricida di estratti di piretro a diversa concentrazione.

Allo scopo di valutare l’adattabilità della Composita agli ambienti mediterranei, sono stati eseguiti, infine, dei rilievi sulle caratteristiche vegetative e produttive di una coltura di piretro allestita in un’area rappresentativa dell’entroterra siciliano.

L’attività di ricerca svolta durante il triennio del dottorato ha consentito di avere un quadro completo sulla risposta del piretro alle diverse tecniche impiegate. La specie, infatti, nonostante le problematiche riscontrate, ha raggiunto, a conclusione del periodo di sperimentazione, un buon livello di “addomesticazione” *in vitro*.

Le procedure di isolamento dei protoplasti, nonostante la modesta “riuscita” delle prove, hanno aperto lo scenario su aspetti interessantissimi, legati all’affascinante mondo della biologia cellulare e alle sue possibili applicazioni nell’ambito di programmi di miglioramento genetico per ibridazione somatica.

Anche le prove volte a testare gli effetti di estratti naturali di piretro su *Tetranychus urticae* Koch. (Acariformes, Tetranychidae) hanno dato risultati interessanti, suggerendo la necessità di approfondire lo studio in termini di accrescimento della popolazione.

Relativamente alla risposta agronomica del piretro in ambienti semi-aridi dell’entroterra siciliano, soprattutto in considerazione del livello estremamente ridotto di input tecnici somministrati, la Composita in coltivazione ha espresso, nel complesso, buone doti di adattabilità, assicurando, tra l’altro, vantaggi ad ampio spettro, di tipo ambientale, economico e sociale.

In definitiva, l’introduzione della specie negli ordinamenti colturali degli ambienti mediterranei appare, quindi, una scelta adeguata per lo sviluppo sostenibile ed integrato dei territori rurali, con particolare riferimento alle aree marginali del meridione d’Italia.

Ringraziamenti

Giunta a conclusione del triennio di dottorato di ricerca in “Agroecosistemi mediterranei”, il mio pensiero è rivolto a tutte le persone che hanno contribuito alla realizzazione del presente lavoro.

Il mio ringraziamento va alla mia famiglia, per avere considerato il mio lavoro sempre e comunque importante.

Grazie al mio tutor, la Prof.ssa Alessandra Carrubba, che mi ha accompagnata lungo questo percorso con i suoi preziosissimi consigli e suggerimenti.

Un sincero ringraziamento al Dott. Nicasio Tusa, per gli inestimabili insegnamenti di carattere scientifico e alla Dott.ssa Loredana Abbate, per avere consentito praticamente lo svolgimento della mia attività di ricerca e per l’insostituibile supporto tecnico-scientifico.

Ringrazio inoltre il Dott. Antonio Motisi, collega d’avventura in laboratorio, per avere condiviso con simpatia successi ed insuccessi.

Grazie al Prof. Haralabos Tsolakis e al Prof. Filippo Saiano, per la gentile collaborazione.

Caterina

I - INTRODUZIONE

1. IL PIRETRO COME “PIANTA OFFICINALE”

Nell’ambito della grandissima famiglia delle piante definite “officinali”, nella quale affluiscono tutte le piante che, direttamente o tramite i principi attivi in esse contenute, possiedono un interesse specificamente aromatico o medicinale o che, comunque, sono destinate alle utilizzazioni più diverse (cosmetiche, coloranti, insetticide, ecc.), trova collocazione il piretro (*Chrysanthemum cinerariaefolium* L.), pianta definita “paramedicinale” (da Silva et al., 2004), conosciuta fin da tempi antichissimi per le sue eccellenti proprietà insetticide.

La specie possiede notevoli potenzialità economiche, essendo destinata all’industria chimica per la preparazione di prodotti a base di piretrine naturali. Nonostante la possibilità di ottenere per sintesi chimica prodotti (piretroidi) del tutto simili alle piretrine, l’interesse verso il prodotto naturale rimane, infatti, notevolissimo, delineando sbocchi commerciali potenzialmente assai rilevanti.

1.1 Il piretro come coltura negli ambienti mediterranei

Le principali organizzazioni mondiali (ONU, FAO, UE) sono concordi nel riconoscere alla multifunzionalità dell’agricoltura un ruolo fondamentale per la promozione di uno sviluppo reale e sostenibile delle aree rurali (Carrubba et al., 2008). Negli ambienti mediterranei, spesso caratterizzati da condizioni di marginalità, la realizzazione di un’agricoltura impostata sui criteri summenzionati risulta tuttavia di particolare difficoltà.

I fattori che generano la condizione di marginalità di un territorio, pedo-climatici o socio-economici, possono essere validamente superati mediante la coltivazione delle piante officinali, secondo quanto scaturito da varie attività sperimentali già condotte. In questo scenario, l’introduzione di una coltura nuova, ad attività insetticida, dotata di eccellenti potenzialità, in grado di assicurare vantaggi ad ampio spettro, di tipo ambientale, economico e sociale, appare una scelta adeguata per lo sviluppo sostenibile ed integrato dei territori rurali, con particolare riferimento alle aree marginali del meridione d’Italia.

Già nel 1904, il Prof. Ferdinando Vallese, titolare della cattedra ambulante di “Agricoltura”, in una sua nota nella rivista da lui voluta e fondata “Agricoltura Salentina”, nel numero del 15 luglio, suggeriva la coltivazione del piretro, in via sperimentale, nel Salento leccese.

La messa a coltura del piretro in ambienti semi-aridi dell’entroterra siciliano ha portato a produzioni interessanti, sia in termini di biomassa complessiva che di fiori, anche in assenza di input tecnici di rilievo (Carrubba et al., 2006).

In linea generale, la specie presenta quindi ampie possibilità d’introduzione negli ordinamenti colturali degli ambienti mediterranei, a patto di affrontare e risolvere alcune problematiche legate, tra l’altro, alla scarsa disponibilità di piante dotate di buone caratteristiche produttive e qualitative.

Nel corso del triennio del dottorato di ricerca, le attività svolte hanno avuto come obiettivo generale quello della valorizzazione del piretro (*Chrysanthemum cinerariaefolium* L.).

La valutazione delle potenzialità agronomiche e produttive del piretro, nel tentativo di valorizzare la specie e di promuoverne la coltivazione, pone le sue basi su un’approfondita conoscenza della pianta e dei meccanismi che ne regolano il ciclo fisiologico. A questo scopo, scegliendo un approccio di tipo biotecnologico, si è in primo luogo tentato di valutare la risposta della specie, considerata “ricalcitante”, alle condizioni di coltura *in vitro*, nei suoi svariati aspetti.

1.2 Origine, importanza e diffusione della coltura

Il piretro (*Chrysanthemum cinerariaefolium* L.) è originario dell'Albania e della Dalmazia, un'area della ex Jugoslavia (Heywood, 1976).

La specie è coltivata per la produzione delle piretrine, sostanze dotate di eccellenti proprietà insetticide. Tali proprietà furono scoperte, nel 1840, in modo accidentale, in Dalmazia (Casida, 1973) e già nel 1860 iniziò la coltivazione su larga scala e la commercializzazione della specie.

Nel 1882 fu introdotto in Giappone, che divenne il principale produttore di piretro tra la prima e la seconda guerra mondiale (Purseglove, 1982). Intorno al 1920, anche la Svizzera e la Francia divennero produttori di piretro; nello stesso periodo, semi di piretro, provenienti dalla Svizzera e dal Giappone, giunsero in Inghilterra presso la Stazione Sperimentale "Rothamsted" e da qui arrivarono in Kenia (Wandahwa et al., 1996). Successivamente anche India, Tasmania, Cina, USA e diversi paesi del Sud America divennero produttori di piretro.

Con la seconda guerra mondiale, le forniture dal Giappone cessarono; da allora il Kenia divenne il principale produttore al mondo di piretro (Wandahwa et al., 1996).

Attualmente, i maggiori fornitori di piretro sul mercato mondiale sono il "Pyrethrum Board of Kenia" (PBK) e il "Botanical Resources Australia", localizzato in Tasmania, Australia (Greenhill, 2007).

In Europa, il piretro è coltivato in diversi paesi, tra cui Austria, Francia, Ungheria, Italia, Spagna e Russia.

La superficie mondiale investita a piretro ammonta a circa 27.000 ha, con una produzione mondiale, in termini di fiori secchi, di poco meno di 13.000 tonnellate per anno (FAO, 2008); una produzione di circa 200-300 tonnellate per anno è registrata anche in Italia.

1.3 Classificazione botanica e caratteristiche genetiche.

Il Piretro (*Chrysanthemum cinerariaefolium* L. = *Tanacetum cinerariaefolium* (Trev.) Schultz-Bip.) è una pianta erbacea perenne appartenente alla famiglia delle Asteraceae. Secondo una prima classificazione botanica, la specie appartiene al genere *Chrysanthemum*, mentre secondo una riclassificazione effettuata con lo scopo di snellire il genere stesso, il Piretro rientra nel genere *Tanacetum* (Soreng e Cope, 1991).

Il genere *Tanacetum* è uno degli oltre 100 generi della tribù delle Anthemideae (Soreng e Cope, 1991), la quale raccoglie circa il 10% dei generi ed il 15% delle specie della famiglia delle Asteraceae (Heywood e Humphries, 1977). Attualmente il genere *Tanacetum* comprende un numero di specie tra 70 e 150, a seconda della classificazione considerata (Abad, 1995; Soreng e Cope, 1991; Heywood e Humphries, 1977), risultando uno dei più grandi nell'ambito delle Anthemideae (Abad, 1995).

Il numero cromosomico di base del piretro, così come delle altre specie della tribù delle Anthemideae, è $2n=2x=18$ (MacDonald, 1995; Heywood e Humphries, 1977; Virrankoski e Sorsa, 1968). Tuttavia, sono stati individuati cloni triploidi ($2n=3x=27$) e tetraploidi ($2n=4x=36$) (MacDonald 1995; Ottaro 1977). Così come in altre composite (Leto et al., 1994), il livello di ploidia influisce sulle caratteristiche morfologiche: piante triploidi di piretro mostrano infatti, rispetto alle diploidi, fiori più grandi, steli più lunghi e stomi più grandi (anche se in numero inferiore) (Ottaro et al., 1977).

Molti caratteri legati alla produttività della pianta sono ereditari: numero di fiori per pianta (Singh et al., 1988), peso dei fiori (Singh et al., 1988), taglia dei fiori (Parlevliet et al., 1970), produzione di piretrine (Singh et al., 1988).

1.4 Descrizione della pianta, biologia ed esigenze ambientali

Nell'ambito del sistema Raunkiaer, che classifica le diverse forme biologiche delle piante, il piretro è una camefita suffruticosa (Ch suffr.).

La pianta raggiunge un'altezza di 80-100 cm, appare cespitosa, di colore grigio-argento, ricoperta da una leggera peluria setosa.

La specie viene propagata sia per via gamica, mediante seme, che per via vegetativa.

I semi di piretro presentano, tuttavia, una germinazione lenta, incostante e povera alle alte temperature (30-35 °C) (Haque et al., 2006).

Le foglie sono pennato-partite, con segmenti pennati o palmati; quelle basali, lunghe 10-20 cm, hanno la lamina più corta del picciolo, mentre quelle superiori sono in genere più piccole e con un picciolo più corto (Greenhill, 2007).

Le temperature ottimali per il processo fotosintetico oscillano tra 15 e 20°C.

Il periodo vegetativo ha una durata di diversi mesi, necessari per l'induzione della fioritura, che avviene indifferentemente in condizioni di fotoperiodo lungo o corto.

L'induzione della fioritura è stimolata da un periodo di circa sei settimane con temperature inferiori a 17°C (FAO, 1978; Glover, 1955; Roest, 1976).

L'alternanza di temperature notturne sotto i 13°C e diurne tra i 15 e i 20°C determina un incremento della produzione di fiori (Roest, 1976).

I capolini (pseudanzi), del diametro di 40-50 mm, solitari e su lunghi peduncoli, simili a delle margherite, presentano due diversi tipi di fiori, quelli tubulosi del disco centrale, ermafroditi, di colore giallo, e quelli ligulati, femminili, di colore bianco, che costituiscono il bordo dell'infiorescenza (Brewer, 1968; Cantele, 2001; Greenhill, 2007).

La fecondazione è entomofila ed incrociata (Cantele, 2001).

Sia i fiori del disco che del raggio formano, a maturità, degli acheni, lunghi 2.5-3.5 mm, posti sul ricettacolo (McLaughlin 1973).

Principalmente, le piretrine sono accumulate all'interno di piccole ghiandole oleifere poste sulla superficie esterna degli acheni (93,7%) (Bath e Menary, 1986; Greenhill, 2007); minori quantità si riscontrano nei fiori del disco (2,0%), nei fiori del raggio (1,7%) e nel ricettacolo (2,6%) (Head, 1966).

Il contenuto di piretrine subisce delle variazioni dovute allo stadio di sviluppo dei capolini (Tabella 1). La loro concentrazione, infatti, subisce un incremento a partire dallo stadio 1 (gemme) fino a raggiungere il livello massimo quando 3-4 file dei fiori del disco (circa i $\frac{3}{4}$) sono aperti (tra gli stadi 4 e 5), prima dell'inizio del distacco dei fiori ligulati (Bath e Menary, 1984; Cantele, 2001; Wandahwa et al., 1996); successivamente il livello di piretrine decresce gradualmente (Wandahwa et al., 1996). La concentrazione di isoprenoidi nel piretro (e di piretrine in particolare) dipende, inoltre, dalla linea selezionata (Tedone et al., 2004): molti cloni raggiungono, per esempio, il maggiore contenuto in piretrine tra gli stadi 5 e 7 (Ikaku et al., 1989).

Tabella 1. Stadi fiorali del piretro e loro durata (Head, 1966; Wandahwa et al., 1996)

STADIO	DESCRIZIONE	DURATA
1	Gemme fiorali chiuse	0
2	Fiori del raggio verticali	12
3	Fiori del raggio orizzontali, prima fila dei fiori del disco aperti	16
4	Tre file (circa) di fiori del disco aperti	19
5	Tutti i fiori del disco aperti e maturi	21
6	Inizio sfioritura	31
7	Piena sfioritura	43
8	Steli secchi 1 cm sotto il capolino, raccolta semi	60

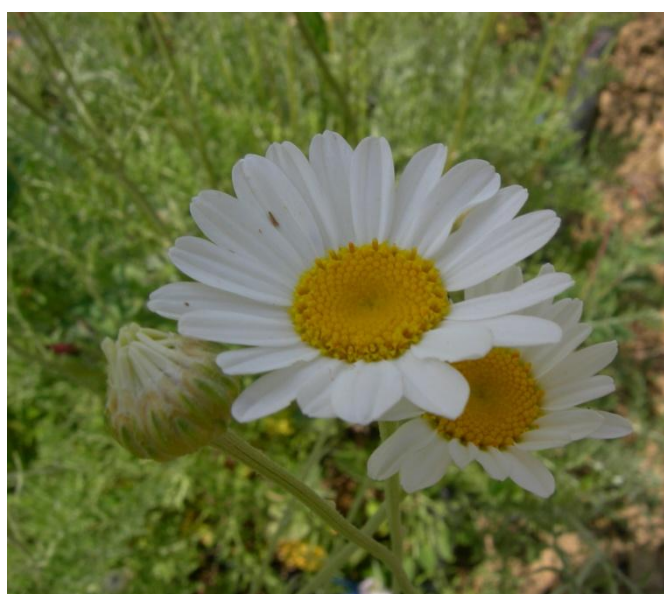


Figura1. Capolini di piretro

In Kenia, il piretro cresce bene ad altitudini elevate tra 1500 e 3000 m s.l.m. (Wandahwa et al., 1996).

Esige un'elevata piovosità, tra 1000 e 1400 mm annui (Cantele, 2001; Wandahwa et al., 1996).

Un periodo secco di almeno due mesi consente un ringiovanimento della pianta (Wandahwa et al., 1996) e un migliore controllo delle infestanti (Cantele, 2001). La coltura, tuttavia, fallisce in aree caratterizzate da un periodo siccitoso prolungato (7 o più mesi) (Wandahwa et al., 1996).

Il piretro cresce bene su suoli fertili, profondi e ben drenati (Wandahwa et al., 1996), ma trova condizioni di crescita ideali anche su terreni ghiaiosi, leggermente alcalini o salini o calcarei (Kroll, 1963).

1.5 Miglioramento genetico del piretro

I principali obiettivi dei programmi di miglioramento genetico del piretro riguardano l'aumento del contenuto di piretrine e della produzione di fiori (Jones, 1973) e, più in generale, il miglioramento delle caratteristiche agronomiche della pianta (Keskitalo, 1999).

Negli ultimi 30 anni, i metodi classici di miglioramento genetico, la poliploidizzazione con ottenimento di individui triploidi o poliploidi (Tuikong, 1984), l'eterosi (Singh e Sharma, 1989), l'ibridazione (Singh e Sharma, 1989, Parlevliet e Contant, 1970; Jones, 1968) e la selezione clonale (Singh e Singh, 1996; Singh et al., 1988; Singh et al., 1987; Bhat et al., 1985; Parlevliet, 1975; Parlevliet e Contant, 1970; Parlevliet, 1969), hanno consentito un aumento del contenuto in piretrine da meno dell'1% al 3% sulla sostanza secca.

Il miglioramento genetico finalizzato all'ottenimento di nuovi cloni è realizzato mediante il metodo della selezione ricorrente, che porta alla concentrazione dei caratteri (geni o alleli) ritenuti favorevoli (Wandahwa et al., 1996). Le nuove varietà sono prodotte, invece, dall'ibridazione di due o più cloni di partenza (mother clones), moltiplicati mediante coltura di tessuti (Wandahwa et al., 1996).

2. LE PIANTE COME PRODUTTRICI DI METABOLITI SECONDARI

2.1. I metaboliti secondari

Negli organismi viventi, i composti possono essere divisi in due grandi gruppi: i metaboliti primari e i secondari.

I metaboliti primari sono quelli prodotti e coinvolti nei processi metabolici primari, come la respirazione e la fotosintesi, mentre gli altri, spesso ottenuti attraverso vie metaboliche derivanti da quelle primarie, sono considerati metaboliti secondari (terpenoidi, glucosidi, alcaloidi, ecc.) (Seigler, 1998)

Questi ultimi, le cui concentrazioni possono ammontare a piccole percentuali del peso secco, sono molto numerosi e diffusi soprattutto nelle piante superiori. Più di 20.000 composti secondari erano noti nel 1985 (Hartmann, 1985) e almeno 1000 nuovi composti sono descritti ogni anno.

La distinzione tra metaboliti primari e secondari non è sempre netta. Alcuni composti presenti nella struttura della parete cellulare vegetale (acido cinnamico e lignina), per esempio, sono intermediari tra il metabolismo primario e quello secondario (Birch, 1973).

Le funzioni dei metaboliti secondari non sono sempre chiare; molti sono coinvolti in meccanismi di difesa ed intervengono in importanti interazioni tra la pianta e l'ambiente circostante.

In particolare, secondo Whittaker (1970, in Price 1984), la funzione principale di molti metaboliti secondari sarebbe quella di proteggere la pianta dagli organismi antagonisti e dai fitofagi in particolare, esercitando nei loro confronti un'azione fagodeterrente, repellente o tossica (Dindo, 1993). A loro volta i fitofagi, nel corso del tempo, possono rispondere a tali sostanze mediante la differenziazione di individui resistenti, determinando così la capacità delle piante di elaborare metaboliti secondari diversi, nel complesso processo di coevoluzione in cui piante e organismi antagonisti sono impegnati da milioni di anni (Spencer, 1988).

2.2 Gli isoprenoidi

Con il termine "isoprenoidi" ci si riferisce ad un'affascinante famiglia di composti ottenuti da glucosio e acetyl-CoA.

Gli isoprenoidi vegetali comprendono gruppi di composti strutturalmente diversi, che possono essere a loro volta distinti in metaboliti primari o secondari (Chappell, 1995).

Tra gli isoprenoidi appartenenti al gruppo dei metaboliti primari riscontriamo gli steroli, i carotenoidi, gli ormoni vegetali, ecc. Si tratta, in linea generale, di composti essenziali per l'integrità della membrana, la fotoprotezione, l'organizzazione dello sviluppo della pianta (Tabella 2).

Gli isoprenoidi classificati come metaboliti secondari comprendono i monoterpeni, i sesquiterpeni e i diterpeni. Essi non sono essenziali per la vita della pianta, ma svolgono importanti funzioni nell'ambito delle interazioni delle piante con il loro ambiente (Tabella 2). Specifici terpenoidi sono stati correlati, per esempio, con i meccanismi di interazione pianta-pianta (Stevens, 1984), pianta-insetti (Gibson et al, 1983) e pianta-patogeni (Stoessel et al., 1976).

Tabella 2. Classi di isoprenoidi, con l'indicazione della funzione fisiologica (mod. Chappell, 1995).

Classe	Esempio	Funzioni
Gruppi prenilici	Citochinine	Fitoregolatori
Monoterpeni	Mentolo	Aroma, fragranza, interazioni pianta-insetti
Sesquiterpeni	Capsidiolo	Interazioni pianta-patogeni
Steroli	Campesterolo	Struttura e funzioni membrana
Diterpeni	Acido gibberellico, Casbene	Fitoregolatori, interazioni pianta-patogeni
Poliprenoli	Ubiquinone, Carotenoidi	Trasporto elettroni, fotoprotezione.

2.3 La biosintesi degli isoprenoidi

La struttura degli isoprenoidi è costituita da uno scheletro idrocarburico avente come formula bruta l'isoprene (C_5H_8)_n, un idrocarburo con 5 atomi di carbonio ed una ramificazione. In particolare, i terpeni contengono meno di 5 unità di isoprene collegate tra loro (C_5 - C_{25}), mentre gli isoprenoidi più di 5 (C_{30} - >) (Banthorpe e Charlwood, 1980).

Tuttavia, è opportuno specificare che l'isoprene subisce il processo di costruzione molecolare mediante le sue forme "attive", l'isopentenilpirofosfato (IPP) e il dimetilallilpirofosfato (DMAPP), un isomero interconvertibile dell'IPP. La biosintesi degli isoprenoidi inizia proprio dalla condensazione di una molecola di IPP e di una molecola di DMAPP.

La via biosintetica più studiata è quella conosciuta come "via dell'acido mevalonico" (mevalonate pathway) (Figura 2), che porta alla formazione dell'unità isoprenica attiva a 5 atomi di carbonio (IPP); più recentemente, è stata proposta una via alternativa per la sintesi dell'IPP nei plastidi (cloroplasti e mitocondri), conosciuta come via del Piruvato Gliceraldeide 3-P (Bouvier et al. 1998; Arigoni et al. 1997; Lichtenthaler et al. 1997).

Figura 2. Via dell'acido mevalonico (mevalonate pathway).

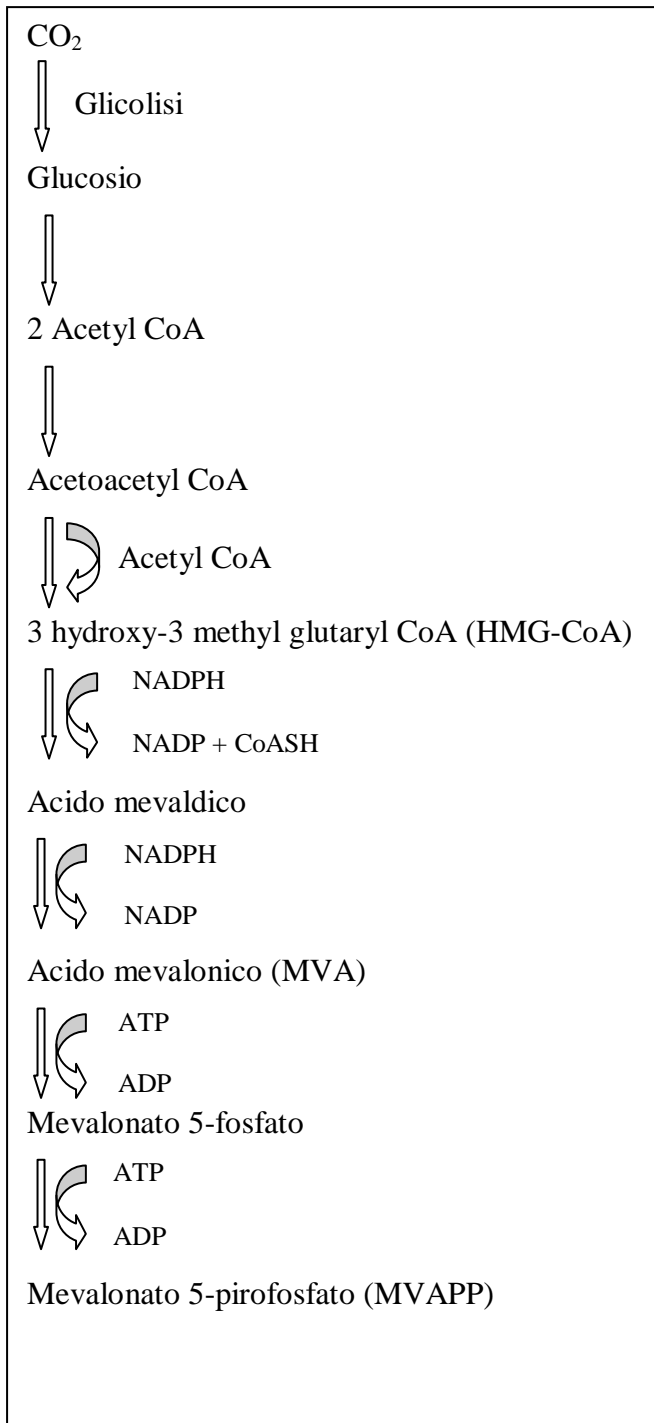
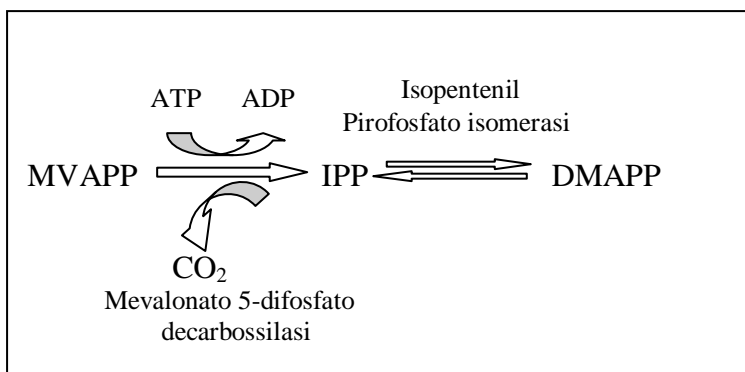


Figura 3. Sintesi dell'unità isoprenica attiva a C5.



2.4 La biosintesi delle piretrine

In generale, le piretrine sono l'insieme di sei esteri monoterpenuici ottenuti dall'esterificazione di due acidi con tre alcoli (pyrethrolone, jasmolone e cinerolone). L'acido crisantemico (monocarbossilico) è l'isoprenoide di base degli esteri chiamati piretrina I, cinerina I e jasmolina I, collettivamente conosciuti come piretrine del I gruppo. Allo stesso modo, l'acido piretrico (dicarbossilico) è l'isoprenoide di base delle piretrine del II gruppo (piretrina II, cinerina II e jasmolina II) (Hitmi et al., 2001).

L'estratto grezzo dei capolini di piretro contiene circa il 30-35% di piretrine (Tabella 3) insieme a piccole quantità di altri isoprenoidi, tra i quali carotenoidi (0,82%), clorofille (0,1%) e taxasteroli (5,0 %).

Tabella 3. Composizione delle piretrine nei capolini di piretro (fonte: Keskitalo, 1999).

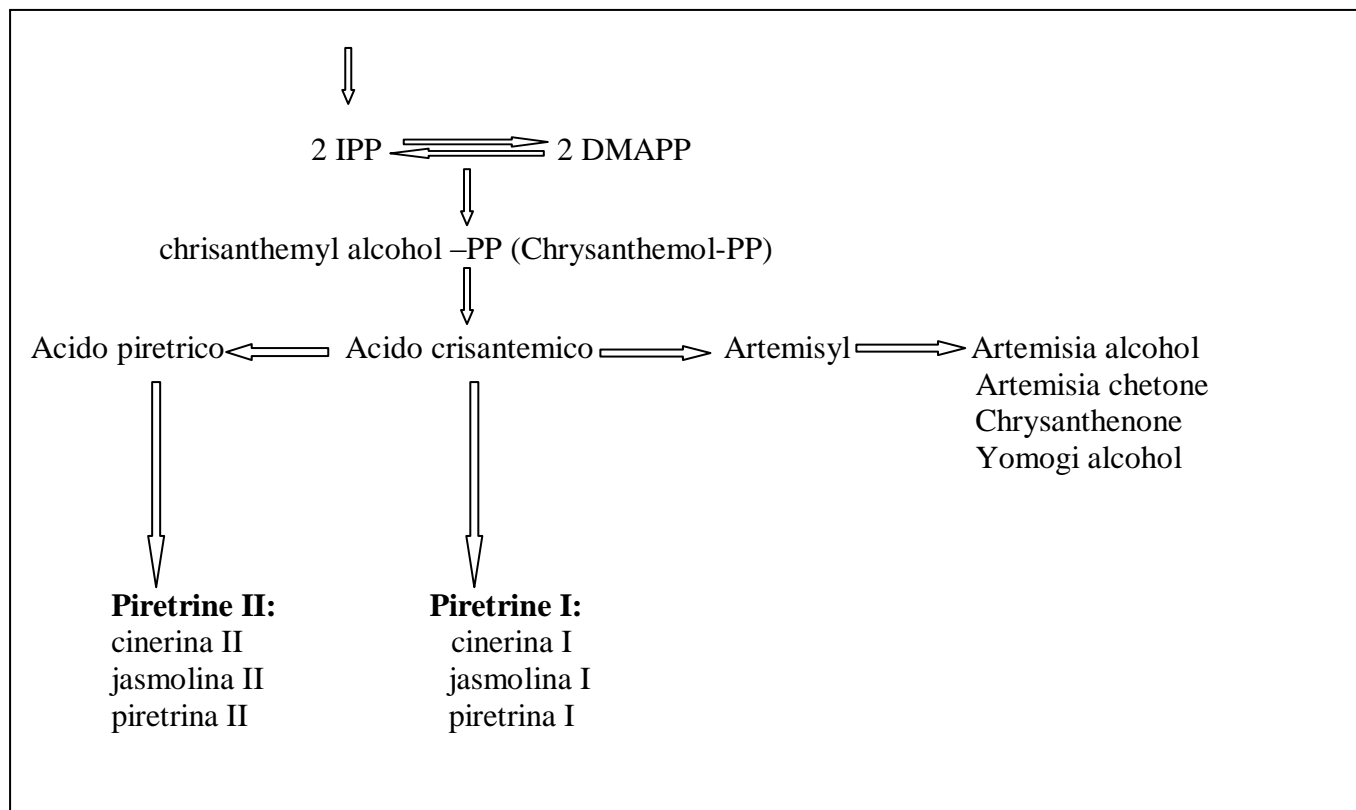
Composto	Concentrazione %		Rifer. bibl.
	1	2	
PIRETRINE:	totale 2.0	30-35	Head 1969; Head 1966
Piretrine I:	0,92	14,8	Head 1969; Head 1966
Cinerina I	0,18	2,2	Head 1969; Head 1966
Jasmolina I	0,09	1,2	Head 1969; Head 1966
Piretrina I	0,65	11,4	Head 1969; Head 1966
Piretrine II:	1,08	15,2	Head 1969; Head 1966
Cinerina II	0,26	3,5	Head 1969; Head 1966
Jasmolina II	0,10	1,2	Head 1969; Head 1966
Piretrina II	0,72	10,5	Head 1969; Head 1966

1 Concentrazione nei capolini secchi, %

2 Concentrazione nell'estratto grezzo dei capolini, %

A differenza di quanto avviene generalmente nella fase iniziale della biosintesi degli isoprenoidi, in cui, come già detto, si ha l'unione di molecole di IPP e di una di DMAPP, la biosintesi delle piretrine ha inizio dalla condensazione di due molecole di DMAPP, nella formazione di chrisanthemyl alcohol-PP (Chrysanthemol-PP) (Godin et al, 1963; Crowley et al. 1962), dalla cui ossidazione si ottiene l'acido crisantemico (monoterpene) (Crombie, 1980) (Figura 4).

Figura 4. Possibile biosintesi delle piretrine nel piretro e dei monoterpeni irregolari nel tanacetolo (mod., Keskitalo, 1999; Zito et al., 1991; Staba e Zito, 1985; Greger, 1977)



2.5 Le piretrine ed il loro meccanismo d'azione

Le piretrine sono ampiamente usate in tutto il mondo come insetticidi naturali. La loro importanza deriva da un insieme di qualità che le contraddistinguono e che le rende, nel loro complesso, ideali per il controllo delle infestazioni e, di conseguenza, tra gli insetticidi più utilizzati in agricoltura biologica (Wei et al, 2006). Esse sono infatti efficaci nei confronti di un elevato numero di insetti volanti (Odinga e Angedu, 2003), tra i quali afidi, coleotteri, cicaline, mosca bianca, tripidi, miridi, cimici, lepidotteri, ecc., determinando l'insorgenza di forme di resistenza poco importanti.

Bath (1995) riporta che l'attività insetticida dell'estratto di piretro è determinata dal rapporto tra le piretrine del I gruppo e quelle del II gruppo; in particolare, le prime, grazie alla loro maggiore stabilità, hanno un migliore effetto letale (kill-effect), mentre le seconde esercitano una rapida azione abbattente (knock-down effect) (Bruneton, 1995; Cantele, 2001).

L'attività delle piretrine si esplica essenzialmente per contatto agendo sul sistema nervoso degli insetti, i quali sono paralizzati, anche con dosi sub-letali, già dopo pochi minuti o addirittura in alcuni secondi. Le vie d'ingresso preferenziali sono localizzate in antenne, cerci, zampe e, soprattutto, negli spiracoli tracheali; una volta penetrate all'interno dell'organismo, le piretrine agiscono sulle cellule nervose (effetto neurotossico), provocando spasmi muscolari e movimenti scoordinati di zampe e ali, fino ad una completa paralisi (www.grupposdg.it, 2010).

La rapidità con cui il principio attivo viene metabolizzato dall'organismo è dovuta all'attività degli enzimi esterasi ed ossidasi. La breve durata dell'azione tossica delle piretrine può, tuttavia, non comportare la morte dell'insetto colpito. Per questo motivo alla maggior parte degli insetticidi a base di piretrine naturali sono aggiunti dei sinergizzanti, sostanze atossiche e prive di potere insetticida, capaci di migliorare l'assorbimento delle piretrine nell'organismo, inibendo l'azione

degli enzimi su menzionati. Tra queste sostanze ricordiamo la sesamina (componente dell'olio di sesamo) e il PPB (piperonil butossido), il quale, aggiunto in quantità uguale a quella del piretro, ne moltiplica di 5 volte la tossicità.

Le piretrine sono caratterizzate, inoltre, da un elevato potere repellente (insettifugo) e snidante (effetto flushing-out): gli insetti, irritati dall'azione dell'insetticida, tendono ad abbandonare i loro rifugi, aumentando le possibilità di entrare in contatto col principio attivo.

Le spiccate caratteristiche repellenti delle piretrine giustificano la scarsa azione per ingestione (possono essere facilmente rigurgitate).

Le piretrine non sono selettive, agendo indistintamente su insetti dannosi e utili. Risultano particolarmente efficaci nei confronti di insetti che non siano schermati da una corazza resistente, come la dorifora della patata o le cimici.

Dato il suo ampio spettro d'azione, è preferibile che i trattamenti con piretro siano limitati nel tempo e localizzati su focolai d'infestazione, in modo da minimizzare l'impatto sugli insetti utili. E' opportuno inoltre evitare interventi durante la fioritura delle colture per non rischiare di colpire le api impollinatrici (Roviglioni, 2008).

Inoltre, tra i vantaggi delle piretrine, rispetto a tutti gli altri insetticidi, si hanno la bassa tossicità nei confronti dei mammiferi e degli altri animali a sangue caldo (Jovetic et al, 1995; Hitmi et al, 1998), nonostante risultino altamente tossiche per i pesci, i rettili e gli anfibi (da evitare, quindi, l'uso nei pressi di corsi d'acqua o laghi).

I prodotti chimici a base di piretrine naturali sono, infine, termolabili e fotolabili ed hanno perciò il pregio di non lasciare residui dannosi, degradando dopo breve tempo dall'esecuzione del trattamento (www.grupposdg.it, 2010). Nei confronti delle piante, le piretrine non sono sistemiche né citotropiche. Dopo l'intervento insetticida, è sufficiente attendere 2 giorni prima di consumare ortaggi e frutta trattati e 3 giorni prima di potere lanciare eventuali insetti utili in campo (Roviglioni, 2008).

2.6 I derivati sintetici delle piretrine

La complessità molecolare delle piretrine ha reso la sintesi chimica di tali sostanze economicamente poco conveniente per lungo tempo (Barthomeuf et al., 1996). Negli ultimi decenni, invece, è stato possibile ottenere i prodotti di sintesi (piretroidi) a costi nettamente più bassi.

Capostipite della famiglia dei piretroidi fu l'Alletrina, sintetizzata da Schechter nel 1949 (Muccinelli, 2008) quale copia sintetica della Cinerina I, cui hanno fatto seguito la Tetrametrina, la Resmetrina ed i loro isomeri (www.grupposdg.it, 2010). Questi prodotti si sono rivelati, al pari delle piretrine naturali, insetticidi estremamente efficaci a basse dosi d'impiego, presentando, inoltre, una bassissima tossicità pratica (valutata dal rapporto tra dose d'impiego e DL 50 su ratto).

I primi piretroidi sintetici, così come le piretrine naturali, sono fotolabili, degradando velocemente sotto l'azione della luce (in particolare dei raggi U.V). Tale caratteristica, pur essendo vantaggiosa in termini di impatto ambientale, costringe a frequenti ripetizioni dei trattamenti, con il conseguente aumento dei costi.

L'industria chimica ha risposto a tali esigenze con i piretroidi fotostabili, di cui il capostipite fu la Delatametrina, sintetizzata nel 1973 da Elliot (Muccinelli, 2008). I piretroidi fotostabili, ottenuti attraverso successive modifiche dei gruppi acido ed alcolico dei piretroidi fotolabili, esplicano un'azione insetticida di contatto, favorita dalla loro spiccata lipofilia, che ne permette la penetrazione attraverso zone sensibili della cuticola degli insetti.

Al pari dei corrispondenti prodotti naturali, i piretroidi non sono né fitotossici né sistemici, penetrando rapidamente, grazie alle proprietà lipofile ricordate prima, solo negli strati cerosi superficiali delle piante e raggiungendo lentamente lo strato acquoso interno principalmente come metaboliti (www.grupposdg.it, 2010; Muccinelli, 2008).

3 TECNICHE DI COLTURA *IN VITRO* DEL PIRETRO

3.1 Micropropagazione

La realizzazione delle condizioni ottimali per la crescita *in vitro* del piretro e di altre Asteraceae risulta piuttosto difficoltosa, tanto da fare considerare tali specie “ricalcitranti”. Tali difficoltà, associabili a fenomeni di contaminazioni batteriche, vitrificazione o imbrunimento dei tessuti (Keskitalo et al., 1998), possono essere superate soltanto con un opportuno periodo di “addomesticazione” *in vitro* (Keskitalo, 1999).

Le contaminazioni batteriche possono essere particolarmente difficoltose da eliminare soprattutto quando gli espianti da introdurre *in vitro* provengono da piante perenni o, comunque, allevate in pieno campo e, in particolare, quando riguardano il sistema xilematico, protetto dalle tecniche di sterilizzazione superficiale (Hallman et al., 1997). I batteri endofitici hanno sviluppato, probabilmente, delle complesse relazioni con le piante ospiti, nell’ambito dei processi di co-evoluzione, in grado di influenzare la fisiologia delle piante (Misaghi e Donndelinger, 1990), anche senza la manifestazione di sintomi. In condizioni particolari di stress, come quelle che si riscontrano *in vitro*, tuttavia, i batteri fino ad allora latenti possono diventare “patogeni”, compromettendo la crescita e lo sviluppo delle colture (Leifert e Waiters, 1992).

Il termine “vitrificazione” indica, nell’ambito delle colture di tessuti, una particolare risposta, di tipo morfologico, dei tessuti vegetali sottoposti a stress (Franck et al., 1995).

Le foglie vitrificate presentano ipertrofia cellulare (Olmos e Hellin, 1998) e larghi spazi intercellulari; i tessuti sono meno lignificati ed il sistema vascolare è anormale (Gaspar et al., 1987). Dal punto di vista biochimico, nei tessuti vitrificati, l’attività di molti enzimi è alterata.

Tali sintomi possono essere ridotti agendo sui componenti del mezzo di coltura e sulle condizioni di crescita *in vitro*.

L’imbrunimento dei tessuti *in vitro*, infine, è un problema, spesso associato alle specie legnose e perenni, dovuto a particolari reazioni enzimatiche, che portano all’ossidazione di composti fenolici (Block e Lankes 1995), o a fattori esterni (presenza di patogeni, elevata concentrazione di sali, auxine o saccarosio) (Jin et al., 1996; Choi et al., 1998; Mohamed e Jayabalan, 1996; Curtis e Shetty, 1996). L’aggiunta di alcuni componenti nel mezzo di coltura può determinare la riduzione o l’eliminazione dell’imbrunimento.

Una buona procedura per la rapida moltiplicazione *in vitro* (micropropagazione) di cloni di piretro è stata messa a punto da Wambugu e Hangan nel 1981, sul mezzo di Murashige & Skoog (MS), contenente 6-benzylaminopurine (BA). Tali autori utilizzavano come espianti di partenza le gemme ascellari, ottenendo, attraverso tre successivi stadi (initiation, multiple shoot formation e rooting stage), piantine, successivamente trapiantate in vasi con un terriccio di torba e sabbia grossolana e trasferite in serra.

3.2 Coltura di callo embriogenico

Il callo è una massa di tessuto indifferenziato formato da cellule non specializzate, che si moltiplicano in maniera disorganizzata. Si ottiene da espianti di tessuto o cellule in coltura che, sotto lo stimolo di fitoregolatori, vanno incontro a de-differenziamento.

La formazione di callo di piretro si ottiene a partire da foglie (Barthomeuf et al., 1996), piccioli (Sarker e Pal, 1991), fiori del disco, gemme fiorali, steli fiorali (Barthomeuf et al., 1996), tegumenti

degli acheni e ricettacolo (Zieg et al., 1983). Al mezzo di Murashige & Skoog (MS), impiegato come base, vengono aggiunti, per l'induzione del callo, diversi fitoregolatori di crescita (2,4-D e BAP (Sarker e Pal, 1991), ANA e BAP (Barthomeuf et al., 1996), a varie concentrazioni.

Dal momento che, a livello mondiale, la produzione di piretro non riesce a soddisfare la richiesta di piretrine, è stata valutata la possibilità di ottenere le piretrine da colture cellulari ed in particolare da callo ottenuto a partire da diversi espianti.

Nonostante sia stato riportato (Zito, 1994) che le colture di callo di piretro non possono essere utilizzate per la produzione di piretrine, Barthomeuf et al., nel 1996, hanno estratto le piretrine da callo ottenuto a partire da fiori del disco, bottoni fiorali, steli e foglie. In particolare, il più alto livello di piretrine (30.3 mg di piretrine totali/100 g di biomassa secca) è stato riscontrato nel callo originatosi dai fiori del disco.

I risultati negativi riferiti da Zito sono da relazionare con un'inadeguata scelta dei cloni di partenza: la selezione di cloni in grado di produrre elevate quantità di piretrine è essenziale per ottimizzare la sintesi di piretrine nei tessuti del callo (Barthomeuf et al., 1996).

È stato dimostrato inoltre che la quantità di piretrine sintetizzate dipende, oltre che dai fattori biologici detti, dalle condizioni di crescita (Hitmi et al., 1998). Non è stata osservata, invece, alcuna correlazione tra la produzione di piretrine ed il tasso di crescita del callo (Sarker e Pal, 1991).

4 TECNICHE DI ISOLAMENTO E FUSIONE DI PROTOPLASTI

4.1 Metodologie di isolamento dei protoplasti

I protoplasti, conosciuti anche come “naked plant cells”, sono cellule vegetali private della parete cellulare, che mantengono integra la struttura interna (organuli intracellulari e nucleo). Il citoplasma di ciascuna cellula conserva, come unica barriera con lo spazio intercellulare, la membrana plasmatica, risultando, in tal modo, una struttura osmoticamente fragile.

I protoplasti sono in grado di esprimere totipotenza e, attraverso divisione cellulare, di rigenerare una pianta intera.

Le tecniche di isolamento e fusione dei protoplasti sono considerate un importante e valido approccio per la produzione di nuovi genotipi (Pan et al., 2003).

Hanstein (cf. Cocking E. C. 1972) introdusse il termine “protoplasto” nel 1880 per indicare la materia vivente presente all'interno della membrana cellulare.

In un primo momento, l'isolamento dei protoplasti dai tessuti vegetali fu tentato attraverso metodi meccanici (Klercker, 1892), che portavano però ad una produzione molto bassa.

Nel 1960 Cocking tentò l'isolamento dei protoplasti mediante l'uso di enzimi. Egli isolò l'enzima *cellulase* da una coltura del fungo *Myrothecium verrucaria* e ne utilizzò un estratto per l'isolamento dei protoplasti da apici radicali di pomodoro. A partire da quel momento, molte formulazioni enzimatiche sono state testate per l'isolamento dei protoplasti e, via via, rese disponibili in commercio. L'uso di metodi enzimatici per la degradazione della parete cellulare vegetale è stato infatti ben presto individuato come il sistema più efficace.

Takebe (1968) fu il primo ad utilizzare una preparazione enzimatica commerciale per l'isolamento dei protoplasti.

4.2 La digestione enzimatica della parete cellulare

Il rilascio dei protoplasti è notevolmente influenzato dalla natura e dalla composizione degli enzimi utilizzati per la digestione della parete cellulare (Chawla, 2002).

La parete cellulare vegetale è costituita da tre componenti primarie, la cellulosa, l'emicellulosa e le pectine. La cellulosa e l'emicellulosa sono, in particolare, i costituenti principali delle strutture primaria e secondaria della parete cellulare, mentre le pectine costituiscono la lamella mediana che unisce le cellule (Chawla, 2002).

L'enzima *Cellulase* (Onozuka), ottenuto da *Trichoderma viride*, è utilizzato comunemente per la “digestione” delle componenti della parete.

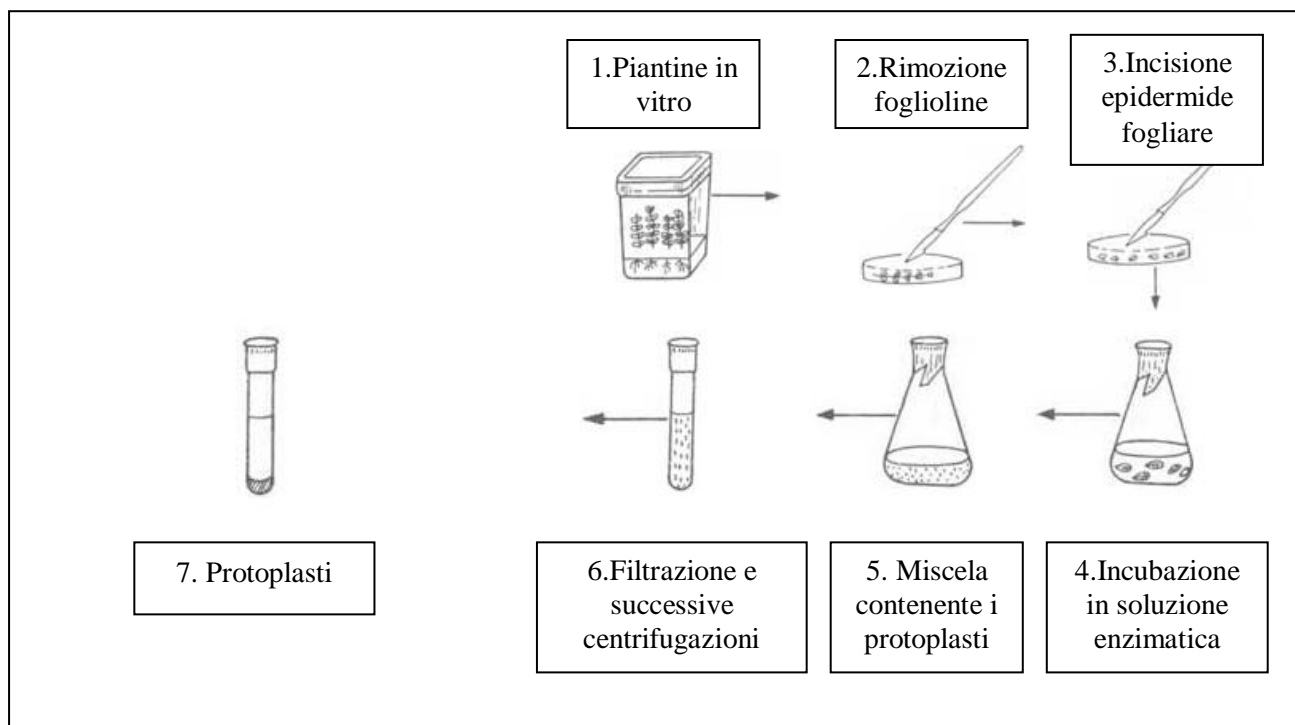
Tra le pectinasi, invece, gli enzimi maggiormente utilizzati sono *Macerozyme*, ottenuto da *Rhizopus* sp., dotato di una potente attività pectinolitica e emicellulosolitica, e *Pectolyase Y 23*, ottenuto da *Aspergillus Japonicus*.

Altri enzimi come *Driselase* e *Cellulisina*, dotati di attività cellulolitica e pectinolitica, sono previsti in bibliografia come componenti della soluzione enzimatica impiegata per l'isolamento dei protoplasti di piretro (Keskitalo et al., 1999).

L'attività enzimatica della soluzione utilizzata per l'isolamento dei protoplasti è notevolmente influenzata dal pH, che, in genere, oscilla tra 4.7 e 6.0. Durante il trattamento enzimatico, inoltre, è necessario l'impiego di un agente osmotico, in grado di creare un equilibrio tra la soluzione e le cellule; la pressione meccanica esercitata dalla parete cellulare deve, infatti, essere adeguatamente compensata da un'appropriata pressione osmotica, al fine di evitare la rottura (scoppio) dei protoplasti. Gli agenti osmotici più comunemente impiegati sono il sorbitolo e soprattutto il mannitolo, considerato inerte da un punto di vista metabolico (penetra lentamente nel protoplasto).

Alla fine del trattamento enzimatico, la miscela ottenuta contiene detriti cellulari, cellule non “digerite, protoplasti “rotti” e protoplasti “vitali”. Questa miscela è purificata mediante una combinazione di filtrazioni, centrifugazioni e lavaggi (Figura 5).

Figura 5. Illustrazione schematica delle fasi principali dell’isolamento di protoplasti da mesofillo fogliare di piantine allevate in vitro mediante “digestione” enzimatica della parete.



4.3 Fattori che influenzano l’isolamento dei protoplasti

Uno dei più importanti pre-requisiti per l’isolamento dei protoplasti è, innanzitutto, che i tessuti utilizzati siano “donatori” adatti (Lindsay and Ledger, 1993).

I protoplasti vengono estratti da diversi tessuti ed organi vegetali (foglie, piccioli, apici vegetativi, radici, frutti, coleoptili, ipocotili, embrioni, microspore, callo) di un grande numero di specie (Chawla, 2002).

Nell’ambito di questa ampia gamma di potenziali tessuti donatori di protoplasti, quello maggiormente utilizzato è il mesofillo di foglie pienamente espanse, prelevate da giovani piante o comunque da nuovi germogli. Il tessuto fogliare consente infatti l’isolamento di molte cellule relativamente uniformi, senza la necessità di uccidere la pianta.

L’isolamento dei protoplasti è, teoricamente, un processo semplice, che può tuttavia presentare numerose problematiche pratiche, soprattutto quando tale tecnica è applicata a piante poco studiate (Keskitalo, 1999).

Il successo dell’applicazione delle tecniche di isolamento dei protoplasti, sia in termini di numero di protoplasti isolati che di sopravvivenza degli stessi, dipende da una molteplicità di fattori.

In primo luogo, la produzione e la vitalità dei protoplasti sono notevolmente influenzate dalle condizioni fisiologiche dei tessuti utilizzati come donatori, per cui è necessario, per una buona

riuscita del processo di isolamento, che le piante (o i tessuti) crescano sotto condizioni controllate (Chawla, 2002).

Il rilascio dei protoplasti è inoltre notevolmente influenzato dal potenziale osmotico e dalla composizione della soluzione enzimatica (Pan et al 2003; Chawla, 2002).

La produzione di protoplasti è infine collegata alla stagione in cui si procede all'isolamento. In particolare, i protoplasti di piretro e tanaceto, secondo quanto emerso da una ricerca condotta in Finlandia, sono isolati con maggiore successo nel periodo compreso tra dicembre ed aprile. (Keskitalo, 2001), probabilmente a causa del mantenimento, in vitro, della "memoria" del ciclo fisiologico naturale della pianta ("seasonal clock"). Altri ricercatori, tuttavia, non hanno osservato variazioni di tipo stagionale.

L'isolamento e la successiva fusione di protoplasti di piretro e tanaceto (*Tanacetum vulgare* L.) sono stati studiati da alcuni ricercatori finlandesi (Keskitalo et al., 1995; Keskitalo et al., 1999; Keskitalo, 1999; Keskitalo, 2001), con l'obiettivo di combinare la resistenza al freddo del tanaceto con le proprietà insetticide del piretro.

II - OBIETTIVI DELLA RICERCA

Nel corso del triennio del dottorato di ricerca, le attività svolte hanno avuto come obiettivo generale quello della valorizzazione del piretro (*Chrysanthemum cinerariaefolium* L.). La specie, dotata di notevoli potenzialità agro-industriali, presenta infatti ampie possibilità d'introduzione negli ordinamenti colturali degli ambienti mediterranei, a patto di affrontare e risolvere alcune problematiche legate, tra l'altro, alla scarsa disponibilità di piante dotate di buone caratteristiche produttive e qualitative. A questo scopo, scegliendo un approccio di tipo biotecnologico, si è in primo luogo tentato di valutare la risposta della specie, considerata "ricalcitante", alle condizioni di coltura in vitro, nei suoi svariati aspetti.

Nell'ambito di questo programma generale, le **prove di coltura in vitro** hanno riguardato:

- l'introduzione in vitro di espianti provenienti da piante allevate all'esterno;
- la formazione di callo embriogenico;
- l'ottimizzazione delle condizioni di germinazione di semi di piretro, al fine di ottenere velocemente piantine in vitro, da impiegare per le prove di moltiplicazione e trasferimento e come fonti di tessuti donatori per l'isolamento dei protoplasti;
- la moltiplicazione in vitro della specie;
- la valutazione della risposta all'acclimatamento ex vitro sia delle piantine da seme che da talea.

L'attività di ricerca ha previsto, inoltre, la messa a punto di un'adeguata tecnica di **isolamento di protoplasti di piretro**, per un programma di miglioramento genetico mediante ibridazione somatica.

L'attività di ricerca, per gli aspetti biotecnologici, è stata condotta interamente presso i laboratori di micropropagazione e biotecnologie dell'Istituto di Genetica Vegetale del Consiglio Nazionale delle Ricerche - UOS (Unità Operativa di Supporto) di Palermo.

Ad ulteriore conferma delle ampie possibilità di applicazione del piretro, nel corso dell'ultimo anno del dottorato di ricerca, è stata condotta una **prova su acari**, in modo da testare l'effetto acaricida di estratti di piretro a diversa concentrazione.

Allo scopo di valutare l'adattabilità della Composita agli ambienti mediterranei, sono stati eseguiti, infine, dei rilievi sulle caratteristiche vegetative e produttive di una coltura di piretro allestita in un'area rappresentativa dell'entroterra siciliano.

III - PROVE DI COLTURA *IN VITRO*

1 INTRODUZIONE *IN VITRO*

1.1 Materiali e metodi

Gli espianti utilizzati per le prove di introduzione *in vitro* sono stati prelevati da piante provenienti da un campo di piretro (*Chrysanthemum cinerariaefolium* L.) impiantato nel marzo 2005 presso l'azienda sperimentale "Sparacia" (Cammarata – AG, 37° 38' N - 13° 46' E; 415 m s.l.m) e trapiantate, all'inizio del 2008, presso l'Istituto di Genetica Vegetale del CNR, UOS di Palermo.

Le caratteristiche agronomiche delle piante in pieno campo sono state valutate nell'ambito di una precedente ricerca (Carrubba et al., 2006) (cfr cap. VI).

Per le prove di coltura *in vitro*, sono stati utilizzati due diversi tipi di espianti: foglie e porzioni di stelo binodali.

La metodologia per la disinfezione degli espianti da porre *in vitro* ha subito, nel corso della sperimentazione, un graduale aggiustamento, sulla base dei risultati ottenuti sia in termini di numero di contaminazioni che di imbrunimento dei tessuti (Tabella 4).

Il materiale vegetale disinfettato è stato posto su mezzo MS (Murashige e Skoog, 1962), con 30 g/l di saccarosio e 8 g/l di agar (per la gelificazione). Prima della sterilizzazione del mezzo in autoclave (20 min., 120° C), il pH è stato aggiustato a 5.7.

Tabella 4. Protocolli utilizzati per la disinfezione degli espianti posti in coltura *in vitro*

Steps	I	II	III	IV	V	VI
1°	Lavaggio con acqua	Lavaggio con acqua e sapone (Tween 20)	Lavaggio con acqua e sapone (Tween 20)	Lavaggio con acqua e sapone (Tween 20)	Lavaggio con acqua e sapone (Tween 20)	Lavaggio con acqua e sapone (Tween 20)
2°	Soluzione di etanolo al 75% per 3 min.	HCl 1mol/l per pochissimi sec.	Soluzione di etanolo al 75% per 3 min. + PVP 10 all'1%	Soluzione di etanolo al 75% per 40 sec.	Soluzione di etanolo al 75% per 40 sec.	Soluzione di etanolo al 75% per 40 sec.
3°	Soluzione di candeggina comm. al 15% per 15 min.	Soluzione di candeggina comm. al 15% per 20 min.	Soluzione di candeggina comm. al 20% per 25 min. + PVP 10 all'1%	Soluzione di candeggina comm. al 20% per 20 min. + PVP 10 all'1%	Soluzione di candeggina comm. al 20% per 15 min. + PVP 10 all'1%	Soluzione di candeggina comm. al 20% per 15 min. + PVP 10 al 2%
4°	3 risciacqui in acqua distillata sterile di 5 min. ciascuno sotto cappa a flusso laminare					

1.2 Risultati e discussione

I primi tentativi di introdurre *in vitro* il piretro sono stati piuttosto difficoltosi, a causa dell'elevato numero di contaminazioni riscontrate su entrambi i tipi di espianti e del marcato imbrunimento dei tessuti, soprattutto delle porzioni di stelo.

Attraverso una serie di successive modifiche (tempi e soluzioni) apportate al protocollo di disinfezione degli espianti (Tabella 4), si è giunti ad una buona metodologia, che consente di ottenere una sensibile riduzione delle contaminazioni e, nel complesso, un miglioramento del materiale *in vitro*. In particolare, l'imbrunimento dei tessuti si è notevolmente ridotto grazie all'impiego, a partire dal terzo protocollo, del PVP (polyvinyl pyrrolidone; Housti et al. 1992), la cui concentrazione è stata portata, nell'ultimo protocollo, al 2%, allo scopo di ottimizzare i risultati ottenuti.

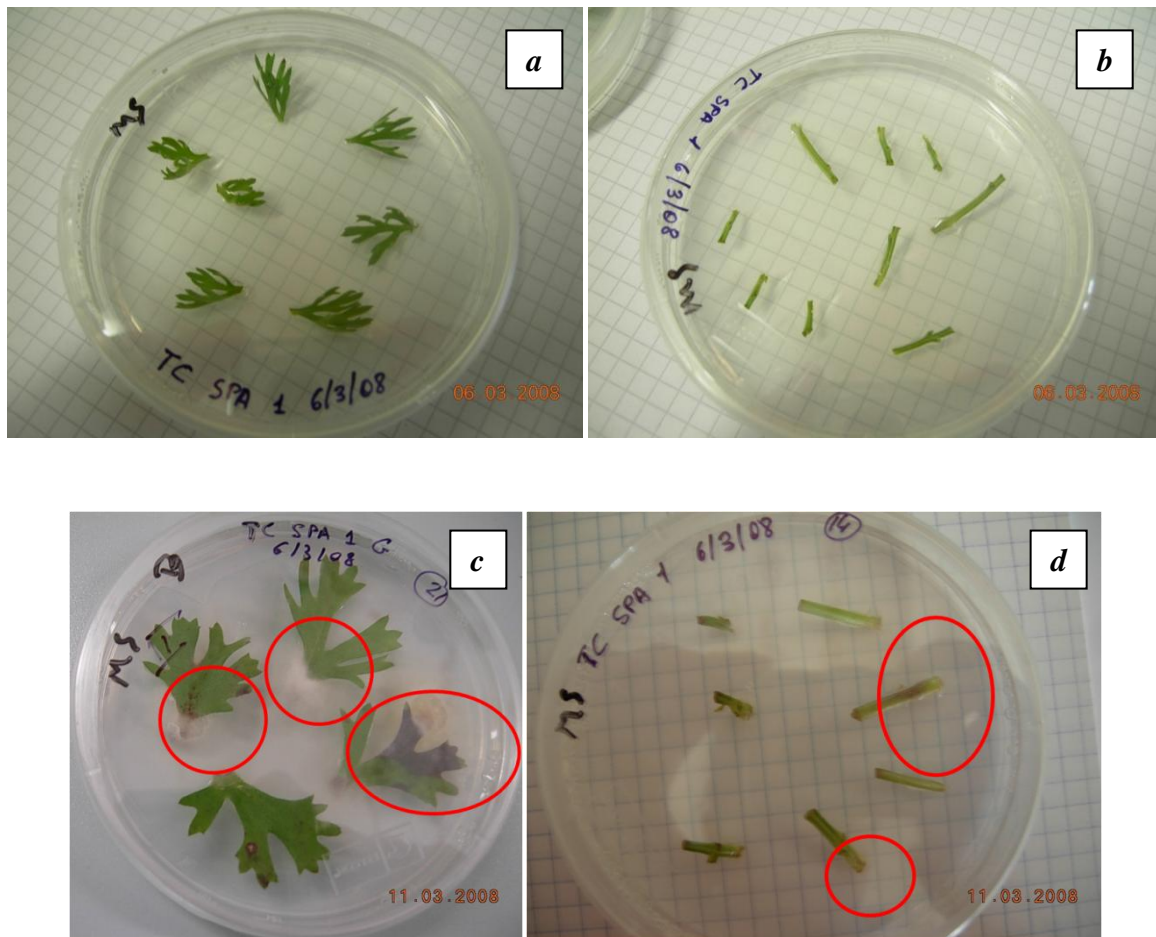


Figura 6. Introduzione *in vitro* del piretro, foglie (a) e porzioni di stelo (b) all'inizio della coltura; contaminazioni sviluppatesi dopo 5 giorni di coltura *in vitro* su foglie (c) e porzioni di stelo (d).

2 PROVE DI GERMINAZIONE

2.1 Materiali e metodi

Le prove di germinazione sono state condotte a partire da semi maturi raccolti, nella primavera del 2008, dal campo dell'azienda sperimentale "Sparacia".

Allo scopo di stimolare il processo germinativo, i semi sono stati sottoposti a vernalizzazione (moist pre-chilling) a 4° C, distinguendo in base alla durata dell'esposizione al freddo due gruppi rispettivamente di 4 e 8 giorni (Haque et al., 2006). Trascorso tale periodo, i semi sono stati sottoposti ad un processo di sterilizzazione, consistente nell'immersione in una soluzione di candeggina commerciale al 15% per 10 min., seguita da 3 risciacqui di 5 min. ciascuno con acqua distillata sterile, sotto cappa a flusso laminare.

I semi sono stati quindi posti a germinare su mezzo MS (Murashige e Skoog, 1962) contenente vitamine, 30 g/l di saccarosio e 8 g/l di agar, pH 5,7 (MS 30; "mezzo base").

Le capsule contenenti i semi (15 semi per piastra) sono state trasferite in armadi termostatici ad una temperatura di circa 15°C, con 16 ore di luce al giorno ad un'intensità di 30 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Le plantule ottenute, appena possibile, sono state trasferite, in condizioni di sterilità, all'interno di scatole Magenta, contenenti circa 60 ml di mezzo MS 30 e sottoposte a sub-culture periodiche allo scopo di rinnovare il mezzo di coltura e, conseguentemente, di mantenere i tessuti vegetali giovani.

2.2 Risultati e discussione

Il processo di germinazione ha avuto inizio dopo 8-10 giorni dalla messa a dimora dei semi. Le piantine hanno assunto un aspetto vigoroso sin dalle prime fasi di sviluppo, in particolare quelle provenienti dai semi sottoposti a pre-chilling di 8 giorni.

La percentuale di germinazione è risultata del 32% nel caso del pre-chilling di 4 giorni e del 39% nel caso del pre-chilling di 8 giorni.

L'adozione della tecnica della vernalizzazione e le condizioni di germinazione stabilite hanno consentito di avere a disposizione una buona quantità di piantine in vitro da impiegare per le prove di moltiplicazione e trasferimento e come fonti di tessuti donatori per l'isolamento dei protoplasti.

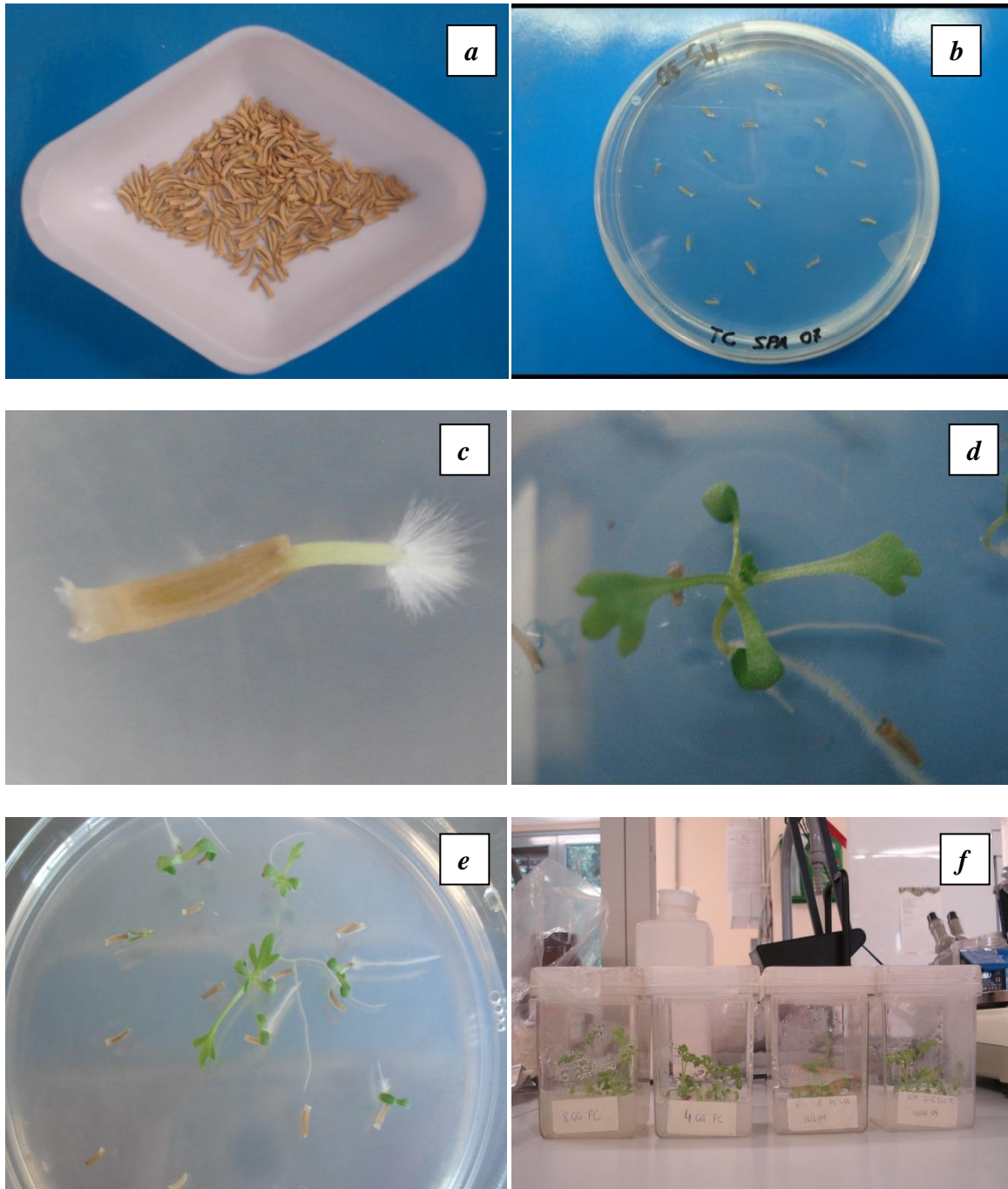


Figura 7. Prove di germinazione nel piretro, (a) semi di piretro; (b) semi posti a germinare; (c) germinazione (sviluppo radichetta); (d) plantula di piretro; (e) plantule prima del trasferimento in scatole Magenta; (f) piantine provenienti da seme in scatole “Magenta”.

3 Prove di moltiplicazione

3.1 Materiali e metodi

Le plantule ottenute *in vitro* sono state utilizzate per la preparazione di talee da porre a radicare, in scatole Magenta, su mezzo MS 30, senza l'impiego di fitoregolatori di crescita. La fase di moltiplicazione è stata condotta in armadi termostatici ad una temperatura di 22°C, con 16 ore di luce al giorno ad un'intensità di 30 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

La crescita delle radici e lo sviluppo della parte vegetativa delle piantine sono state valutati e registrati dopo 30 giorni dal posizionamento delle talee.

Lo sviluppo della porzione aerea è stato valutato mediante il "tasso di crescita dei germogli" (growth rate of shoots, Liu et al., 2007): (peso del materiale raccolto – peso del materiale di partenza)/peso del materiale di partenza (g g^{-1}).

L'accrescimento radicale è stato valutato in termini di lunghezza, peso e numero delle radici sviluppatasi.

Sono state effettuate, inoltre, osservazioni di tipo empirico sulle caratteristiche generali delle piantine, in termini di vigore vegetativo e di configurazione dei germogli e delle foglie.

3.2 Risultati e discussione

La formazione delle radici ha avuto inizio, nelle prove di moltiplicazione effettuate, dopo circa 3-4 giorni dal posizionamento delle talee, per raggiungere una percentuale del 100% di talee radicate dopo 8-10 giorni dall'inizio della prova. La misura dell'accrescimento delle piantine, valutato in termini di tasso di crescita dei germogli (Tabella 5), ha fatto rilevare dati particolarmente interessanti, dal momento che, in un periodo di 30 giorni, stabilito come riferimento, il peso fresco della porzione vegetativa ha avuto un incremento percentuale del 95%.

I dati relativi all'accrescimento delle radici, anch'esso valutato dopo 30 giorni dall'inizio della coltura, sono riepilogati in Tabella 6. In molti casi è stato possibile registrare la formazione di un elevato numero di radici (fino a 11 ramificazioni). L'apparato radicale sviluppatosi mostrava un accrescimento uniforme e tendeva, già dopo pochi giorni dal posizionamento della talea, ad assumere un aspetto vigoroso. Le piantine radicate si presentavano pronte per il trasferimento *ex vitro* dopo un periodo compreso tra 30 e 45 giorni.

Tabella 5. Tasso di crescita dei germogli (growth rate of shoots, Liu et al., 2007). Media \pm deviazione standard.

Peso fresco (g)	Peso fresco dopo 30 gg di coltura (g)*	Growth rate of shoots
0,16 \pm 0,09	0,31 \pm 0,09	1,23 \pm 0,73

* è stata pesata solo la parte vegetativa

Tabella 6. Numero e dimensioni delle radici dopo 30 gg dal posizionamento delle talee. Media \pm deviazione standard.

Peso radici (g)	N° radici*	Lunghezza (cm)
0,06 \pm 0,03	7 \pm 2	6,35 \pm 1,38

*sono state contate tutte le ramificazioni



Figura 8. Prove di moltiplicazione in vitro del piretro, (a) misurazione del peso della talea; (b) e (c) talee poste a radicare; (d) sviluppo dell'apparato radicale.

4 Prove di acclimatemento *ex vitro*

4.1 Materiali e metodi

Le prove di trapianto sono state predisposte nei mesi di aprile, maggio e giugno 2010, allo scopo di valutare eventuali differenze durante l'acclimatemento *ex vitro* al variare delle condizioni climatiche. Tali prove hanno riguardato differenti tipologie di piantine: quelle provenienti direttamente da seme e quelle ottenute per talea.

Le piantine sono state trapiantate in vasetti di plastica (7x7x10 cm) contenenti torba e agriperlite.

Al momento del trapianto, è stato posizionato su ogni vasetto un sacchetto di polietilene trasparente, in modo da limitare la perdita d'acqua per traspirazione e da ridurre così lo stress dovuto al trasferimento; nel corso dell'acclimatemento, si è proceduto alla rimozione graduale del sacchetto.

Il numero delle piantine sopravvissute è stato registrato 10 giorni dopo il trapianto. Il loro sviluppo è stato valutato mediante la misurazione delle altezze con cadenza settimanale.

Le piante che hanno fornito i migliori risultati in termini di accrescimento raggiunto e di vigore vegetativo, sono state trasferite in pieno campo, in modo da valutare la risposta a tali condizioni. Le parcelle sperimentali sono state allestite presso l'azienda "Sparacia".

4.2 Risultati e discussione

In linea generale, le piantine che hanno fornito i migliori risultati durante la fase di acclimatemento *ex vitro* si sono rivelate quelle trapiantate nel mese di aprile, con un attecchimento del 60%. Infatti, nonostante l'iniziale consistente percentuale di fallanze registrate a carico delle piantine provenienti da seme, nel complesso non sono emersi particolari segnali di stress. Numerose piantine (circa il 75%) tra quelle trapiantate nel mese di maggio, invece, nonostante l'iniziale adattamento alle condizioni *ex vitro*, hanno mostrato, nel corso della prova, evidenti segni di sofferenza seguiti, nella maggior parte dei casi, da deperimento e morte. I trapianti del mese di giugno, riguardanti solo piantine provenienti da talea, hanno invece fatto registrare un attecchimento del 45,5 %.

Le piantine provenienti da talea presentavano, al momento del trapianto, un'altezza mediamente maggiore, pari a circa 7 cm, rispetto a quelle da seme (6 cm). Anche in seguito, le piantine da talea sono state caratterizzate da un interessante accrescimento in altezza, che ha raggiunto valori medi superiori a 25 cm; le piantine provenienti da seme, invece, hanno mantenuto altezze medie inferiori, pari a circa 23 cm all'inizio del mese di settembre (Fig. 9).

In corrispondenza della stagione calda si è registrato un arresto dell'accrescimento in altezza, dovuto, probabilmente, oltre che alle elevate temperature, all'inizio della fase di riposo vegetativo che caratterizza il ciclo della pianta.

Fig. 9. - Andamento delle altezze nel corso dell'acclimatamento *ex-vitro*.

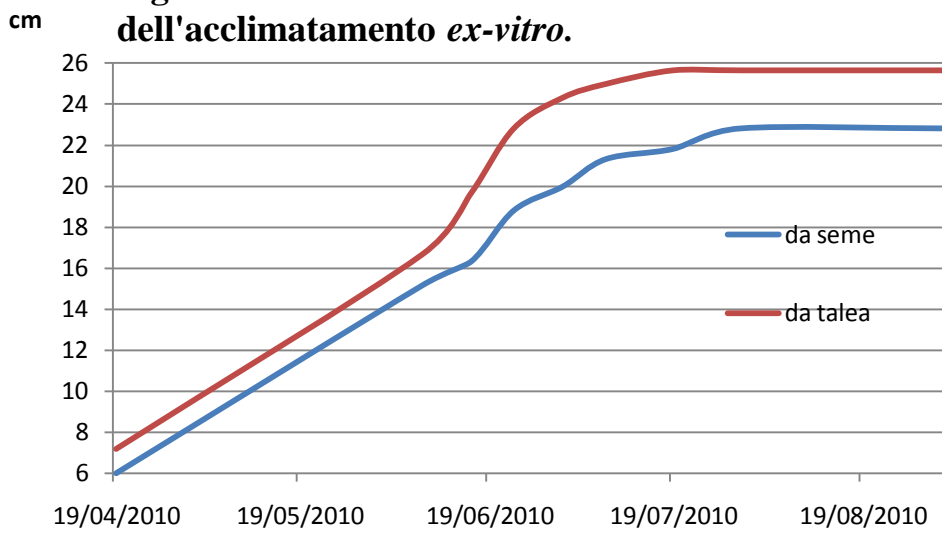






Figura 10. Fasi dell'acclimatamento *ex vitro* dal trasferimento in vasetto fino al trapianto in pieno campo.

5 Formazione di callo embriogenico

5.1 Materiali e metodi

Gli espianti utilizzati sono stati porzioni di stelo binodali e di foglie provenienti, in un primo momento, da piante allevate in vaso (sterilizzati secondo il protocollo messo a punto per l'introduzione *in vitro*) e, successivamente, da piantine ottenute *in vitro* (da seme o per talea).

Per la formazione del callo embriogenico, al mezzo base Murashige e Skoog (1962) (MS), contenente il 3% di saccarosio e lo 0,8% di agar, sono stati aggiunti due fitoregolatori di crescita, un'auxina, il β -naphthoxy acetic acid (ANA) (Sigma), alla concentrazione di 4 ppm, e una citochinina, il 6-benzyl aminopurine (BAP) (Sigma), in concentrazioni diverse (0, 0.4, 2 e 4 ppm).

Il mezzo di coltura, il cui pH è stato aggiustato a 5.8 con 0,1 M di NaOH, è stato sottoposto a sterilizzazione in autoclave a 120°C per 20 minuti.

Dopo il posizionamento degli espianti, le capsule Petri, sigillate con parafilm, sono state trasferite in armadi di crescita ad una temperatura di 22° C, con 16 ore di luce al giorno ed un'intensità di 30 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Dopo 40 giorni, gli espianti, insieme alle formazioni di callo nel frattempo sviluppatesi, sono stati trasferiti su mezzo fresco. Successivamente, ad intervalli regolari di circa 40 giorni, il trasferimento su mezzo fresco è stato effettuato separando il callo dall'espianto di partenza (Figura 11).

5.2 Risultati e discussione

La formazione di callo (callogenesi) è stata osservata, sui diversi tipi di espianti, dopo circa un mese dal posizionamento del materiale vegetale sul mezzo.

In particolare, la produzione, espressa in termini di percentuale di espianti che hanno sviluppato callo dopo un mese di coltura, è mostrata nella Tabella 7.

Tabella 7. Percentuale di espianti che hanno sviluppato callo dopo 1 mese di coltura sui differenti mezzi.

Fitoregolatori (ppm)		Espianti con callo (%)	Steli	Foglie
ANA	BAP			
4	0	0	0	0
4	0.4	40	14.5	25.5
4	2	94	34	60
4	4	5	0	5

La combinazione di un'auxina e una citochinina nel mezzo di coltura ha dato buoni risultati; non è stata osservata, infatti, formazione di callo nel mezzo privo di BAP.

La produzione di callo è stata maggiore con la concentrazione di 2 ppm di BAP (94%); risultati nettamente inferiori sono stati ottenuti con 0,4 ppm (40%) e soprattutto con 4 ppm (5%).

Tra le tipologie di espianti utilizzati, le sezioni di foglie hanno fornito i migliori risultati. Il callo sviluppatosi presentava, in tutte le combinazioni testate, un aspetto compatto ed un colore variabile dal biancastro al marrone, passando per tonalità giallastre, senza mai assumere il colore della clorofilla.

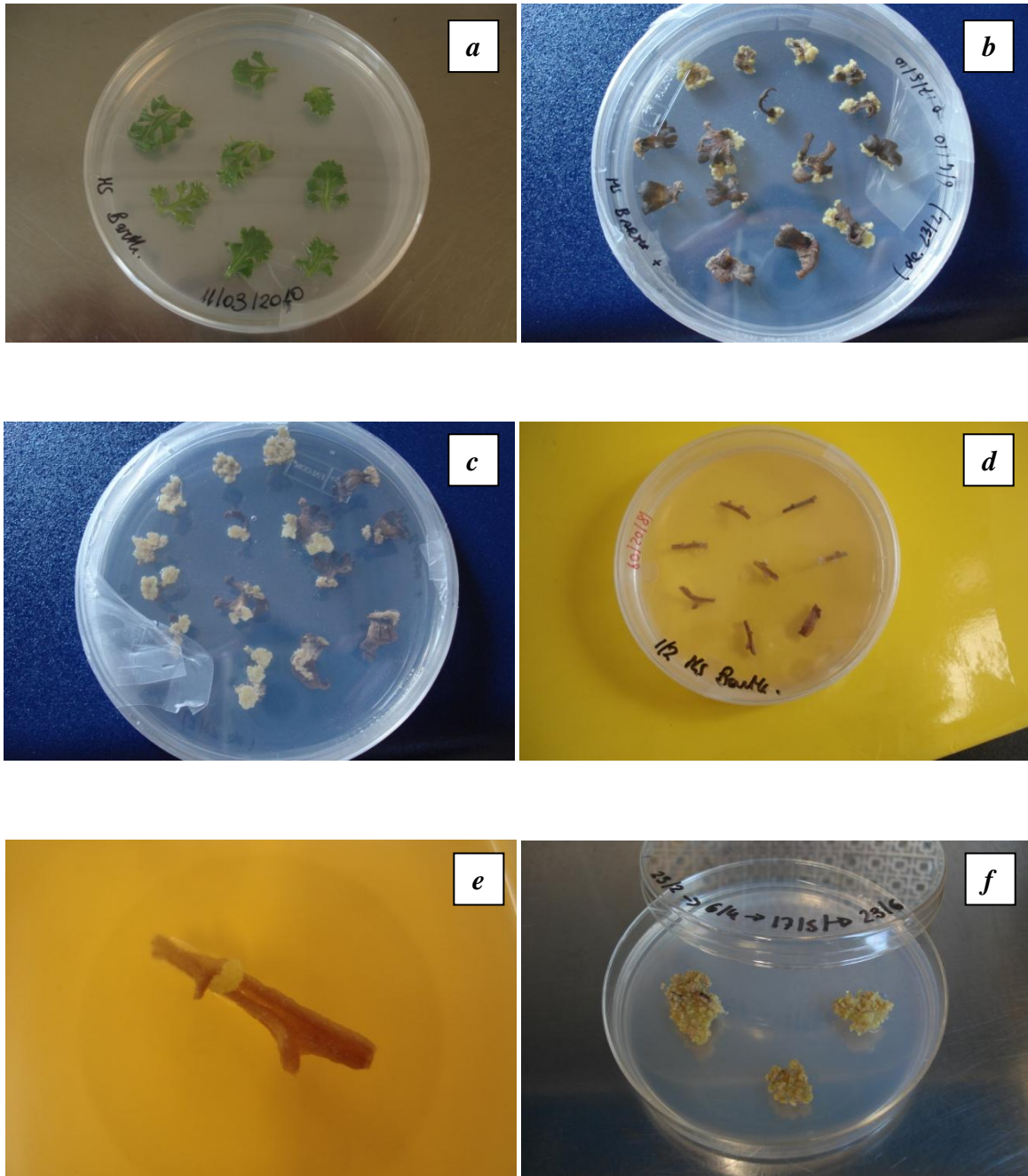


Figura 11. Formazione di callo nel piretro, (a) foglie all'inizio della coltura; (b) callo da foglie dopo 40 giorni di coltura (vista superiore); (c) callo da foglie dopo 40 giorni di coltura (vista inferiore); (d) porzioni di stelo all'inizio della coltura; (e) callo da stelo; (f) masse di callo.

IV - PROVE DI ISOLAMENTO DI PROTOPLASTI

1 Isolamento dei protoplasti

1.1 Materiali e metodi

Come materiale vegetale di partenza sono stati utilizzati semi maturi di piretro (*Chrysanthemum cinerariaefolium* L.) raccolti nella primavera del 2008 presso il campo sperimentale dell'azienda "Sparacia" (Cammarata – AG, 37° 38' N - 13° 46' E; 415 m s.l.m) del Dipartimento SAGA. La coltura *in vitro* è stata condotta secondo la metodologia illustrata nel capitolo dedicato alla micropropagazione.

Le prove di isolamento dei protoplasti di piretro (figura 12) sono state effettuate, a partire dal mese di marzo del 2009, utilizzando come tessuti donatori foglie di piantine allevate *in vitro*, provenienti direttamente da seme o ottenute mediante il processo di moltiplicazione.

Allo scopo di ottimizzare le condizioni di isolamento dei protoplasti, sulle foglioline prelevate (circa 0,5 g) sono state effettuate delle incisioni a circa 1 mm di distanza l'una dall'altra, rispettando le nervature delle foglie. Sono state testate due diverse soluzioni enzimatiche, denominate rispettivamente 1 e 2 (Tabella 8), contenenti la prima 0.125% (w/v) di Macerozyme R-10, 0.25% (w/v) di Cellulase (Onozuka), 0.25% (w/v) di Cellulisina (Calbiochem), 0.125% (w/v) di Driselase e 0.02% (w/v) di Pectolyase Y23 in 0.5 M di saccarosio e 5.0 mM di CaCl₂ (pH 5.6-5.7) (Keskitalo, 1999) e la seconda 1% di RS Cellulase (Onozuka), 1% di Macerozyme e 0.2% di Pectolyase Y23 in 0.7 M di Mannitolo, 12.0 mM di CaCl₂, 6.0 mM di MES (buffer), 1.4 mM di NaH₂PO₄ (pH 5.6) (Grosser et al., 1987).

Tabella 8. Soluzioni enzimatiche impiegate per l'isolamento dei protoplasti.

	Soluzione 1 (Keskitalo, 1999)	Soluzione 2 (Grosser et al., 1987)
Macerozyme R-10	0.125 % (w/v)	1 % (w/v)
Cellulase (Onozuka)	0.25 % (w/v)	1 % (w/v)
Cellulisina (Calbiochem)	0.25 % (w/v)	
Driselase	0.125 % (w/v)	
Pectolyase Y23	0.02 % (w/v)	0.2 % (w/v)
Saccarosio	0.5 M	
Mannitolo		0.7 M
MES (buffer)		6.0 mM
NaH ₂ PO ₄		1.4 mM
CaCl ₂	5.0 mM	12.0 mM
pH	5.6-5.7	5.6

Prima di porre le foglioline nella soluzione enzimatica 1, è stata effettuata una preplasmolisi di 1 ora in 10 ml di una soluzione denominata W5 (Keskitalo et al., 1995), composta da 154 mM di NaCl, 125 mM di CaCl₂, 5 mM di KCl e 5 mM di glucosio (pH 5.8-6.0) (Menczel et al., 1981). Al termine di tale trattamento, il materiale vegetale è stato posto in incubazione in 10 ml di soluzione enzimatica 1.

La soluzione enzimatica 2, alla dose di 1 ml, è stata posta direttamente a contatto con i tessuti donatori insieme a 3 ml di soluzione W5.

In entrambe le tesi, le prove sono state svolte distribuendo le foglie in due piastrine.

L'incubazione è stata condotta al buio per 18 h con la soluzione enzimatica 1 e per 4 ore con la soluzione enzimatica 2, in un rotary shaker ad una velocità di 50 rpm a temperatura ambiente. Allo scopo di verificare l'evoluzione dell'attacco enzimatico, si sono effettuate osservazioni al microscopio invertito (Nikon, Japan) dopo due, quattro ore e 6 ore (figure 13-16). Al termine del periodo di incubazione, il contenuto della piastrina (soluzione enzimatica e materiale vegetale) è stato filtrato mediante separatore cellulare (cell strainer) con pori di 40 μm per rimuovere le porzioni più grossolane dei tessuti non digeriti. Il filtrato ottenuto è stato quindi raccolto in un pellet mediante centrifugazione (Megafuge 1.0, Heraeus sepatech) ad una velocità di 72 x g (Keskitalo, 1995), per 7 minuti. Il pellet così ottenuto, contenente, insieme ai protoplasti vitali, anche detriti cellulari, cellule non "digerite" e protoplasti "rotti", è stato trattato in maniera diversa a seconda della soluzione enzimatica utilizzata. Il pellet ottenuto con la soluzione enzimatica 1 è stato risospeso con l'aggiunta di 3 ml di soluzione W5. Successivamente è stata effettuata un'altra centrifugazione ad una velocità di 41 x g per 6 min, per raccogliere i protoplasti in un secondo pellet. La soluzione enzimatica 2, invece, è stata rimossa e sono stati aggiunti molto delicatamente 3 ml di una soluzione di saccarosio al 25% con i quali il pellet è stato risospeso; sono stati quindi aggiunti 2 ml di una soluzione di mannitolo al 13% e si è effettuata una nuova centrifugazione ad una velocità di 72 x g per 5 min. Il diverso gradiente di concentrazione dei due zuccheri ha consentito il posizionamento dei protoplasti vitali (viable protoplasts) in un anello (band) collocato esattamente a livello dell'interfaccia tra i due zuccheri (figura 12). I protoplasti raccolti sono stati posti in coltura nella soluzione W5.

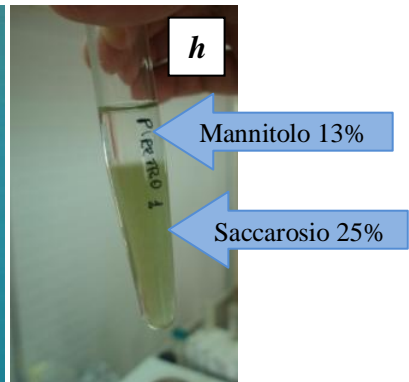
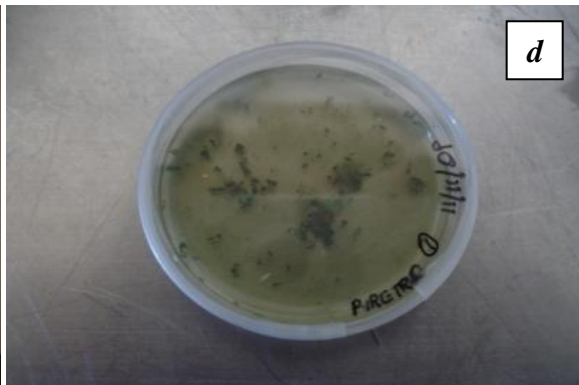
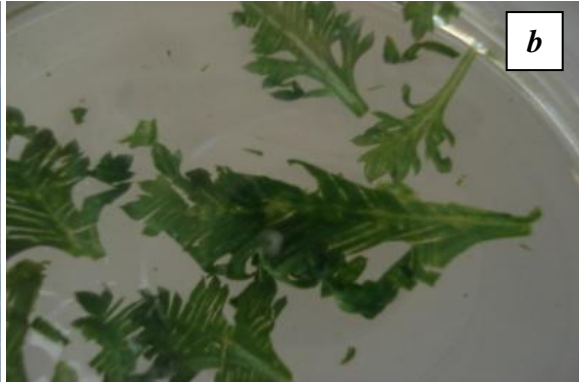
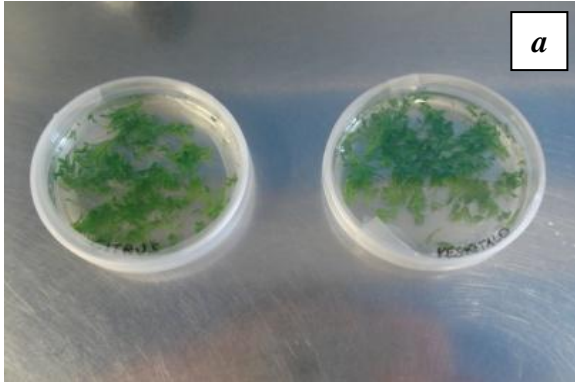




Figura 12. Prove di isolamento di protoplasti di piretro (materiali e metodi), (a) foglie in incubazione nelle due soluzioni enzimatiche; (b) particolare delle incisioni sulle foglie; (c) rotary shaker impiegato durante l'incubazione; (d) tessuti vegetali dopo la digestione enzimatica (4 ore di incubazione); (e) filtrazione mediante separatore cellulare (40 μm); (f) centrifuga; (g) pellet ottenuto con la centrifugazione; (h) soluzioni di saccarosio (25%) e mannitolo (13%); (i) anello di protoplasti; (j) particolare dell'anello.

1.2 Risultati e discussione

Sono stati effettuati 20 isolamenti con la soluzione enzimatica 1 e 60 isolamenti con la soluzione enzimatica 2, di cui, rispettivamente, 4 e 46 hanno consentito l'osservazione, dopo il periodo di incubazione, di un buon numero di protoplasti (tabella 10).

Tuttavia, dal momento che un processo di isolamento di protoplasti si considera "riuscito" ("successful"), quando i protoplasti sono liberati agevolmente, dopo il trattamento enzimatico, dai tessuti fogliari macerati (Keskitalo, 2001), nel complesso, la "riuscita" delle prove effettuate è stata modesta.

Le operazioni di filtrazione e successive centrifugazioni, infatti, hanno consentito solo in pochi casi di prelevare i protoplasti per la messa in coltura.

L'applicazione delle tecniche di isolamento dei protoplasti di piretro si è rivelata in tutta la sua complessità, a causa delle molteplici variabili in gioco (tipologia dei tessuti donatori, condizioni di coltura, potenziale osmotico e composizione soluzione enzimatica).

In linea generale, è stata osservata una migliore risposta dei tessuti provenienti da piantine più giovani, probabilmente a causa dell'accumulo di etilene che si verifica nelle piantine più vecchie (Maltinti, 2005).

Tabella 10. Isolamenti di protoplasti di piretro effettuati.

	Soluzione 1	Soluzione 2
Isolamenti effettuati (totale)	20	60
Isolamenti con una buona evoluzione dell'attacco enzimatico	4	46
%	20	76,6

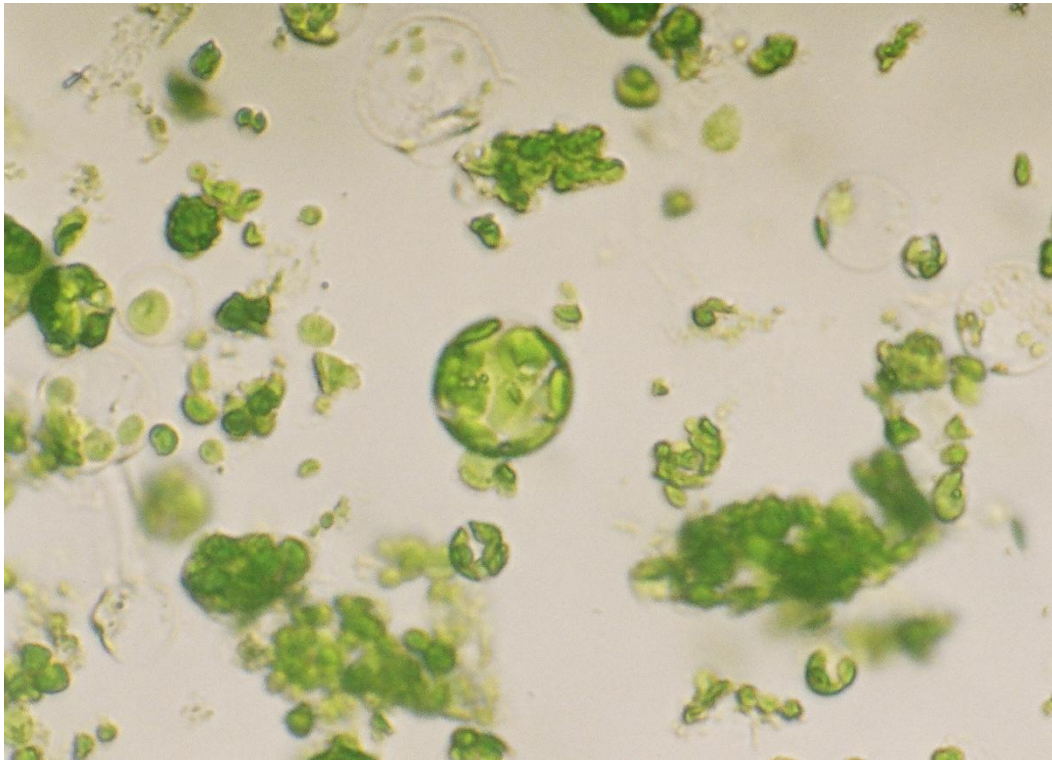


Figura 13. Protoplasti dopo due ore di incubazione (40X)

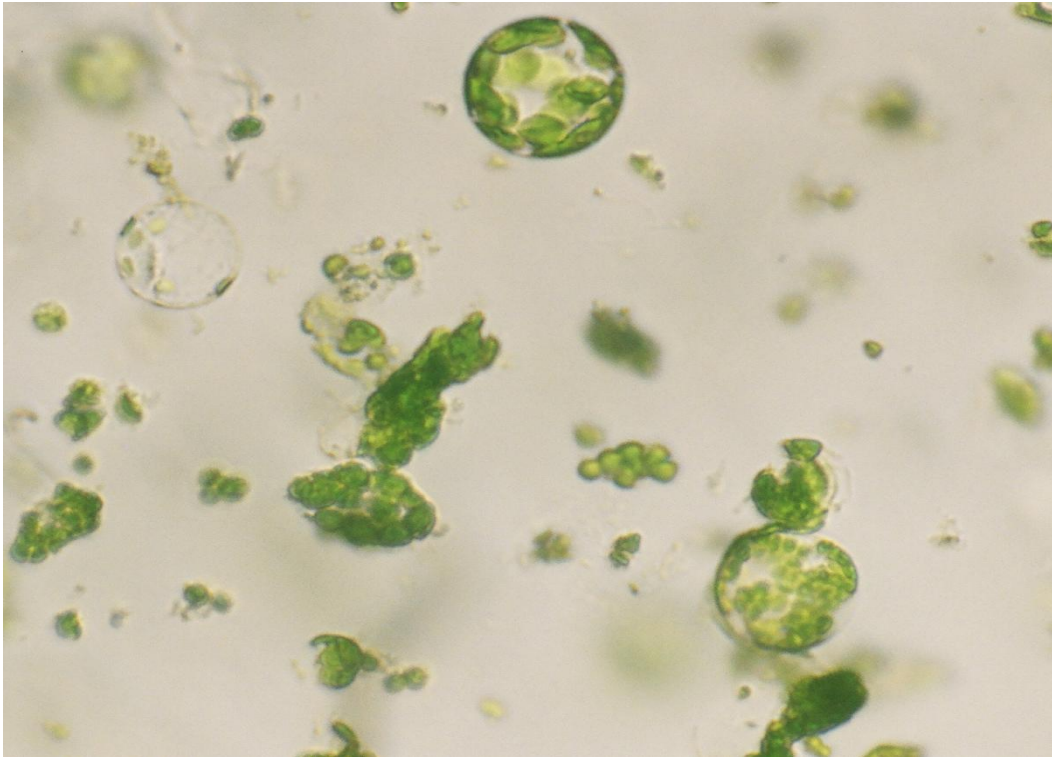


Figura 14. Protoplasti dopo quattro ore di incubazione (40X)

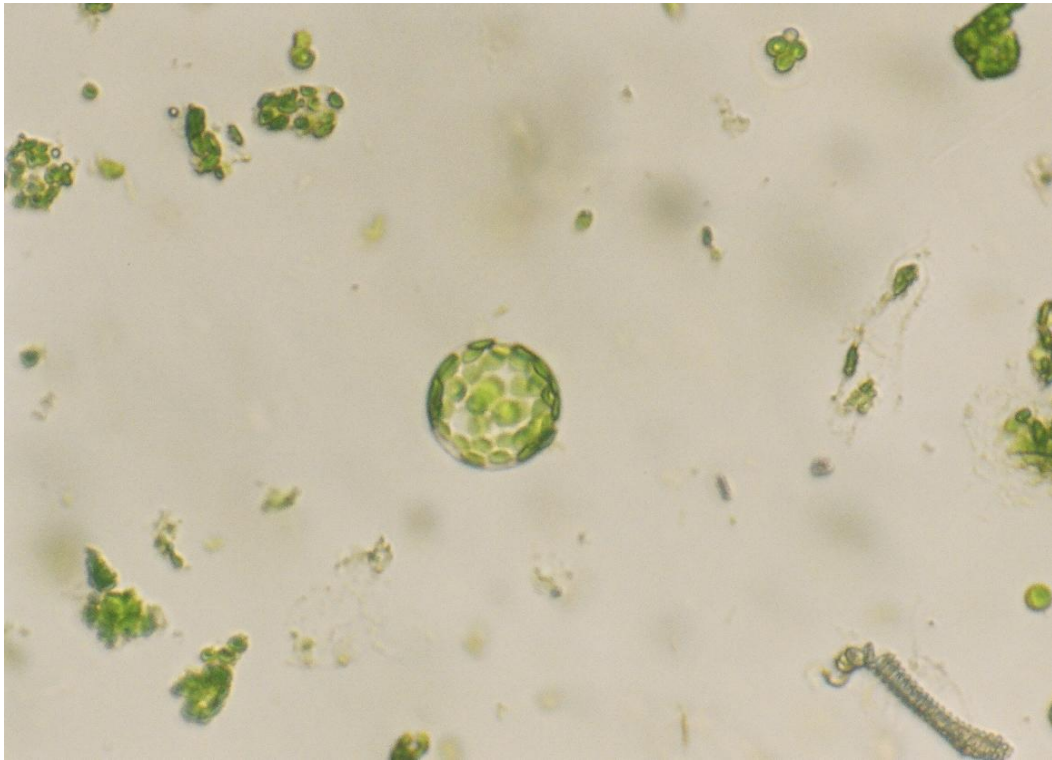


Figura 15. Protoplasti dopo 6 ore di incubazione (40X)

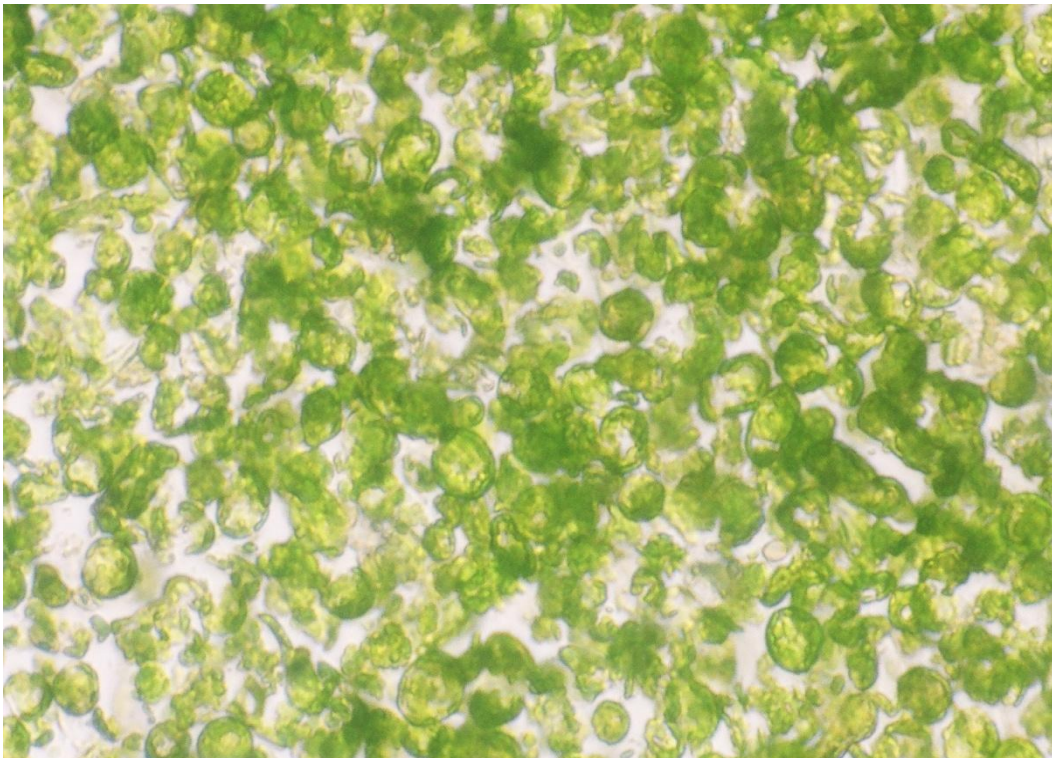


Figura 16. Protoplasti (10X)

V – EFFETTI DI ESTRATTI NATURALI DI PIRETRO SU *TETRANYCHUS URTICAE* KOCH (ACARIFORMES, TETRANYCHIDAE).

1 Materiali e metodi

1.1 Materiale vegetale

Le prove sono state condotte a partire da capolini di piretro (*Chrysanthemum cinerariaefolium* L.) raccolti nella primavera del 2008 da un campo impiantato nel marzo 2005 presso l'azienda sperimentale "Sparacia" (Cammarata – AG, 37° 38' N - 13° 46' E; 415 m s.l.m) del Dipartimento SAGA.

1.2 Estrazione di piretrine in esano

Per l'estrazione delle piretrine sono stati posti circa 100 g di acheni di piretro, puliti grossolanamente, in 1 l di esano, per la durata di circa 18 ore. L'estrazione è stata condotta con l'aiuto di un agitatore magnetico. Dopo l'evaporazione del solvente, l'estratto ottenuto è stato utilizzato per la preparazione di 3 soluzioni (acqua e acetone nel rapporto 1:1 in volume e SDS, sodio dodecilsolfato 1g per litro) a diversa concentrazione (1000, 2000 e 4000 ppm).

Prima del trattamento acaricida, le soluzioni a base di piretrine sono state filtrate su un tessuto non tessuto, allo scopo di eliminare le particelle grossolane rimaste in sospensione ed eventuali impurità.

1.3 Trattamento acaricida

Gli effetti degli estratti di piretro sono stati valutati su forme giovanili e su adulti di *Tetranychus urticae* Koch (Acariformes, Tetranychidae).

In particolare, per lo studio degli effetti sulle forme giovanili sono state predisposte 4 tesi sperimentali, corrispondenti alle 3 concentrazioni a disposizione ed al testimone, mentre sugli adulti è stata testata soltanto la concentrazione intermedia (2000 ppm). Ogni tesi sperimentale prevedeva 5 piastre (capsule Petri) dentro le quali sono stati posti acqua, cotone idrofilo ed una fogliolina di fagiolo (un dischetto di 2,8 cm di diametro) per l'allevamento degli acari (figura 17).

Per la prova sugli stadi giovanili, su ogni dischetto di foglia, sono state poste due femmine adulte di ragnetto rosso (*Tetranychus urticae* Koch.). Dopo 24 ore, durante le quali si è avuta l'ovideposizione, gli individui adulti sono stati allontanati. Dopo una settimana, è stato effettuato il trattamento acaricida sulle larve e le protoninfe sviluppatasi, preventivamente contate e distinte nelle forme mobili e immobili.

Per la prova sugli adulti, sulle porzioni di foglia, sono state poste 5 femmine adulte sulle quali è stato effettuato il trattamento.

L'allevamento è stato condotto in una camera di crescita con una temperatura di 24°C, una U.R. del 70% ed un fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 ore di buio.

Il trattamento è stato effettuato mediante la Torre di Potter (Potter, 1952), un apparecchio riconosciuto a livello internazionale come standard di riferimento per le tecniche di irrorazione di prodotti chimici in laboratorio (figura 17).

Dopo 24, 48, 72 ore e 7 giorni dal trattamento è stato effettuato il conteggio degli acari presenti sulle foglie, per valutare la mortalità. La mortalità delle femmine adulte è stata monitorata soltanto a 24 e 48 ore dal trattamento, dal momento che sono stati registrati valori del 100% al secondo rilievo effettuato.

Per “correggere” i dati sulla mortalità da eventuali cause non imputabili al trattamento effettuato, è stata utilizzata la formula di Abbott (Abbott, 1925), che tiene conto della mortalità riscontrata nel testimone.

I dati relativi alla “mortalità corretta” sono stati sottoposti ad analisi statistica, mediante il software “Statistica” (StatSoft Inc., 2003).

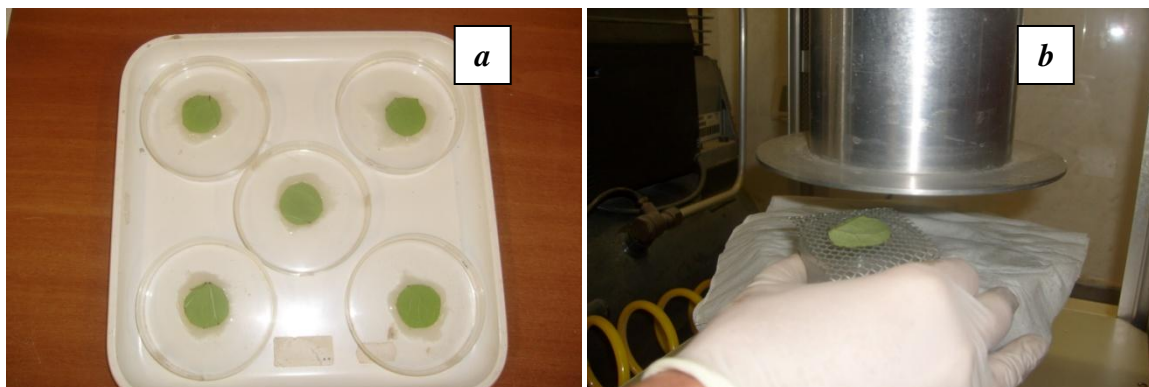


Figura 17. Prova su acari, (a) acari su foglie di fagiolo prima del trattamento; (b) trattamento acaricida (torre di Potter).

2 Risultati e discussione

Le figure 18 e 19 riportano i dati relativi agli effetti degli estratti impiegati.

Nel dettaglio, la figura 18 illustra la mortalità “corretta” di stadi giovanili di *T. urticae* trattati con tre diverse concentrazioni (1000, 2000 e 4000 ppm) di estratto naturale di piretro e la relativa analisi della varianza. Tutti i rilievi, effettuati dopo 24, 48, 72 ore e 7 giorni, hanno fatto emergere una differenza statisticamente significativa tra il testimone e le altre tesi a confronto, delineando chiaramente l’efficacia dei trattamenti effettuati. Per ogni rilievo, tra le diverse concentrazioni, invece, non emergono differenze significative fino a 72 ore dal momento del trattamento; dopo 7 giorni, la concentrazione più alta (4000 ppm) ha fatto registrare una mortalità significativamente maggiore, pari al 100%. In valore assoluto, dalla prima all’ultima osservazione, la mortalità è cresciuta progressivamente.

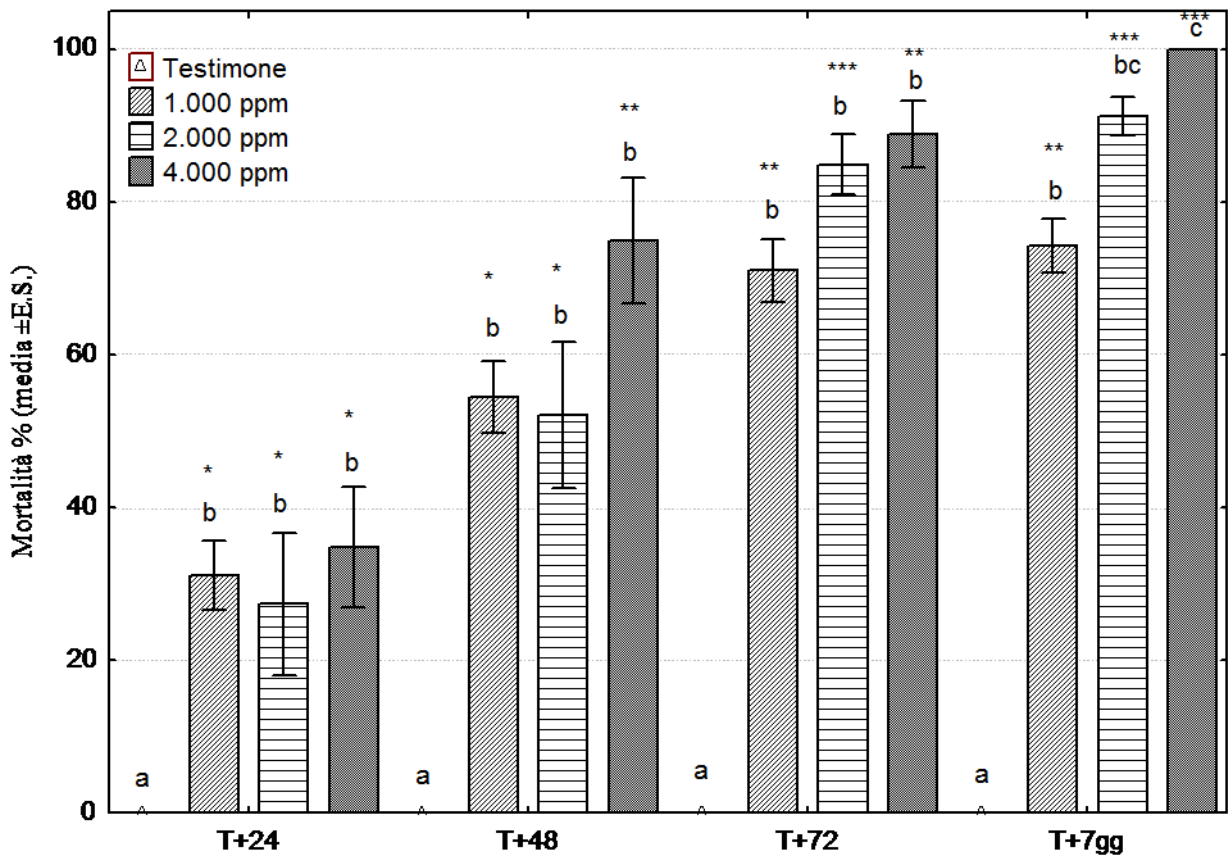
I primi due livelli di concentrazione, corrispondenti a 1000 e 2000 ppm, hanno determinato una mortalità statisticamente diversa nei primi due rilievi (24 e 48 ore) rispetto agli altri (72 ore e 7 giorni). La concentrazione più alta ha fatto registrare, dopo 24 ore dal trattamento, una mortalità statisticamente diversa da quelle rilevate dopo 48 e 72 ore, a loro volta differenti dalla mortalità dopo 7 giorni.

La figura 19 illustra la mortalità “corretta” di femmine adulte di *T. urticae* trattate con estratto di piretro alla concentrazione di 2000 ppm. Anche in questo caso, la mortalità registrata nel testimone si è differenziata in maniera statisticamente significativa da quella rilevata nella tesi sottoposta al trattamento. In particolare, la mortalità ha assunto valori elevati già dopo le prime 24 ore dal trattamento (più dell’80%), per arrivare, nelle 24 ore successive, al 100%.

Nel complesso, gli estratti naturali di piretro utilizzati su *Tetranychus urticae* Koch. hanno consentito di registrare dei risultati soddisfacenti, suggerendo, tra l’altro, l’opportunità di studiare, oltre ai dati relativi alla mortalità degli acari ai vari stadi di sviluppo, anche l’effetto dei diversi trattamenti sull’accrescimento della popolazione, valutato in base all’ovideposizione registrata dopo il trattamento.

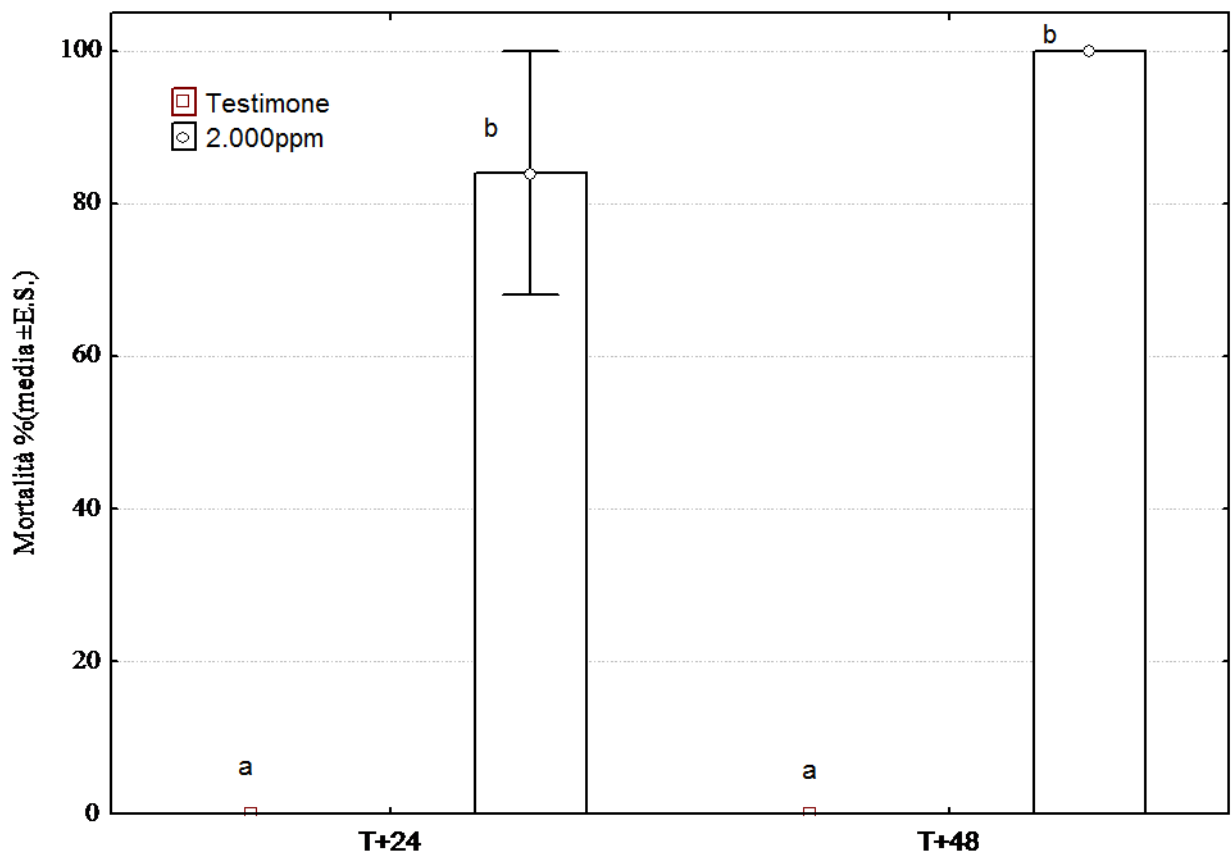
In particolare, tra le concentrazioni testate sulle forme giovanili, nonostante gli effetti indiscutibilmente positivi dei tre estratti, i migliori risultati sono stati raggiunti con il trattamento a dose più alta e, soprattutto, dopo 7 giorni dal trattamento.

L'estratto di piretro utilizzato sulle femmine adulte di *Tetranychus urticae* Koch. ha fornito risultati particolarmente interessanti, consentendo di registrare una mortalità del 100% già dopo 48 dal trattamento.



Per ogni rilievo, medie accompagnate dalla stessa lettera sono tra loro statisticamente non diverse per $P \leq 0,05$ (Test HSD di Tukey). Per ogni livello di concentrazione, *: $P \leq 0,05$; **: $P \leq 0,01$; ***: $P \leq 0,001$ nei quattro rilievi successivi (dopo 24h, 48h, 72h e 7 gg dal trattamento).

Figura 18. Mortalità degli stadi giovanili di *T. urticae* trattati con tre diverse concentrazioni di estratto di piretro naturale, dopo 24h, 48h, 72h e 7 gg dal trattamento.



Per ogni rilievo, medie accompagnate dalla stessa lettera sono tra loro statisticamente non diverse per $P \leq 0,05$ (Test HSD di Tukey).

Figura 19. Mortalità delle femmine di *T. urticae* trattate con estratto naturale di piretro (2000 ppm).

VI - VALUTAZIONE DELL'ADATTABILITA' DEL PIRETRO AGLI AMBIENTI MEDITERRANEI

Allo scopo di valutare la risposta bio-agronomica e produttiva del piretro alle condizioni di coltivazione, è stato allestito un campo sperimentale presso l'azienda "Sparacia" (Cammarata – AG, 37° 38' N - 13° 46' E; 415 m s.l.m), area rappresentativa degli ambienti semiaridi mediterranei. La coltura, condotta rispettando le norme e i vincoli basilari imposti dal regime di produzione biologico, è stata impiantata nel mese di marzo del 2005, mettendo a dimora le piantine, ottenute in vivaio da seme di provenienza commerciale, su parcelle di m 6x5, su file distanti tra loro 50 cm. Le piante sono andate in fioritura nello stesso anno del trapianto, seppur con produzioni poco significative. Nell'anno successivo (2006), le piante hanno fornito una buona produzione (più di 150 capolini per pianta, corrispondenti ad un peso fresco di circa 67 g e ad un prodotto erboristico di circa 22 g per pianta) (Carrubba et al., 2006). Il materiale vegetale (semi e cespi) utilizzato nelle prove di micropropagazione riguardanti la presente ricerca provenivano dal campo sperimentale appena descritto.

Nel corso del 2008, in corrispondenza del quarto anno dall'impianto della coltura, i dati rilevati sono apparsi estremamente incoraggianti (Tabella 10). Rispetto ai dati vegetativi e produttivi registrati nel 2006 (2° anno), infatti, la coltura ha fornito risultati migliori sia in termini di accrescimento vegetativo, con un'altezza media delle piante alla raccolta di 84 cm contro i 70 cm del 2006, che di sviluppo degli organi riproduttivi, con un peso medio di capolini/pianta di 87,63 g ed un diametro medio di 4,54 cm, contro i 76,7 g e i 3,9 cm, rispettivamente, del 2006.

Tabella 10. Sparacia (Cammarata - AG), 2008. Piretro (*Chrysanthemum cinerariaefolium* L.).
Medie ± deviazioni standard.

Altezza piante (cm)	Diametro cespo (cm)	Spessore strato fiorito (cm)	Peso fresco pianta (g)	Peso fresco capolini/ pianta (g)	Diametro capolini (g)
84 ± 1,41	64 ± 5,66	24 ± 1,41	700 ± 353,55	87,63 ± 49,46	4,54 ± 0,40

L'anno successivo, tuttavia, la coltura ha mostrato evidenti segni di invecchiamento. Al momento della raccolta, infatti, le piante presentavano in media un'altezza di 66 cm, 2-3 ramificazioni, un peso di 4,58 g e un numero di capolini di 2,7.

Soprattutto in considerazione del livello estremamente ridotto di input tecnici somministrati, la Composita in coltivazione ha espresso, nel complesso, buone doti di adattabilità agli ambienti mediterranei.



Figure 20 e 21. Campo di piretro in fioritura, Sparacia (Cammarata - AG), 2008.

VII - CONCLUSIONI

Nel corso del triennio del dottorato di ricerca, le attività svolte hanno indagato sulle potenzialità produttive del piretro (*Chrysanthemum cinerariaefolium* L.) in ambiente mediterraneo. La ricerca svolta ha esplorato tre ambiti di interesse.

Il primo, riguardante la valutazione dell'adattabilità della specie ad un approccio di tipo **biotecnologico**, ha affrontato:

- lo studio della risposta della specie, considerata "ricalcitante", alle condizioni di coltura *in vitro*;
- la messa a punto di un'adeguata tecnica di isolamento di protoplasti di piretro, per un programma di miglioramento genetico mediante ibridazione somatica.

Nell'ambito di uno **studio di tipo funzionale**, ad ulteriore conferma delle ampie possibilità di applicazione del piretro, nel corso dell'ultimo anno del dottorato di ricerca, è stata condotta, inoltre, una prova su *Tetranychus urticae* Koch. (Acariformes, Tetranychidae), in modo da testare l'effetto acaricida di estratti di piretro a diversa concentrazione.

Allo scopo di valutare l'adattabilità della Composita agli ambienti mediterranei, con un **approccio bio-agronomico**, sono stati eseguiti, infine, dei rilievi sulle caratteristiche vegetative e produttive di una coltura di piretro allestita in un'area rappresentativa dell'entroterra siciliano.

Le tecniche di coltura *in vitro* adottate, riguardanti l'introduzione *in vitro*, le prove di germinazione, moltiplicazione, acclimatamento *ex vitro* e la formazione di callo embriogenico, nonostante le problematiche riscontrate, hanno consentito di raggiungere, a conclusione del periodo di sperimentazione, un buon livello di "addomesticazione" della specie.

Le procedure di isolamento dei protoplasti, nonostante la modesta "riuscita" delle prove, hanno aperto lo scenario su aspetti interessantissimi, legati all'affascinante mondo della biologia cellulare e alle sue possibili applicazioni nell'ambito di programmi di miglioramento genetico per ibridazione somatica.

Anche le prove volte a testare gli effetti di estratti naturali di piretro su *Tetranychus urticae* Koch. (Acariformes, Tetranychidae) hanno fornito risultati interessanti, suggerendo l'opportunità di effettuare ulteriori ricerche che tengano in considerazione, oltre ai dati relativi alla mortalità degli acari ai vari stadi di sviluppo, anche l'effetto dei diversi trattamenti sull'accrescimento della popolazione, valutato in base all'ovideposizione registrata dopo il trattamento.

Relativamente alla risposta agronomica del piretro in ambienti semi-aridi dell'entroterra siciliano, soprattutto in considerazione del livello estremamente ridotto di input tecnici somministrati, la Composita in coltivazione ha espresso, nel complesso, buone doti di adattabilità, in prospettiva assicurando, tra l'altro, vantaggi ad ampio spettro, di tipo ambientale, economico e sociale.

In definitiva, l'introduzione della specie negli ordinamenti colturali degli ambienti mediterranei appare, quindi, una scelta adeguata per lo sviluppo sostenibile ed integrato dei territori rurali, con particolare riferimento alle aree marginali del meridione d'Italia.

Bibliografia

- Abad M.J., Bermejo P., Villar A. (1995) An approach to the genus *Tanacetum* L.(Compositae): Phytochemical and pharmacological review. *Phytotherapy Research* 9: 7992.
- Abbott, W.S., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18, 265–267.
- Arigoni, D., Sagner, S., Latzel, C., Eisenreich, W. and Bacher, A. 1997. Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-D-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 94: 10600-10605.
- Banthorpe, D.V. and Charlwood, B.V. 1980. The Terpenoids In: Pirson, A. and Zimmermann, M.H. (eds). *Encyclopedia of plant physiology. Volume 8*, Bell, E.A. and Charlwood, B.V.(eds), Secondary plant products. Springer-Verlag, Berlin- Heidelberg. pp 185-220.
- Barthomeuf C., Hitmi A., Veisseire P., Coudret A. (1996) Identification and assay of pyrethrins in *Chrysanthemum cinerariaefolium* calli. *Biotechnology Techniques* 10: 639-642.
- Bhat B.K. (1995) Breeding methodologies applicable to pyrethrum. In “Pyrethrum flowers. Production, chemistry, toxicology, and uses”. (Eds JE Casida, GB Quistad) pp. 67-95. (Oxford University Press: Oxford, New York, Toronto)
- Bhat B.K., Menary R.C., 1984. Genotypic and phenotypic variation in floral development of different clones of pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis.). *Pyrethrum Post* 15: 99-103.
- Bhat B.K., Menary R.C., Pandita N.P. (1985) Population improvement in pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis.). *Euphytica* 34: 613-617.
- Bhat B.K., Menary RC (1986) Scanning electron microscopic study of oil glands in pyrethrum flowers. *Pyrethrum Post* 15:11-15.
- Birch, A.J. (1973). Biosynthetic pathways in chemical phylogeny, *Pure Appl. Chem.*, 33, 17-38.
- Block, R. and Lankes, C. 1995. Reasons for tissue browning of explants of the apple rootstock M9 during *in vitro* establishment. *Gartenbauwissenschaft* 60: 276-279.
- Bouvier, F., d’Harlingue, A., Suire, C., Backhaus, R.A. and Camara, B. 1998. Dedicated roles of plastid transketolases during the early onset of isoprenoid biogenesis in pepper fruits. *Plant Physiology* 117: 1423-1431.
- Brewer J.K. (1968) Flowering and seedsetting in pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis.). A review. *Pyrethrum Post* 9 (4): 18-21.
- Bruneton J. (1995) *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*. Lavoisier Publ., Paris, pp. 493-497.
- Cantele A. (2001) Piretro (*Tanacetum cinerariaefolium* o *Chrysanthemum cinerariaefolium* L.) – Coltivazioni erbacee – Piante oleifere, da zucchero, da fibra, orticole e aromatiche. Pàtron Editore, pp.449-452.

Carrubba A., Ascolillo V. (2006) Prove di coltivazione di composite di interesse officinale in ambiente semi-arido. Atti 3° Conv. naz. "Piante mediterranee: le piante mediterranee nelle scelte strategiche per l'agricoltura e l'ambiente". Bari, 27/09-01/10 2006 (In corso di stampa).

Carrubba A., Catalano C, Bontempo R. Multifunctional Role of Medicinal and Aromatic Plants: Perspectives and Constraints. Atti 10th Congress of the European Society for Agronomy, Bologna, 15-19/09/2008. Italian Journal of Agronomy, July – September 2008, Vol. 3, No. 3 supplement. 439-440.

Casida J.E. (Ed.) (1973) Pyrethrum, the natural insecticide. Academic press, New York 3, 43.

Chappell J., (1995). The biochemistry and Molecular Biology of Isoprenoid Metabolism. Plant Physiol. 107: 1-6.

Chawla H.C. (2002) Introduction to plant biotechnology – Second edition. Science publishers, Inc., Enfield, NH, USA.

Choi, Y.E., Yang, D.C. and Choi, K.T. 1998. Induction of somatic embryos by macrosalt stress from mature zygotic embryos of *Panax ginseng*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 52: 177-181.

Cocking E.C. (1960) A Method for the Isolation of Plant Protoplasts and Vacuoles. Nature 187, 962 – 963.

Cocking E.C. (1972) Plant Cell Protoplasts-Isolation and Development. Annual Review of Plant Physiology. Vol. 23: 29-50

Crombie, L. 1980. Chemistry and biosynthesis of natural pyrethrins. Pesticidal Science 11: 102-118.

Crowley, M.P., Godin, P.J., Inglis, H.S., Snarey, M. and Thain, E.M. 1962. The biosynthesis of the 'Pyrethrins' I. The incorporation of ¹⁴C-labelled compounds into the flowers of *Chrysanthemum cinerariaefolium* and the biosynthesis of chrysanthemum monocarboxylic acid. Biochimica et Biophysica Acta 60: 312-319.

Curtis, O.F. and Shetty, K. 1996. Growth medium effects on vitrification, total phenolics, chlorophyll, and water content of *in vitro* propagated oregano clones. Acta Horticulturae 426: 498-503.

da Silva J., Yonekura L., Kaganda J., Mookdasanit J., Nhut D., Afach G. (2004) Important Secondary Metabolites and Essential Oils of Species Within the Anthemideae (Asteraceae). Journal of Herbs, Spices & medicinal Plants, Vol. 11 (1/2). pp. 1-43.

Dindo M.L., (1993). Potenzialità delle sostanze di origine vegetale nella lotta contro gli insetti. La difesa delle piante, 16 (1), 23-44.

FAO, 1978. Report on the agro-ecological zones project, Vol I: Methodology and results for Africa. World soil resources Rep. No. 48/1, FAO, Rome.

FAO, 2008. <http://www.fao.org> [ultimo accesso: 10.02.2011].

Franck, T., Kevers, C., Gaspar, T. (1995). Protective enzymatic systems against activated oxygen species compared in normal and vitrified shoots of *Prunus avium* L. raised *in vitro*. *Plant Growth Regulation* 16: 253-256.

Gaspar, T., Kevers, C., Debergh, P., Maene, L., Paques, M. and Boxus, P. 1987. Vitrification: morphological, physiological and ecological aspects. In: Bonga, J.M. and Durzan, D.J.(eds.). *Cell and Tissue Culture in Forestry*. Volume 1. Kluwer Academic Press Publication, Dordrecht, pp. 152-166.

Glover J., (1955). Chilling and flower bud stimulation in pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium*). *Ann. Bot. (London)*, 19: 138-148.

Godin, P.J., Inglis, H.S., Snarey, M. and Thain, E.M. 1963. Biosynthesis of the pyrethrins. Part II. Pyrethric acid and the origin of ester-methyl groups. *Journal of Chemical Society (B)*: 5878-5880.

Greenhill M. (2007) Pyrethrum production: Tasmanian success story. *Chronica Horticulturae*, Vol. 47, n. 3, pp. 5-8.

Greger H. (1977). Anthemideae - chemical review. In: Heywood, V.H.R., Harborn, J.B.R. and Turner, B.L. (eds). *The biology and chemistry of the Compositae*. Volume III. Academic Press London-New York-San Fransisco. pp. 899-941.

Grosser J.W., J.L. Chandler (1987) Aseptic isolation of leaf protoplasts from Citrus, Poncirus, Citrus × Poncirus hybrids and Severinia for use in somatic hybridization experiments, *Scientia Hortic.* 31 (1987), pp. 253–258.

GRUPPO SGD, 2010. www.grupposgd.it. Piretrine naturali e loro derivati sintetici [ultimo accesso: 10.02.2011].

Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W.F., Kloepper, J.W. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology* 43: 895-914.

Haque S., Farooqi A.H.A., Khan A. (2006) Improvement of Seed Germination in *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Pyrethrum) by GA₃, Ethrel and Pre-chilling. *Physiology and molecular biology of plants*. An International Journal of Functional Plant Biology. Volume 12, numero 3.

Hartmann, T. (1985). Prinzipien des pflanzlichen Sekundär Stoffwechsees, *Plant Systematics and Evolution*, 150, 15-34.

Head, S.W., 1966. A study of the insecticidal constituents in *Chrysanthemum cinerariaefolium*: (1) their development in the flower head; (2) their distribution in the plant. *Pyrethrum Post*, 8(4): 32-72.

Heywood, V.H. (1976) *Tanacetum*. In: Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M. and Webb, D.A. (eds). *Flora Europaea, Plantaginaceae to Compositae (and Rubiaceae)*. Volume 4. Cambridge University Press, Cambridge. pp.169-171.

Heywood, V.H. and Humphries, C.J. (1977) Anthemideae-systematic review. In: Heywood, V.H.R., Harborne, J.B. and Turner, B.L. (eds). *The biology and chemistry of the Compositae*. Volume II. Academic Press, Great Britain. pp. 851-897.

- Hitmi A., Barthomeuf C., Coudret A. (1998) *Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis. Callus cultures: optimising growth and pyrethrin synthetis ability. *Journal of Plant Physiology* 153: 233-326.
- Hitmi A., Sallanon H. e Barthomeuf C. (2001) Effects of plant growth regulators on the growth and pyrethrin production by cell cultures of *Chrysanthemum cinerariaefolium*. *Australian journal of botany* 49, pp 81-88;
- Housti F. et al (1992) Effect of ethylene on enzymatic activities involved in the browning of *Hevea brasiliensis* callus. *Physiol. Plant.* 86:445-450.
- Ikaku, J.M., Ngugi, C.W., 1989. Investigations into yield losses of some pyrethrum clones through picking of flowers at improper stage of development. *Pyrethrum Post*, 17 (2): 56-59.
- Jin, H., Hartman, G.L., Nickell, D. and Widholm, J.M. 1996. Phytotoxicity of culture filtrate from *Fusarium solani*, the causal agent of sudden death syndrome of soybean. *Plant Disease* 80: 922-927.
- Jones, G.D.G. (1968) The pyrethrins content of pyrethrum clones and hybrids. *Pyrethrum Post* 9: 28-29.
- Jones GDG (1973) Pyrethrum production. In: Casida JE (ed) *Pyrethrum, the natural insecticide*. Academic Press, New York, pp 17-22;
- Keskitalo, M (1999). Exploring biodiversity to enhance bioactivity in the genus *Tanacetum* through protoplast fusion. Academic dissertation. Helsinki 1999.
- Keskitalo, M., Angers, P., Earle, E. and Pehu, E. (1999). Chemical and genetic characterization of calli derived from somatic hybridization between tansy (*Tanacetum vulgare* L.) and pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium* (Trevir.) Schultz.Bip.). *Theoretical and Applied Genetics* 98: 1335-1343.
- Keskitalo, M. (2001) Application of protoplast fusion technology to tansy (*Tanacetum vulgare* L.): biodiversity as a source to enhance biological activity of secondary compounds. *Acta Hort* 560: 263-267.
- Keskitalo, M. (2001) Can protoplast production from in vitro cultured shoots of *Tanacetum* vary during the season? *Agricultural and food science in Finland* Vol. 10: 145-151.
- Keskitalo M. (1999) Exploring biodiversity to enhance Bioactivity in the genus *Tanacetum* through Protoplast fusion. Academic Dissertation, University of Helsinki, Department of Plant Production, Section of Crop Husbandry. Publication No 53, 112 p.
- Keskitalo, M., Kanerva, T. and Pehu, E. (1995). Development of *in vitro* procedures for regeneration of petiole and leaf explants and production of protoplast-derived callus in *Tanacetum vulgare* . (Tansy). *Plant Cell Reports* 14: 261-266.
- Keskitalo, M., Pohto, A., Savela, M-L., Valkonen, J.P.T., Simon, J. and Pehu, E. (1998) Alterations in growth of tissue-cultured tansy (*Tanacetum vulgare* L.) treated with antibiotics. *Annals of Applied Biology* 133: 281-296.
- Klercker, J. (1892). Eine Methode zur Isolierung lebender Protoplasten. *Ofvers. Vetensk. Akad. Forh. Stock.* 49, 463-475.

Kroll, U., (1963). The effect of fertilizers, manures, irrigation and ridging on the yield of pyrethrum. *East Afr. Agric. For. J.*, 28: 139-145.

Leifert, C., Camotta, H., Waites, W.M. 1992. Effect of combinations of antibiotics on micropropagated *Clematis*, *Delphinium*, *Hosta*, *Iris* and *Photinia*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 29: 153-160.

Leto, C., Carrubba, A., Cibella R. 1994. Risultati di un quadriennio di coltivazione di camomilla (*Chamomilla recutita* Rausch.) nell'ambiente caldo-arido mediterraneo. Atti del Convegno internazionale "Coltivazione e miglioramento di piante officinali" – Trento 2-3 giugno 1994.

Lichtenthaler, H.K., Rohmer, M. and Schwender, J. 1997a. Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiologia Plantarum* 101: 643-652.

Lindsay G, Ledger S.E. (1993) A protoplast to plant system for the chrysanthemum *Dendranthema zawadskii* x *D. grandiflora*. *Plant cell report* 12, pp 278-280.

MacDonald, W. L. 1995. Pyrethrum flowers- production in Australia. In: Casida, J.E. and Quistad, G.B. (eds). *Pyrethrum flowers. Production, chemistry, toxicology, and uses*. Oxford University Press, New York. pp 55 – 56.

Maltinti S., (2005) Moltiplicazione in vitro di *Passiflora incarnata* L.: ruolo dell'etilene. Tesi di Laurea del Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie Vegetali e Microbiche dell'Università degli Studi di Pisa.

McLauling GA (1973) History of pyrethrum. In: Casida JE (ed) *Pyrethrum, the natural insecticide*. Academic Press, New York, pp 3-13.

Menczel L., Nagy F., Kiss Zs. R., Maliga P. (1981). *Theor. Appl. Genet.* 59: 191-195.

Misaghi I.J. and Donndelinger C.R. (1990). Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. *Phytopathology* 80: 808-811.

Mohamed, S.V. and Jayabalan, N. (1996). A protocol for horsegram (*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.) callus induction. *Israel Journal of Plant Sciences* 44: 143-145.

Muccinelli M. (2008) *Prontuario degli agrofarmaci – Dodicesima Edizione*. Edagricole.

Murashige T., Skoog F.A. (1962) Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.

Odinga W. A., Angedu C. A. (2003) The relationship between pyrethrins and the yellow pigmentation in pyrethrum flowers. *African Journal of Science and Technology, Science and Engineering Series* Vol. 4, No. 2, pp.116-123.

Olmos E. and Hellin E. (1998). Ultrastructural differences of hyperhydric and normal leaves from regenerated carnation plants. *Scientia Horticulturae* 75: 91-101.

Ottaro W.G.M. (1977). The relationship between the ploidy level and certain morphological characteristics of *Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis. *Pyrethrum Post* 14 (1): 10-14.

Z.G. Pan, C.Z. Liu, S.J. Murch, M. El-Demerdash, Praveen K. Saxena (2003) Plant regeneration from mesophyll protoplasts of the Egyptian medicinal plants *Artemisia judaica* L. and *Echinops spinosissimus* Turra. *Plant Science* 165: 681-687.

Parlevliet J.E. (1969) Clonal selection for yield in pyrethrum, *Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis. *Euphytica* 18: 21-26.

Parlevliet J.E. (1975) The genetic variability of the yield components in the Kenyan pyrethrum population. *Pyrethrum Post* 13(1): 23-28.

Parlevliet. J.E. and Contant R.B. (1970) Selection for combining ability in pyrethrum, *Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis. *Euphytica* 19: 4-11.

Potter C. (1952) An improved laboratory apparatus for applying direct sprays and surface films, with data on the electrostatic charge on atomized spray fluids. *Annals of Applied Biology* 39 (1):1-28.

Price (1984). Plant and insect herbivore relationship. Pp 42-69 in *Insect Ecology*. Wiley & Sons New York.

Purseglove J.W. (1982). *Tropical crops. Dicotyledons*. Longman, New York.

Roest S. (1976). Flowering and Vegetative Propagation of Pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis) in Vivo and in Vitro. Phd Thesis, Pudoc, Wageningen.

Roviglioni R. (2008) Piretro: insetticida «naturale» da usare con attenzione per la difesa delle colture. *Vita in campagna* 7-8/2008.

Sarker, K. and Pal, A. (1991). Factors affecting stability in pyrethrin production in cultures of *Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis. *Acta Botanica Indica* 19: 248-251.

Seigler D.S. (1998). *Plant Secondary Metabolism*. Springer, pp 1-15

Singh, S.P. and Sharma, J.R. (1989) Genetic improvement of pyrethrum. *Theoretical and Applied Genetics* 78: 841-846.

Singh, S.P. and Singh, A.K. (1996) Criteria for economic attributes in pyrethrum to facilitate early clonal selection. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences* 18: 295-296.

Singh, S.P., Rao, B.R.R., Sharma, J.R. and Sharma, S. (1987) Genetic improvement of pyrethrum: 1. Assessment of genetic variability and clonal selection. *Pyrethrum Post* 16: 120-124.

Singh, S.P., Sharma, J.R., Rao, B.R.R. and Sharma, S.K. (1988). Genetic improvement of pyrethrum: II. Parent-offspring correlation and progeny performance. *Pyrethrum Post* 17: 8-11.

Soreng, R.J. and Cope, E.A. (1991) On the taxonomy of cultivated species of the *Chrysanthemum* Genus-Complex (Anthemideae; Compositae). *Baileya* 23: 145-165.

Spencer K. C. (1988). Introduction: Chemistry and coevolution. pp 1-11 in Spencer K.C. (ed), Chemical mediation of coevolution. Academic Press, New York.

Staba E.J. and Zito S.W. (1985). The production of pyrethrins by *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Trev) Bocc. In: Neumann, A., Barz, W. and Reinhard, E. (eds). Primary and secondary metabolism of plant cell cultures. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg. pp. 209-214.

StatSoft Inc. (2003). Statistica, Users Manual. Stat Soft Inc., Tusla, OK.

Stevens K.L., (1984). Biological activity and chemistry of sesquiterpene lactones. In W.D. Nes, G Fuller, L-S Tsai, eds, Isopentenoids in Plants. Marcel Dekker, New York, pp 65-80.

Stoessel A., Stothers J.B., Ward E.W.B. (1976). Sesquiterpenoid stress compounds of the Solanaceae. *Phytochemistry* 15: 855-873.

Takebe I., Otsuki and S. Aoki. (1968) Isolation of tobacco mesophyll cells in intact and active state *Plant Cell Physiol.* 9, pp. 115–124.

Tedone L., Bicchi C., Manolio G., Marzi V. (2004). Coltivazione del piretro (*Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis) in Italia meridionale. *Italus Hortus*, n.s., vol. 11, n. 4, 182-185.

Tuikong, A.R. (1984) Pyrethrum breeding in Kenya: A historical account. *Pyrethrum Post* 15: 113-117.

Virrankoski, V. and Sorsa, M. (1968). Chromosome analysis and the occurrence of cytotoxic disturbances in *Chrysanthemum vulgare* L. in Finland. *Annales Academic Scientiarum Fennicae, Serie B*, 137: 1-13.

Wambugu, F.M. and Rangan, T.S. (1981) *In vitro* clonal multiplication of pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis.) by micropropagation. *Plant Sciences Letters* 22: 219-226.

Wandahwa, P. Van Ranst, E., Van Damme P. (1996). Pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis.) cultivation in West Kenya: origin, ecological conditions and management. *Industrial Crops and Products* 5: 307-322.

Wei D., Zhengguo L., Guomin W., Yingwu Y., Yingguo L., Yuxian X. (2006), Separation and purification of natural pyrethrins by reversed phase high performance liquid chromatography. *Chin J Anal Chem*, 34 (12): 1776-1778.

Zieg, R.G., Zito, S.W. and Staba, E.J. (1983). Selection of high pyrethrin producing tissue cultures. *Planta Medica* 48: 88-91.

Zito, S.W. (1994) *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Pyrethrum): *In vitro* culture and the production of pyrethrins and other secondary metabolites. In: Bajaj, Y.P.S. (ed). *Biotechnology in agriculture and forestry*. Volume 26. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg. pp. 56-68.

Zito, S.W., Srivastava, V. and Adebayo-Olojo, E. (1991). Incorporation of [1-¹⁴C]-isopentenyl pyrophosphate into monoterpenes by a cell-free homogenate prepared from callus cultures of *Chrysanthemum cinerariaefolium*. *Planta Medica* 57: 425-427.

Pubblicazioni prodotte durante il triennio di dottorato

Carrubba A., Catalano C, Militello M. *Le specie aromatiche a distribuzione mediterranea come fonte di conservanti alimentari naturali*. Biologi Italiani, Giugno 2008. LXXIII – LXXVII.

Carrubba A., Catalano C., Abbate L., Motisi A., Tusa N. *The Genetic Improvement of Pyrethrum (Chrysanthemum cinerariaefolium L.): a Biotechnological Approach*. Italian Journal of Agronomy, July – September 2008, Vol. 3, No. 3 supplement. 577-578.

Carrubba A., Catalano C, Bontempo R. *Multifunctional Role of Medicinal and Aromatic Plants: Perspectives and Constraints*. Italian Journal of Agronomy, July – September 2008, Vol. 3, No. 3 supplement. 439-440.

Carrubba A., Catalano C, Bontempo R. *Cultivation of wild medicinal species: opportunities and constraints*. Atti XVII Congresso Italo-Latinoamericano di Etnomedicina “Bernardino d’Ucria”, Palermo, 16-21 Settembre 2008. 120.

Carrubba A., Catalano C, Bontempo R, Ascolillo V. *Phenological and agronomical evaluation of chamomile in Mediterranean environments*. Atti XVII Congresso Italo-Latinoamericano di Etnomedicina “Bernardino d’Ucria”, Palermo, 16-21 Settembre 2008. 121

Carrubba A., Ascolillo V., Catalano C, Bontempo R. *Plant species for mucilages as crops for Mediterranean environments*. Atti XVII Congresso Italo-Latinoamericano di Etnomedicina “Bernardino d’Ucria”, Palermo, 16-21 Settembre 2008. 122.

Catalano C. *Quel tesoro di camomilla – La sperimentazione passo dopo passo - Terrà – il multimediale dell’agricoltura*, n. 11/12 - novembre/dicembre 2008. 32.

Carrubba A., Catalano C, Militello M. *Specie erbacee di interesse fitoterapico come risorsa produttiva per le aree semiaride mediterranee*. Atti XV Congresso Nazionale di Fitoterapia, 29 - 31 Maggio 2009, Tivoli Terme (Roma)

A. Carrubba, C. Catalano, M. Militello - *La coltivazione della calendula (Calendula officinalis L.) come prodotto erboristico*. Atti XV Congresso Nazionale di Fitoterapia, 29 - 31 Maggio 2009, Tivoli Terme (Roma)

A. Carrubba, C. Catalano, M. Militello - *Piante di interesse fitoterapico: dalla raccolta delle spontanee alle esperienze di coltivazione*. Atti XV Congresso Nazionale di Fitoterapia, 29 - 31 Maggio 2009, Tivoli Terme (Roma).

Carrubba A., Catalano C. - *Essential oil crops for sustainable agriculture - A review*. E. Lichtfouse (ed.), *Climate Change, Intercropping, Pest Control and Beneficial Microorganisms*, Sustainable Agriculture Reviews 2, DOI 10.1007/978-90-481-2716-0_8, _Springer Science+Business Media B.V. 2009

A. Carrubba, C. Catalano, M. Militello - *Gestione ecocompatibile delle infestanti nel finocchio da seme (Foeniculum vulgare Mill.)*. Atti XXXVIII Convegno Nazionale SIA, 21-23 settembre 2009, Firenze, pag 105-106.

A. Carrubba, C. Catalano, M. Militello -. *Variabilità della risposta produttiva in Brassica carinata al variare della precessione colturale* Atti XXXVIII Convegno Nazionale SIA, 21-23 settembre 2009, Firenze, pag. 207-208.

A. Carrubba, C. Catalano, M. Militello – *Coltivazione di piante officinali annuali da seme con tecniche ecocompatibili*. Piante officinali in Sicilia. Pubblicazione realizzata nell’ambito del progetto di ricerca “Piante officinali in Sicilia: studio agronomico, fitochimico e farmacologico mirato alla loro valorizzazione e allo sfruttamento agro-industriale” con il contributo del CoRiSSIA e del Servizio XI dell’Assessorato Agricoltura e Foreste della Regione Siciliana (2009) pag. 35-46.

A. Carrubba, C. Catalano, – *Coriandolo*. Piante officinali in Sicilia. Pubblicazione realizzata nell’ambito del progetto di ricerca “Piante officinali in Sicilia: studio agronomico, fitochimico e farmacologico mirato alla loro valorizzazione e allo sfruttamento agro-industriale” con il contributo del CoRiSSIA e del Servizio XI dell’Assessorato Agricoltura e Foreste della Regione Siciliana (2009) pag. 93-98.

A. Carrubba, C. Catalano, F. Branca, S. Argento – *Finocchio selvatico*. Piante officinali in Sicilia. Pubblicazione realizzata nell’ambito del progetto di ricerca “Piante officinali in Sicilia: studio agronomico, fitochimico e farmacologico mirato alla loro valorizzazione e allo sfruttamento agro-industriale” con il contributo del CoRiSSIA e del Servizio XI dell’Assessorato Agricoltura e Foreste della Regione Siciliana (2009) pag. 105-110.

A. Carrubba, C. Catalano – *Psillio*. Piante officinali in Sicilia. Pubblicazione realizzata nell’ambito del progetto di ricerca “Piante officinali in Sicilia: studio agronomico, fitochimico e farmacologico mirato alla loro valorizzazione e allo sfruttamento agro-industriale” con il contributo del CoRiSSIA e del Servizio XI dell’Assessorato Agricoltura e Foreste della Regione Siciliana (2009) pag. 123-127.

A. Carrubba, C. Catalano, M. Militello, A. Pasquale, T. Strano, G. Ruberto. - *Variabilità dell’olio essenziale di finocchio (Foeniculum vulgare Mill.) per effetto di trattamenti agronomici*. Atti 4° Convegno Nazionale Piante Mediterranee – “Le Potenzialità del territorio e dell’ambiente”. A cura di G. Sarli, A. Alvino, C. Cervelli, 2010: 661-666. ISBN: 978-1-4466-8981-3

A. Carrubba, C. Catalano, M. Militello. - *Prove di coltivazione di Iperico (Hypericum perforatum L.) in ambiente semi-arido*. Atti 4° Convegno Nazionale Piante Mediterranee – “Le Potenzialità del territorio e dell’ambiente”. A cura di G. Sarli, A. Alvino, C. Cervelli, 2010: 200-204. ISBN: 978-1-4466-8981-3

A. Carrubba, C. Catalano, M. Militello. - *Valorizzazione della biodiversità vegetale in ambiente semi-arido: lo Psillio (Plantago psyllium L.)*. Atti 4° Convegno Nazionale Piante Mediterranee – “Le Potenzialità del territorio e dell’ambiente”. A cura di G. Sarli, A. Alvino, C. Cervelli, 2010: 194-199. ISBN: 978-1-4466-8981-3.

A. Carrubba, C. Catalano, M. Militello. - *Effects of organic and conventional N-fertilization on quality traits in coriander (Coriandrum sativum L.)*. Proceedings 18th Symposium of the International Scientific Centre of Fertilizers “More sustainability in agriculture: new fertilizers and fertilization management”, Roma, 8-12 novembre 2009. 2010: 174-179. ISSN: 1971-0755

A. Carrubba, M. Militello, C. Catalano. - *N use and partitioning in coriander (Coriandrum sativum L.) after organic and conventional N fertilization*. Proceedings 18th Symposium of the International Scientific Centre of Fertilizers “More sustainability in agriculture: new fertilizers and fertilization management”, Roma, 8-12 novembre 2009. 2010: 345-350. ISSN: 1971-0755.

A. Carrubba, C. Catalano. *Prove di coltivazione di Calendula (Calendula officinalis L.) in ambiente semi-arido*. Atti VIII Conv. Nazionale “La Biodiversità – una risorsa per sistemi multifunzionali”. Modugno (Bari): Arti Grafiche Favia, 2010: 119-121, ISBN/ISSN: 978-88-904490-4-8

A. Carrubba, C. Catalano, R. Bontempo. *Ruolo delle piante officinali nella salvaguardia della diversità negli ambienti mediterranei*. Atti VIII Conv. Nazionale “La Biodiversità – una risorsa per sistemi multifunzionali”. Modugno (Bari): Arti Grafiche Favia, 2010: 122-124. ISBN: 978-88-904490-4-8

A. Carrubba, C. Catalano, R. Bontempo - *Cultivation trials of Dill (Anethum graveolens L.) with different row arrangements*. Abstr. Vol. II, 28th IHC - International Horticultural Congress. Lisbon (Portugal), 22-27 agosto 2010: 77

Appendice A

The Genetic Improvement of Pyrethrum (*Chrysanthemum Cinerariaefolium* L.): a Biotechnological Approach.

Alessandra Carrubba¹, Caterina Catalano¹, Loredana Abbate², Antonio Motisi², Nicasio Tusa².

¹ DAAT – Dep. Environmental and Land Agronomy, Univ. Palermo, Italy, acarr@unipa.it

² IGV- CNR – Inst. Plant Genetics, Nat. Res. Council., Div. Palermo, Italy, nicasio.tusa@igv.cnr.it

Pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium* L. = *Tanacetum cinerariaefolium* (Trev.) Schultz-Bip.) is a perennial herbaceous plant belonging to the family *Asteraceae*, native to Albania and the area of former Yugoslavia. Pyrethrum is the only species in the genus *Tanacetum* having an agronomic importance, although the genus consists of several species producing similar types of bioactive metabolites. The species is grown in order to obtain the insecticidal compounds collectively termed pyrethrins, which are found primarily in the flower head. Pyrethrum may be easily propagated by seeds, vegetative splits, stem cuttings (rooted or not under mist), and tissue culture. The first attempts to introduce its cultivation into the semi-arid Mediterranean environments have brought to satisfactory results, and the species has shown a good response in terms of biomass and flowers yield, even when technical inputs were applied in a reduced amount. Much work must still be done, however, in order to set a properly detailed management protocol for the genetic improvement of the species by means of biotechnology. In this work we discuss the first results of a specific experimental activity aimed to point out a micropropagation protocol for *Pyrethrum*, with the purpose to optimize the *in vitro* culture conditions, using explants sources as tissue donors for protoplast isolation and setting preliminary experiments in protoplast fusion methods to improve the flowers yield per plant and to increase the pyrethrins level.

Methodology

Pyrethrum plants were collected at the beginning of 2008 from a two-year collection field already set in the experimental farm Sparacia (Camarata, AG – Sicily) and transplanted at the Institute of Plants Genetic, division of Palermo.

Establishment of *in vitro* culture. In order to establish a proper *in vitro* culture technique, several plant materials (leaves and shoots) and sterilization protocols have been tested (table 1). The explants were put in a MS medium (Murashige and Skoog, 1962), supplemented with 30 g L⁻¹ sucrose, 3 mg L⁻¹ BAP and 0.5 mg L⁻¹ NAA. The pH of the medium was adjusted to 5.7, gelled with 0.8% agar and autoclaved (20 min., 120 °C).

Germination tests. Preliminary germination tests were performed on mature *Pyrethrum* seeds, by means of two different protocols: in the first case, after a pre-treatment of seeds at 4 °C for 48 hours, sterilization was attained by means of NaClO 15% for 10 min and 3 rinsings with sterile distilled water. 15 seeds for each plate were put to germinate on sterile filter paper. In the second case, seeds were pre-treated at 4 °C in a 50 ppm gibberellic acid solution for 24 hours. Seeds sterilization was performed as above, and seeds were further transferred for germination on a MS medium, supplemented with 50 g L⁻¹ sucrose, 8 g L⁻¹ agar and 3 mg L⁻¹ BAP. In both cases, seeds started germinating after about 10 days; after 1 month approx., the new plantlets were transferred on Magenta boxes, with the same growing medium. All tests concerning establishment *in vitro* and germination were carried out in rooms at controlled temperature set at 25 ± 1 °C, under a photoperiod of 16 hrs light with an intensity of 30 μmol m⁻²s⁻¹.

Isolation of protoplasts. Leaf tissue was used for protoplast isolation, by means of two different enzyme solutions (table 2).

Table 1 – Protocols used for the disinfection of *Pyrethrum* explants for *in vitro* establishment.

Steps	I	II	III	IV	V	VI
1°	Washing (water)	Washing (soap and water) (Tween 20)	Washing (soap and water) (Tween 20)	Washing (soap and water) (Tween 20)	Washing (soap and water) (Tween 20)	Washing (soap and water) (Tween 20)
2°	Ethanol 75% (3 min)	HCl 1mol L ⁻¹ (few sec.)	Ethanol 75% (3 min) + PVP at 1%	Ethanol 75% (40 sec)	Ethanol 75% (40 sec)	Ethanol 75% (40 sec)
3°	15% NaClO (15 min)	15% NaClO (20 min)	20% NaClO (25 min) + PVP at 1%	20% NaClO (20 min) + PVP at 1%	20% NaClO (15 min) + PVP at 1%	15% NaClO (15 min) + PVP at 2%
4°	3 rinsings (5 min each) with sterile distilled water, under a Laminar Flow Cabinet	3 rinsings (5 min each) with sterile distilled water, under a Laminar Flow Cabinet	3 rinsings (5 min each) with sterile distilled water, under a Laminar Flow Cabinet	3 rinsings (5 min each) with sterile distilled water, under a Laminar Flow Cabinet	3 rinsings (5 min each) with sterile distilled water, under a Laminar Flow Cabinet	3 rinsings (5 min each) with sterile distilled water, under a Laminar Flow Cabinet

Table 2. Composition of the enzyme solution used for *Pyrethrum* protoplast isolation

	Protocol 1	Protocol 2
Macerozyme	1.00 %	0.20 %
Cellulase	1.00 %	0.25 %
Pectolyase	0.20 %	0.08 %
Sucrose	0.70 M	0.50 M
CaCl ₂ . 2H ₂ O	12.00 mM	5.00 mM
MES	6.00 mM	-----

Results

The methodology for surface sterilization of explants has undergone, as shown in table 1, a progressive amelioration, as an effect of the results obtained both in the count of contaminations and in browning of tissues. In the first attempts for the *in vitro* establishment, many difficulties have been met, due to the high level of pollution on all kinds of explants, especially on leaves. By modifying times and concentrations of the solutions used for sterilization we came to the final protocol, that allowed, besides a marked reduction of contaminations, also a qualitative improvement of the obtained material. The tissue browning, detected on leaves and above all on shoots, was a major obstacle to the *in vitro* establishment of *Pyrethrum*, that was overpassed starting from the application of the sterilization protocol III by means of the addition of PVP (polyvinyl pyrrolidone; Housti et al. 1992). With the aim to improve such a result, we decided to raise its concentration up to 2%. In germination trials, the two tested protocols did not show any significant difference in germination time and percentages, whereas the growing of plantlets was markedly faster on MS medium. Protoplasts isolation is still under study, in order to evaluate the response to different concentrations of enzyme solutions.

Conclusions

Although many initial difficulties in pointing out the sterilization protocols, the *in vitro* establishment of *Pyrethrum* was stated to be a practical possibility. Our results may represent the starting point for a further oriented research activity.

References

- Housti F. et al 1992. Effect of ethylene on enzymatic activities involved in the browning of *Hevea brasiliensis* callus. *Physiol. Plant.* 86:445-450.
- Murashige T., Skoog F.A. 1962. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.

Appendice B

Essential Oil Crops for Sustainable Agriculture – A Review

Alessandra Carrubba and Caterina Catalano

Abstract Multifunctionality and diversification of farming systems, integration of agricultural practices both inter se and with the non-agricultural productive systems operating on the territory, biodiversity safeguards, and reduction in off-farm inputs, are key factors for all modern development strategies in agricultural areas. Such issues are valid worldwide, but are especially true in areas in which the cultivation of the more widespread and “classical” crops is constrained by factors of varying degree and importance. In Mediterranean areas, where many environmental and economic factors often reduce rural areas to marginal conditions, the search for new crop opportunities has become one of the newest topics in agricultural research. In this review, we focus on the state-of-the-art cultivation of essential oil crops (with a special interest in herbs) in Mediterranean environments. The following are the major points of our analysis. (1) Growing such crops as specialized cultivations, especially for species native to the selected environments, is the only practical and sustainable way to obtain naturally derived raw matter for both industrial and domestic purposes. (2) Most essential oil crops are suitable for many different uses, and fully adaptable for transformation even by small, local manufacturers. (3) In many cases, they may be grown with environmentally friendly or organic techniques; this enhances their environmental compatibility and also gives them an additional economical advantage, raising their chances to be addressed in the emerging market sector of “natural” products. Our conclusion is that crops grown for the extraction of economically valuable essential oils may be a strategic resource for many environments, even marginal, and that there is scope for farmers to improve the cultivation of such species on arable land. There is room, however, for many agronomic and economic questions to be studied in future experimentation and research.

A. Carrubba (✉)

D.A.A.T. – Dipartimento Agronomia Ambientale e Territoriale (Dep. for Environmental and Land Agronomy) – Università di Palermo – Viale delle Scienze – 90128, Palermo, Italy
e-mail: acarr@unipa.it

46 **Keywords** Medicinal and aromatic plants · Crop diversification · Non-common
47 crops · Alternative crops · Alternative farming systems · Cropping techniques · Wild
48 flora · Biodiversity · On-farm transformation
49
50

51 1 Introduction

52
53
54 **AQ1** In recent times, a deep interest has been addressed worldwide to the search for
55 “new” crops, to be allocated to farming systems in which traditional crops are
56 losing competitiveness, and also meant as a diversification option for farmers
57 who want to increase their income (Prohens et al., 2003). To be successful, a
58 “new” crop must meet a number of conditions: first, it must be economically reli-
59 able; second, it must be grown using the minimum amount of off-farm technical
60 inputs as possible; and third, it should find a place in an “integrated” scheme,
61 i.e., a planning strategy including both agricultural and external commodities, with
62 a special interest in diversified production opportunities such as cottage indus-
63 tries, on-farm processing, agribusiness, recreation, tourism, and so on (UN-ESC,
64 2008).

65 The advantages of crop diversification, both in space and time, are many, and
66 they include a better exploitation of land resources, lower risks from pests and dis-
67 eases, and a higher stability in yields and income (Altieri, 2004; Prohens et al.,
68 2003). In areas where environmental constraints set a limit to agricultural manage-
69 ment, this issue takes a special importance. In many Mediterranean areas, a number
70 of climatic limiting factors may be of concern. Prolonged dry periods in summer
71 and spring with a high seasonal evapotranspiration demand, and lack and poor qual-
72 ity of irrigation water, bring as a consequence a growing tendency to soil salin-
73 ization; rainfall mostly occurring in winter, often as intense rainstorms, may cause
74 the breakdown of soil structure and lead to soil erosion (Arnon, 1992). In recent
75 times, attention was called on the expected overall worsening of this scenario due
76 to anthropogenic climate warming, whose effects would be more severe for farming
77 systems currently located in marginal areas (Olesen and Bindi, 2002). Under these
78 conditions, the options for farmers are often limited, and the growing difficulties
79 for agricultural entrepreneurs have led in many cases to the abandonment of the
80 territory.

81 Our basic idea is that the cultivation of crops for the extraction of economi-
82 cally valuable essential oils may be, in this context, an interesting option. Here we
83 review some of the major points related to the introduction of essential oil crops as
84 alternative cropping opportunities, with a special emphasis on their potential role
85 for sustainable agriculture in Mediterranean environments. The major advantages
86 and constraints to cultivation are discussed, together with the genetic, technical,
87 and environmental factors that exert some effect on essential oil yield and quality.
88 Some examples are given about the technical solution that are, or could be, used in
89 Mediterranean environments and for Mediterranean essential oil crops, in order to
90 optimize yields and quality features.

Essential Oil Crops for Sustainable Agriculture

91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102

<p>This figure will be printed in b/w</p>

Fig. 1 Many essential oil crops are native to Mediterranean environments, where they grow as significant landscape components. In the photo, *Rosmarinus officinalis* L. (at flowering) in association with *Erica multiflora* L. (at the end of flowering) in a dry riverbed in the Nebrodi mountain (NE Sicily). (Photo: R. Bontempo)

103
104
105
106
107
108
109

1.1 Producing Essential Oils

110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120

Essential oils are volatile mixtures of different liposoluble organic substances, most of which are aromatic, and include alcohols, aldehydes, ketones, and so on. They are produced by plants in variable quantities and may be easily extracted by means of simple distillation processes. Although the major use of essential oils worldwide is for flavoring purposes, they also have a number of important industrial and domestic uses linked to their specific actions. As an example, rosemary oil is claimed to have simultaneous insecticidal (Katerinopoulos et al., 2005), antioxidant (Etter, 2004), fungicidal (Pauli and Knobloch, 1987), antimicrobial (Pintore et al., 2002), and even hypoglycemic (Mentreddy et al., 2005) activity. Therefore, there would be interest in sectors in which one, or more, of such activities are of use.

121
122
123
124
125
126
127
128
129

The European chemical industry annually imports a great deal of essential oils: the FAO statistic bulletins report that more than 52,000 tons of essential oils (terpeneless or not) were imported in 2005 by France, Germany, the United Kingdom, Netherlands, and Italy (FAO, 2007). The major sources of this massive amount of essential oils were the USA, Brazil, China, and India, accounting for over 50% of the total imports. However, it is worth noting that this partition of supply does not match the monetary exchange. For example, the USA produced 10.7% of the sold oil and received 16% of the corresponding value in dollars, whereas Brazil produced 26.9% of the oil, but only received 5% of the related monetary value.

130
131
132
133
134
135

There are basically three ways to produce essential oils: the collection of plants from the wild, their cultivation ad hoc, and, recently, their extraction from callus or tissue cultures. The first method, largely used in earlier times, is obviously limited to small supplies and local uses. First, collecting plants from the wild does not guarantee the quantitative and qualitative uniformity requested by industry (Ruta et al., 2006; Shetty et al., 1996). Second, in many cases, overharvesting caused severe

136 environmental impacts, resulting in a loss of biodiversity (Schippmann et al., 2002;
137 Skoula, 2006; WHO, 2003) and in the depletion of spontaneous populations, such
138 as reported for rosemary in Sardinia (Mulas and Mulas, 2005).

139 The production of essential oils by means of biotechnology seems to be the most
140 promising way to meet the exigencies of industry. Genetic engineering, microprop-
141 agation, tissue culture, and in vitro regeneration could reach the objective to pro-
142 duce, stabilize, and quickly propagate plant materials containing oils with a given
143 composition or flavor, or even to produce selected secondary metabolites (Weiss,
144 1997). Much effort has been invested in these areas, and the results are often satis-
145 factory, such as for mint (Tariqul Islam et al., 2003), some *Salvia* species (Olszowska
146 and Furmanowa, 1990; Savona et al., 2003; Santos-Gomes and Fernandes-Ferreira,
147 2003; Scarpa et al., 2006), thyme (Iapichino et al., 2006; Shetty et al., 1996), rose-
148 mary (Gatti and Predieri, 2006; Misra and Chaturvedi, 1984), lavender (Lucchesini
149 et al., 2003) alkanet (*Anchusa officinalis* L.; Su et al., 1994), periwinkle (*Catha-
150 ranthus roseus* L.; Hirata et al., 1994), *Coleus* spp. (Petersen, 1994), myrtle (*Myrtus
151 communis* L.; Rigoldi and Satta, 2006), anise (*Pimpinella anisum* L.; Santos et al.,
152 1998), and many others. Notwithstanding, such technologies are still at an experi-
153 mental stage and many technical problems remain to be solved. These include the
154 stability of production, the occurrence of autotoxicity phenomena in the production
155 of tissue cultures, and the productivity level, which is often very low (Collin, 2001).

156 Hence, the easiest and quickest way to obtain essential oils so far is the special-
157 ized cultivation of starting plant material. Many of the essential oils traded world-
158 wide are obtained from plants that are native to Mediterranean environments, and
159 their wide trade opens new crop opportunities to farmers with arable land. At this
160 point, a question immediately arises, and it relates to the choice of the plant-growing
161 method. An overview of the world trade situation for spices, medicinal plant
162 extracts, and essential oils (ITC, 2006), allows the observation that nowadays, and
163 differently from the past, much attention is paid to organic production methods. This
164 is even in the flavor and fragrance industries, which traditionally did not care about
165 production methods, being generally more interested in obtaining a constant qual-
166 itative level of used raw material. In fact, some manufacturers have started setting
167 special organic production lines (ITC, 2006a). The implications of such a tendency
168 are many for crops strictly connected to the “organic” and “natural” market sector.
169 Many European buyers, for example, tend to associate the production of herbs and
170 related items to an idea of “naturalness”, and expressly require the herbs to be culti-
171 vated with organic methods in the belief that such methods confer to the products
172 a higher healthiness value. When their “naturalness” features are enhanced by means
173 of organic labeling, it is possible for essential oil crops to meet the requests of more
174 cautious and exacting consumers who are willing to pay more for a “natural” and
175 “healthy” product (Bianco and Santoprete, 1996; Thomas and Dorko, 2006).

176 It is still debatable whether natural products are safer than other products.
177 Although it is certain, for example, that pesticide residues in herbs may harm the
178 consumer, it is still uncertain whether the use of chemicals may influence other
179 traits, such as the essential oil composition. Some preliminary studies performed in
180 such a direction on coriander oil composition (Carrubba et al., 2002) and peppermint

181 oil yield (Gruszczyk, 2004) did not stress any difference between materials obtained
182 with organic or conventional production methods, but of course this topic requires
183 further experimentation. Until now, it was only possible to conclude that the higher
184 prices that consumers are willing to pay for a certified organic product should com-
185 pensate the higher production costs linked to organic management (Pank, 1993).
186 In our case, it is true that many essential oil crops are suitable for cultivation with
187 a reduced use of energy and technological inputs (Demarco et al., 1999), and the
188 growing trend in Mediterranean cropping systems towards organic production tech-
189 niques offers many new possibilities for such crops.

192 **2 Essential Oil Crops and Development Strategies for Marginal** 193 **Mediterranean Lands**

195 Many definitions of “marginality” have been suggested (Gurung and Kollmair,
196 2005). According to that offered by the FAO Consultative Group on International
197 Agricultural Research (FAO-CGIAR, 1999), “marginal lands” are those “having
198 limitations which in aggregate are severe for sustained application of a given use”.
199 In such lands, increased inputs are required to maintain productivity, and without
200 them, options for diversification are often limited. Because of their special config-
201 uration, marginal lands cannot be cultivated like other lands, simply because their
202 resources cannot sustain the weight of ordinarily managed agriculture. Hence, it is
203 necessary to find some agroecosystem able to guarantee the optimization of the use
204 of resources and their correct maintenance over time, under the assumption of the
205 maximum economy of off-farm inputs.

207 For a number of reasons, many Mediterranean lands, including large areas in the
208 inner part of Sicily, cope with severe conditions of marginality, sometimes leading
209 to the interruption of all agricultural activities and to the abandonment of the land.
210 Some of these constraints are linked to special environmental features of the area
211 that may be characterized, as an example, by extreme levels of temperature and/or
212 moisture, pedological anomalies regarding soil depth, pH level, texture, salinity,
213 toxic substances, and orography. Some Authors (Olesen and Bindi, 2002; Thomas
214 et al., 2004) call attention on that a further worsening of these environmental con-
215 straints would be expected in future due to global climate warming. This could
216 bring as direct consequences habitat losses and environment unsuitability for many
217 species, starting from those areas having a higher fragility level. Such issues are
218 expected to have a strong impact on agronomical practices, as e.g. the choice of
219 genotypes to be included in cropping systems (Ventrella et al., 2007). A search in
220 the literature offers many examples of essential oil crops finding suitable cropping
221 conditions even under such special environmental conditions as drought (thyme,
222 oregano, and milk thistle), extreme pH soil conditions (chamomile > 9.2 and Erica
223 spp. < 4.0), or very high soil salinity levels (chamomile and liquorice). A few essen-
224 tial oil crops (vetiver, rosemary, and thyme) have even been successfully used to
225 consolidate soils at risk of erosion (Bagarello et al., 2004; Durán Zuazo et al., 2004).

226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236**This figure will be printed in b/w**237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270

Fig. 2 Many essential oil crops may grow and produce under erratic climatic conditions. In the photo: sage (*Salvia officinalis* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) after a rare snowfall in western Sicily. (Photo: A. Carrubba)

The features above allow to suggest the introduction of selected essential oil crops in marginal farming systems as a proper and sustainable exploitation strategy (Carrubba and Catalano, 2007). Moreover, looking at the overall question from a wider point of view, some further remark is possible. The key concepts of the leading strategies used for the sustainable development of marginal lands are basically two: integration and diversification. First, all the intervention methods feasible for the development and exploitation of environmental resources of rural lands, especially when “marginal”, must pay great attention to the integration of economic development, social development, and environmental protection as “interdependent and mutually reinforcing pillars of sustainable development” (UN, 2002). One of the main goals is to promote all economical activities that fit in unitary production pathways, as well as the production of raw material, including the first transformation, and, whenever possible, the packaging and marketing processes. A tighter linkage between production, transformation, and services for distribution and marketing of the products themselves is encouraged.

Second, the aspect of economic diversification of such areas must be considered. In a context in which the small and medium concerns are mostly represented by family farms, and very often the production relies on one cash crop with a secure albeit low market income, diversification could reduce the risks linked to agricultural practice. This seems to be one of the most concrete and quickest ways practicable for farmers to enhance their income level. Economic diversification, in this context, takes two different forms: diversification of crops and enhancement of the multifunctional role of agriculture. Crop diversification is considered the integration of new species, varieties, and gene pools inside existing agricultural systems, and, in such a sense, it is also encouraged as a useful way to promote biodiversity (COM, 2006; SAN, 2004). The aspect of multifunctional agriculture, on its turn,

Essential Oil Crops for Sustainable Agriculture

271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284**This
figure
will be
printed
in b/w**

285 **Fig. 3** Coriander (*Coriandrum sativum* L.), being greatly attractive to insects, has a potential as a
286 significant honey plant. (Photo: R. la Torre)
287

288
289 recalls the new role that is today assigned to agriculture, which is also the satisfac-
290 tion of different needs, not only from the agricultural community, but also from
291 society as a whole. According to its new role, besides ensuring food and fiber pro-
292 duction, agriculture should also contribute to environmental safeguards, to the sup-
293 ply of recreational services, to the creation of alternative opportunities for income
294 and employment for the farmers, etc.

295 Do essential oil crops fit into such a framework? An answer must first take
296 into consideration the basic property of these crops, that is, their aptitude to be
297 transformed. Interest in crops having good industrial potential, capable of pro-
298 ducing valuable chemicals to address most industrial sectors' needs, known as
299 "botanochemicals" (Buchanan et al., 1980) – a term that did not receive the dif-
300 fusion and spread it deserved – is growing worldwide. Although essential oil crops
301 are mostly used for the direct seasoning of foods, a major interest is nowadays com-
302 ing from their potential as raw material for the production of food flavorings, addi-
303 tives, or industrial raw materials. This entails a higher degree of transformation (and
304 therefore a higher market price) compared with fresh herbs. The use of low-cost
305 on-farm equipment could help farmers increase their income by retaining on-farm
306 the added value of the transformation process, developing in this way small, local,
307 agrofood industries. Interest in this area has already been seen in the USA (Quinn
308 et al., 1998), the West Asian and North African drylands (Amri et al., 2006), and in
309 Europe (Cristóbal et al., 2005). Here, many "minor", "alternative", or "uncommon"
310 crops, including essential oil crops, have been suggested to small farmers seeking
311 to diversify their income source.

312 Furthermore, they represent a good opportunity for agrotourist concerns, helping
313 to attract people from urban areas by means of the development of herb-based com-
314 mercial items (handicrafts, oils, extracts, and honey) besides representing a further
315 source of aesthetic land valorization (Deidda and Mulas, 2004; Devecchi, 2006;

316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340

This figure will be printed in b/w



341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360

Fig. 4 The esthetic value of many essential oil crops may play a role in rehabilitative or healing gardens. In the photo: Clary sage (*Salvia sclarea* L.) at full bloom. (Photo: A. Carrubba)

Domizi et al., 2006). It is worth noting that many essential oil crops, due to their special sensory attractiveness, are listed among the species to be utilized in rehabilitative or healing gardens suggested in the therapeutic programs of the newest “horticultural therapy” (Cooper Marcus and Barnes, 1999; Ferrini, 2003).

Of course, the first thing is to improve the economic value of the crops by maximizing their yield and reducing the cost of production. Regarding the first goal, research data show that it is not difficult, nowadays, to obtain good yields from many herbs. In Mediterranean environments, especially when marginal, special attention must be paid to the choice of the species to cultivate and on the cropping technique to apply; however, many such possibilities are available to farmers. Table 1 shows some examples of essential oil crops that could prove useful as crop species in Mediterranean marginal environments.

Some problems arise when the economic feasibility of production processes is considered. Most cropping techniques traditionally used for essential oil crops rely heavily on manpower. Because underdeveloped countries mostly have low labor costs, it is difficult for developed countries to compete because of their relatively

Essential Oil Crops for Sustainable Agriculture

Table 1 Products, active ingredients, and chemotypes identified by literature of some selected essential oil crops grown in Mediterranean areas, according to botanical family

Plant	Utilized part	E.O. content (%)	Main active ingredients of E.O.	Identified chemotypes	References
Apiaceae (ex Umbelliferae)					
Anise (<i>Pimpinella anisum</i> L.)	Fruits ("seeds")	1.5–5	Trans-anethole (80–95%), methyl chavicol, anis aldehyde.		Babulka (2004); Santos et al. (1998)
Caraway (<i>Carum carvi</i> L.)	Fruits ("Seeds")	1.0–9.0	Carvone (45–62%), limonene (35–50%)		Lawrence (1996); Sedláková et al. (2003) and (2003a). Carrubba et al. (2002); Diederichsen (1996)
Coriander (<i>Coriandrum sativum</i> L.)	Fruits ("Seeds")	0.5–2.5	Linalool (60–70%)		Bandoni et al. (1991)
Cumin (<i>Cuminum cyminum</i> L.)	Fruits ("seeds")	2.1–2.7	γ-terpinene (11.4–18.5%), p-cymene (8.8–14.7%), cuminaldehyde (25.1–34.4%)		
Dill (<i>Anethum graveolens</i> L.)	Fruits ("Seeds), herb	2.3–3.5	Carvone (40–60%)	(i) limonene 40–51%, carvone 44–58%; (ii) limonene 31–41%, carvone 25–47%, dillapiole 6–32%; (iii) limonene 37–47%, carvone 18–46%, myristicin 0.2–20%, dillapiole 6–32%	Lawrence (1994); Simon (1993)

Table 1 (continued)

Plant	Utilized part	E.O. content (%)	Main active ingredients of E.O.	Identified chemotypes	References
Fennel (<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.)	Seed, herb ¹	1–6	Anethole Fenchone (bitter fennel only)	(i) anethole >60% a) anethole >66.5%, estragole < 7%; b) anethole >63.5%, estragole 12.5–15%; c) anethole >60%, estragole <7% d) anethole >62%, estragole 8–15%, fenchone 16–25%; (ii) fenchone >30%; (iii) estragole >30%.	Bernath et al. (1996); Carrubba et al. (2005)
Asteraceae (ex Compositae)					
German chamomile (<i>Chamomilla recutita</i> (L.) Rausch.)	Flowers	0.2–0.4	α - and β -bisabolol, bisabololoxide A and B, (pro)chamazulene.	(i) > bisabololoxide A (chem. "A") (ii) > bisabololoxide B (chem. "B") (iii) > α -bisabolol (chem. "C")	Franz (1992); Dellacecca (1996)
French tarragon (<i>Artemisia dracunculus</i> L.)	Leaves, herb.	0.3–3.0	methyl chavicol (70–80%), anethol (10%), trans- β -ocimene (up to 22%), cis- β -ocimene (up to 15%), γ -terpineol (up to 17%), limonene (2–6%).		Arabhosseini et al. (2007); Bruneton (1995); Catzione et al. (1986)

Essential Oil Crops for Sustainable Agriculture

Table 1 (continued)

Plant	Utilized part	E.O. content (%)	Main active ingredients of E.O.	Identified chemotypes	References
Lamiaceae (ex Labiatae)					
Basil (<i>Ocimum basilicum</i> L.)	Leaves	0.04–0.7	Linalool (15–60%), methyl chavicol (0–37%), eugenol (4–40%), 1,8-cineol (1–17%), cinnamic acid, anethole.	(i) linalool; (ii) methyl chavicol; (iii) both linalool and methyl chavicol; (iv) both linalool and eugenol; (v) both methyl chavicol and methyl eugenol.	Ceruti et al. (1993); Elementi et al. (2006); Grayer et al. (1996); Marotti et al. (1996); Sifola and Barberi (2006); Simon et al. (1990)
Calamintha (<i>Calamintha nepeta</i> subsp. <i>nepeta</i> (N), <i>C. nepeta</i> subsp. <i>glandulosa</i> (G))	Leaves, inflorescence	0.4–1.2	Pulegone, menthone, piperitone, piperitone oxide.	(i) high menthone (>40%); pulegone 19%, piperitone oxide <i>trans</i> 8%, limonene 5%; (ii) high piperitone oxide 1%; <i>trans</i> (≅ 30%); limonene 13%, piperitone oxide 12–13%, menthone 9%, pulegone 12%; (iii) high pulegone (≅ 50–56%); menthone 20%, limonene 6%, piperitone oxide <i>trans</i> 1%; piperitone oxide <1%.	Ristorcelli et al. (1996); Baldovini et al. (2000)
Clary sage (<i>Salvia sclarea</i> L.)	Leaves, inflorescence	0.19–0.52	Linalool (15–70%) linalyl acetate (14–77%)		Carrubba et al. (2002a)
Hyssop (<i>Hyssopus officinalis</i> L.)	Flower heads	0.3–0.9	α -pinene (50%)		Ceruti et al. (1993)

Table 1 (continued)

Plant	Utilized part	E.O. content (%)	Main active ingredients of E.O.	Identified chemotypes	References
Lavender and hybrids (<i>Lavandula</i> spp.)	Leaves, inflorescence	1.4–1.6	In <i>L. vera</i> DC: linalool (25–38%), linalyl acetate (25–45%), cineole (0.3–1.5%, camphor (0.2–0.5%)). In <i>L. spica</i> auct.non L.: linalool (25–50%), linalyl acetate (< 3%), cineole (30–40%), camphor (8–20%) In <i>L. x intermedia</i> Emeric ex Loisel: linalyl acetate (28–38%), cineole (4–7%, camphor (6–8%)). Neral, geranial, germacrene-D	(i) linalool >30%; (ii) linalyl-acetate >30%; (iii) lavandulyl-acetate >25%	Bruneton (1995); Ceruti et al. (1993); Tucker et al. (1984)
Lemon balm (<i>Melissa officinalis</i> L.)	Leaves	0.05–0.2			Ceruti et al. (1993)
Mint (<i>Mentha</i> spp.)	Herb, leaves	In <i>M. x piperita</i> L. var. <i>citrata</i> 1.2–1.4 on the whole plant, 2.5–2.8 on leaves.	Carvone, menthol, menthyl acetate, pulegone, linalool, linalyl acetate, 1,8-cineole	in <i>M. x piperita</i> L. var. <i>citrata</i> (Ehrh.) Briq.: (i) >linalool, <linalyl-acetate; (ii) >linalyl-acetate, <linalool in <i>M. pulegium</i> L.: (i) pulegone; (ii) pulegone-menthol; (iii) carvone-pulegone.	Ben Fadhel et al. (2006); Bruneton (1995); Diaz-Maroto et al. (2003); Malizia et al. (1996); Simon (1993); Paris et al. (1974)

496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540

Essential Oil Crops for Sustainable Agriculture

541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585

Plant	Utilized part	E.O. content (%)	Main active ingredients of E.O.	Identified chemotypes	References
Oregano (<i>Origanum</i> sp.)	Inflorescence	0.5–4.0	Thymole Carvacrole	(i) high thymole; (ii) high carvacrole	De Mastro et al. (2004); Melegari et al. (1995)
Rosemary (<i>Rosmarinus officinale</i> L.)	Leaves, inflorescence	1.5–3.5	α -pinene, camphor, 1,8-cineole, borneol, bornyl acetate, verbenone	(i) cineoliferum (high 1,8-cineole); (ii) camphoriferum (camphor >20%); (iii) verbenoniferum (verbenone >15%).	Angioni et al. (2004); Carubba et al. (2006a); Ceruti et al. (1993); Cioni et al. (2006); De Mastro et al. (2004a)
Sage (<i>Salvia officinale</i> L.)	Leaves, inflorescence	0.3–0.6	α - and β -thujone, 1,8-cineole, eucalyptol, linalyl acetate	α - thujone/ β - thujone ratio: (i) 10:1 α/β , (ii) 1.5:1 α/β , (iii) 1: 10 α/β .	Ceruti et al. (1993); Dudai et al. (1999); Perry et al. (1999)
Savory (winter) (<i>Satureja montana</i> L.)	Inflorescence	0.5–1.0	Carvacrole Thymole	In <i>S. montana</i> : (i) high thymole (ii) high carvacrole	Bruneton (1995)
Savory (summer) (<i>S. hortensis</i> L.)					
Thyme (<i>Thymus vulgaris</i> L.; <i>Thymus capitatus</i> (L.) Hoffm. & Link = <i>Thymbra capitata</i> L. (Cav.))	Leaves, inflorescence	0.5–1.5	Carvacrole Thymole	According to the prevailing occurrence of: (i) thymole (ii) carvacrole (iii) geraniol (iv) linalool (v) α -terpineol (vi) <i>trans</i> -4-thujanol and <i>cis</i> -8-myrcenol (vii) cineol	Bruneton (1995); Catizone et al. (1986); Granger and Passet (1973); Rodrigues et al. (2006)
Rosaceae					
Rose (<i>Rosa damascena</i> L., <i>R. centifolia</i> , <i>R. Gallica</i>)	Flowers	0.03–0.04	(-)- β -citronellol (38%), geraniol (14%), nerol (7%), eugenol (1%)		Retamar (1993)

¹Only used for domestic purposes.

586 higher labor costs. For this reason, intensive cultivation with irrigation, adoption of
587 improved varieties, and more effective cropping techniques and postharvest tech-
588 nologies (including better methods of dehydration) could lead to improvements in
589 the productivity of such crops and also minimize the cost of production processes.

590 Another important concern, especially when the products are expected to be used
591 for industrial transformation, is improving their quality. It is likely that in the near
592 future, greater market penetration will be achieved by selling a higher-quality prod-
593 uct, with control of microflora contamination, an improved shelf life, a guaranteed
594 level of active ingredients, and produced according to set guidelines (with few or
595 no pesticides). Growing such crops with organic cropping techniques (governed by
596 the EU) that may offer a substantial safety guarantee to buyers and consumers is an
597 important opportunity for farmers.

601 3 Essential Oil Production in Plants

602
603 In plants, essential oils are generally recognized as secondary metabolites. Chem-
604 ically, their primary components are terpenes (mono- and sesquiterpenes, and to a
605 lesser extent diterpenes) and aromatic polypropanoids, synthesized via the shikimate
606 and mevalonate pathways (Croteau et al., 1986; Lamarti et al., 1994; Sangwan et al.,
607 2001; Simon, 1990). The shikimate pathway intermediates and aromatic amino
608 acids are precursors of a large number of secondary plant products (Herrmann,
609 1995; Kutchan, 1995). Each essential oil generally retains the organoleptic charac-
610 ters (taste and flavor) of the parent plant, and the special and unique aroma pattern
611 of each plant species is provided by the characteristic blending of its aromatic com-
612 ponents. This explains the huge number of fragrances that are available in nature
613 and the fact that, in practice, industry considers each a whole raw material rather
614 than a mixture of different chemical principles (Salvatore and Tateo, 1992).

615 Minimal variations in the ratio among components may generate important mod-
616 ifications in the aromatic profile of the essential oil. These are sometimes too small
617 to be instrumentally detected, but large enough to be perceived by human senses.
618 Many techniques have been developed to characterize the essential oils obtained
619 from plants, and much effort has been devoted to studying their biological activities.
620 Being secondary plant metabolites, their production in plants could vary with the
621 environment (Sangwan et al., 2001; Bruni, 1999) and with the ability of the plants
622 to allocate their resources. For example, crops that produce mainly primary metabo-
623 lites would have high seed yields in favorable environments, and crops that produce
624 high quantities of secondary metabolites would have high essential oil yields in
625 unfavorable environments (de la Fuente et al., 2003). A further complication is the
626 existing dynamic relationships between primary and secondary plant metabolism,
627 where when there is a demand, the secondary compounds may be recycled back
628 into primary metabolites (Collin, 2001).

629 Considerable research has been undertaken into essential oil production in plants,
630 utilizing a large number of plants and many different technical and scientific

Essential Oil Crops for Sustainable Agriculture

631 approaches. Attention has also been paid to the simultaneous formation of dif-
632 ferent compounds within the plants that might affect the results of this research.
633 Bouwmeester et al. (1995) argued that the formation of carbohydrates in seeds
634 would result in an apparent increase of essential oils, even if essential oil forma-
635 tion itself has not been affected. The authors suggested that to avoid confusion, the
636 absolute amount of essential oil in each seed should be referred to. However, the
637 available literature indicates that the classical volume/weight percentage is by far
638 the most often used method worldwide.

639 Essential oils are produced by plants for many reasons, including the attraction of
640 pollinating insects (Lodi, 1986), repelling noxious insects by means of toxic, repel-
641 lant, and antifeedant activities (Van Beek and de Groot, 1986; Simmonds, 1997;
642 Bottega and Corsi, 2000), improving plant disease resistance (Goidanich, 1981),
643 allelopathic effects that could be involved in interspecific competition mechanisms
644 (Raven et al., 1979), or increasing drought resistance in semi-arid environments
645 (Fluck, 1955; Munné-Bosch and Alegre, 2001). They are produced and stored in
646 specialized plant structures that are distributed over the plant's entire epidermis or
647 in special organs. These include the sacs or ducts of the epidermis in citrus peels or
648 *Eucalyptus* leaves, or the glands and glandular trichomes originating from epider-
649 mal cells in *Labiatae* (D'Andrea, 2006; D'Andrea and Circella, 2006; Maleci Bini
650 and Giuliani, 2006; Sangwan et al., 2001; Weiss, 1997).

651 Essential oils are processed from plants using distillation or extraction. Steam
652 distillation is the most common method used by commercial-scale producers, and
653 uses heat from steam or water to break the oil glands in plants and vaporize the
654 oil, which is then condensed and separated from the wastewater. Distillation can
655 be undertaken using on-site facilities, mobile units that come to the farm, or on-
656 farm equipment that requires a significant, but not impossible, capital investment.
657 Sometimes the waste, which retains many of the organoleptic traits of the herb, finds
658 some market opportunity. For example, the wastewater from oregano distillation is
659
660



661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674 **Fig. 5** *Thymus longicaulis* Presl. In evidence the essential oil glands in leaves. (Photo:
675 R. Bontempo)

This
figure
will be
printed
in b/w

676 usually sold in Turkey as “Kekik suyu”, which is claimed to have positive digestive
677 effects. The possibility has also been suggested that distillation wastewaters could
678 be submitted to a further extraction process to recover a greater amount of essential
679 oil (Rajeswara Rao et al., 2005). Several new processing facilities for oil extrac-
680 tion have been reported in the literature. For example, supercritical carbon dioxide,
681 microwave-assisted hydrodistillation, or novel solvent extraction techniques (Joy
682 et al., 2001; Kosar et al., 2005; Platin et al., 1994; Riela et al., 2008; Sedláková
683 et al., 2003) have been suggested, but in many cases their costs are prohibitive for
684 on-farm realization.

685
686

687 **4 Cultivation of Essential Oil Crops: Goals and Constraints**

688

689 In order to improve the economic competitiveness of essential oil crops, the first
690 important step is to state the goals for such cultivation. There is a considerable
691 difference between cultivation for producing herbs, essential oils, or secondary
692 metabolites dealing with some biological activity. Generally speaking, these may
693 be thought of as subsequent steps, with each product representing the raw material
694 for the following industrial pathways. Consequently, the income level that may be
695 obtained from passing one type of product to the following processing step will vary
696 (Carrubba et al., 2006c). As an example, dried rosemary is a commercial herb *per se*,
697 but it may also be considered the starting material for the production of an essential
698 oil, which may further represent the raw material for the extraction of some active
699 principles dealing with antioxidant properties. Each single step:

700

- 701 (1) requires a higher technical refinement than the preceding one,
 - 702 (2) confers to the obtained product a higher degree of economic value, and
 - 703 (3) possesses very specific quality standards to which each product must conform.
- 704

705

706 Usually, the income derived from producing the raw material for one step varies
707 from that of another. This is because of the different levels of expertise required
708 when shifting from an agricultural to a more industrial process. Retaining as many
709 production steps as possible on-farm would enable farmers to obtain higher added
710 value, which could prove a great advantage.

711 The first economic interest in essential oils is oriented towards the industrial
712 exploitation of their naturally occurring actions, that is, the activity due to their
713 aromatic, insecticidal, antioxidant, and antimicrobial compounds. These would be
714 mostly used as natural products in food, cosmetics manufacturing, and preserva-
715 tion. In fact, many papers have been published worldwide regarding the numerous
716 properties of essential oils. For example, in 2003, Kalemba and Kunicka estimated
717 that more than 500 works had been published just concerning their antimicrobial
718 activity. It is likely that this number has now been greatly surpassed.

719

720 The scientific finding that an essential oil possesses some specific activity
(antimicrobial, antioxidant, etc.) does not represent *per se* certainty of its suitability

Essential Oil Crops for Sustainable Agriculture

721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742

743 **Fig. 6** Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) has been largely studied for its antioxidant properties.
744 (Photo: A. Carrubba)

745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765

to industrial use. In order to find a suitable use, every plant extract must retain very specific characteristics, roughly summarized by the triple constraint “quality–security–effectiveness” (Franz, 1996), i.e., it is necessary that the products derived from it must fulfill adequate and constant quality standards, address consumers’ concerns regarding the safety of their use, and be satisfactorily effective. Regarding the last requirement, some concern is related to the amount that needs to be added to the various industrial items to show a good effectiveness of use. As an example, when essential oils are intended as antioxidants for food manufacturing, in order to have a satisfactory effectiveness they must be added to foodstuffs in very large amounts. This inevitably leads to a modification of the taste and flavor of the products to which they are added. For this reason, they may only be added to a limited number of suitable food items (Roller, 1995; Brul and Coote, 1999). In cases in which the typical scent of a given herb is unpleasant, a recent possibility is offered by deodorized extracts, endowed with technical properties identical to those of the starting plant material, but absolutely free from its typical odor. As an example, starting from rosemary extracts, some antioxidant mixtures have already been patented, produced, and sold, such as GUARDIAN™ (Danisco Co. Ltd., Denmark).

This
figure
will be
printed
in b/w

5 Factors Affecting Essential Oils Yield and Composition

766 Because the first goal of cultivating essential oil crops, whatever their final use, is
767 to obtain adequate amounts of plant material, biomass productivity is obviously the
768 first target. Many studies have been performed around the world to improve various
769 aspects of productivity of essential oil crops and the role of agronomic practices on
770 yield (Pank, 1993; Carrubba et al., 2006; 2006c). It must be considered, however,
771 that when quality aspects are concerned, conclusions may be dramatically different
772 from those concerning bare quantitative aspects. In some cases, the same factors
773 positively affecting the biomass yield of one herb might exert a negative action on
774 its quality features. This is the reason why a decision about the goal of cultivation
775 should be taken as the first priority. In so doing, the same species could be cultivated
776 according to different cropping protocols that would depend on the kind of product
777 to be obtained.
778

780 Many factors are claimed to exert an influence on the yield and chemical com-
781 position of essential oils. Generally, these factors are classed as “endogenous” and
782 “exogenous”. The first group includes all characteristics natural to the plant, such
783 as its genetic constitution, but also other nongenetic factors such as its age or
784 development stage. The second group includes all external factors that plants may
785 experience during their growth cycles (Bruni, 1999). Both groups have extremely
786 variable effects on essential oil quantity and quality. First, it has been ascertained
787 that certain essential oil components are more sensitive than others to variations in
788 plant characteristics and environmental conditions. This is the case with some ter-
789 penic compounds such as α -pinene, p-cimene, α -terpinene, and linalool in coriander
790 (Carrubba et al., 2002), or α -thujene, α -terpinene, β -phellandrene, and camphor in
791 fennel (Carrubba et al., 2005). These were of the greatest importance in the assess-
792 ment of the variability of essential oil composition, whatever its source (geographic
793 provenance, crop management, and age of the samples).
794

5.1 Endogenous Factors: The “Inner” Sources of Variability

799 Because the essential oil composition is governed by the biosynthetic pathways
800 (which are under enzymatic control) that act in plant metabolism, it is undoubtedly
801 genetically determined. Studies performed on the heritability of qualitative essential
802 oil traits have ascertained that the biosynthesis of certain compounds (such as pro-
803 chamazulene or bisaboloids in chamomile) underlies a simple Mendelian behavior
804 (Franz, 1992). The studies found that an “aut/aut” law applies (they may or may
805 not be there) and allowed the deduction that the compounds are determined by only
806 one (or few) gene(s). Other compounds are, instead, under polygenic control, and
807 the continuous conversion from one compound to another (such as the shifts among
808 the various bisaboloid forms in chamomile) may explain the occurrence of interme-
809 diate chemotypes dealing with different amounts of the above compounds (Franz,
810 1992; Wagner et al., 2005). On this genetic basis, however, all the other factors play

Essential Oil Crops for Sustainable Agriculture

811 some role, and a great deal of experimental work has been carried out on this sub-
812 ject. Concerning the nongenetic endogenous factors, it is generally acknowledged
813 that most aromatic plants gain their maximum levels both in yield and in the quality
814 of their essential oils when they are close to the blooming stage (sometimes at the
815 beginning, sometimes at the end). A higher essential oil content near flowering was
816 noted for oregano (Ietswaart, 1980; Putievsky et al., 1988), peppermint (Dellacecca,
817 1996), *Artemisia annua* (Chalchat et al., 1994), *Thymbra spicata* (Müller-Riebau
818 et al., 1997), *Thymbra capitata* (Rodrigues et al., 2006), and *Ocimum basilicum*
819 (Macchia et al., 2006). In some cases, it was also confirmed when the commer-
820 cial product was formed by parts of the plants other than the flowers (Shultz and
821 Stahl-Biskup, 1991). This general feature is not always so definite, and a different
822 tendency was observed in *Salvia officinalis*, in which oil obtained from shoots col-
823 lected in May (i.e., at flowering) was 1.6 mL kg⁻¹, much less than the 4.7 mL kg⁻¹
824 achieved when harvested in September (Scartezzini et al., 2006). Similarly, in clary
825 sage (*Salvia sclarea* L.) an increase in the essential oil content of inflorescences was
826 found when they were passing from the full blooming stage to the seed ripening
827 stage (Carrubba et al., 2002b). In trials carried out on basil, maximum oil yield was
828 obtained at the 50% seed set stage (Sangwan et al., 2001).

829 Ontogenetic development may also influence the biosynthetic pathways of oil
830 constituents (Piccaglia et al., 1991), and therefore their relative quantities in the
831 essential oils. In peppermint (*Mentha × piperita* L.), the (-)-menthone content was
832 found to decrease and (-)-menthol content was found to increase during the vege-
833 tative cycle (Bruneton, 1995). *Thymbra spicata* showed an increase in the concen-
834 tration of phenols, especially carvacrol, from spring to mid-summer (June–July),
835 when the plants had reached full blooming (Müller-Riebau et al., 1997). In clary
836 sage, moving from full blooming to seed ripening resulted in a significant increase



853 **Fig. 7** Many essential oil crops reach their maximum essential oil content at flowering time. In
854 the photo: Oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart) at full blooming. (Photo:
855 A. Carrubba)

This
figure
will be
printed
in b/w

856
857
858
859
860
861This
figure
will be
printed
in b/w862
863
864
865
866
867
868
869870
871
872

Fig. 8 In sage (*Salvia officinalis* L.), the essential oil obtained from younger leaves has a different composition with respect to older leaves. (Photo: A. Carrubba)

873
874
875
876
877
878
879
880

in some important oil compounds, e.g., linalyl acetate, which was found to vary from 35% to 53% (Carrubba et al., 2002b). In common sage (*Salvia officinalis* L.), a delay in the collection of shoots from May to September resulted in a decrease of α - and β -thujone and camphor in the oil, and therefore to an improvement in oil quality (Scartezzini et al., 2006). Significant variations in essential oil components with the growth stages of plants were also assessed in leaves of both *Ocimum basilicum* (Macchia et al., 2006) and *Coriandrum sativum* (Smallfield et al., 1994).

881
882
883
884
885
886
887

Irrespective of development stage, in perennials, the age of the plant seems to play some role as well: oils extracted from *Lavandula spica* Vill. (Carrasco, 1980) and peppermint (Dellacecca, 1996; Gruszczuk, 2004; Piccaglia et al., 1993) have shown important variations both in yield and composition from one year to the next. Probably due to a similar mechanism, several trials on sage found significant differences between oil yield and composition in lower (older) leaves compared with upper (younger) leaves (Bezzi et al., 1992; Dudai et al., 1999).

888
889
890

5.2 Exogenous Factors: Variability Due to the Environment

891
892
893
894
895
896
897
898
899
900

The second group of factors (“exogenous”) includes all growing and environmental conditions (e.g., temperature, daylength, quality of light, soil and air moisture, wind patterns, and nutrient levels) that may exert some direct or indirect influence on essential oil production and accumulation in plants. Such an effect may be more or less intense, e.g., being more important in species having a more superficial location of oil storage structures, such as the glandular trichomes in *Labiatae* (Bruneton, 1995). Studies regarding the effect of climate on yield and composition of secondary metabolites are many, and have often led to interesting results. For example, the common belief that aromatic plants possess a stronger aroma when

Essential Oil Crops for Sustainable Agriculture

grown under arid and sunny climates seems to find a scientific basis from the demonstrated increased activity of the phenylalanine ammonia lyase (PAL) enzyme under these prevailing climatic conditions. This is because PAL causes protein synthesis to shift towards the production of phenols, which are the major compounds responsible for the aromatic features of essential oils (Landi, 1994). A relationship between various climatic indexes and the occurrence of certain chemotypes was noted for *Thymus piperella* L. (Boira and Blanquer, 1998).

However, if studies concerning climatic conditions as a whole are interesting in the assessment of the distribution of a certain genotype, great scientific interest is linked to ascertaining the environmental trait responsible for a given action on essential oil biosynthesis. This is quite a difficult task, especially in Mediterranean areas where chemical polymorphism is important (Boira and Blanquer, 1998) and its relation with environmental factors is the subject of a deep debate.

Temperature surely plays a crucial role, and since all secondary metabolites are the result of a series of biochemical steps, each with its own optimal temperature, it is possible that the best temperature for obtaining a specific compound is the one resulting from the optimal temperature levels for the single reactions (Catizone et al., 1986). High (but not excessive) temperatures are considered, as a whole, to be best for producing essential oils, a result validated by much experimental data on *Pelargonium* spp. (Motsa et al., 2006) and chamomile (Bettray and Vömel, 1992). The composition of essential oils in relation to temperature has been studied as well, and, for example, in chamomile, the (-) α -bisabolol, pro-chamazulene, and apigenin content in flowers increased significantly when the temperatures were raised from 16 °C to 20 °C to 26 °C (Bettray and Vömel, 1992).

Because secondary metabolites are a side effect of photosynthetic activity, it may be expected that variations in light duration, intensity, and quality can affect their production in plants. Generally speaking, plants growing under good illumination



Fig. 9 In essential oil from Chamomile (*Chamomilla recutita* Rausch.) some compounds show an increase with temperature. (Photo: A. Carrubba)

This
figure
will be
printed
in b/w

946 exhibit an increase in oil yield with respect to the same plants grown in shade. This
947 feature was demonstrated in *Pelargonium*, both in whole plants (Kaul et al., 1997)
948 and in tissue cultures (Brown and Charlwood, 1986), where the oil obtained from
949 tissue cultures of *Pelargonium fragrans* exhibited 50% limonene in dark-grown
950 tissue cultures compared with 5% limonene in the oil extracted from the parent
951 plants. A general biochemical explanation of the higher amount of esters (highly
952 aromatic substances) in plants grown in sunny areas suggests that the photolysis
953 reaction, by eliminating the water molecules obtained from the esterification pro-
954 cesses inside plants, would stabilize esters in the plants themselves (Catizone et al.,
955 1986). Photoperiod was also noted as a crucial factor in oil production and composi-
956 tion, and a long photoperiodic treatment was responsible for an increased amount of
957
958



989 **Fig. 10** Few essential oil crops have a satisfactory number of commercially available improved
990 varieties. (Photo: A. Carrubba)

991 *cis*-sabinene hydrate in marjoram oil (Circella et al., 1995) and higher menthol con-
992 tent in some mint species (Fahlén et al., 1997), probably due to a favored conversion
993 of menthone to menthol in the leaves (Voirin et al., 1990).

994 The effect of light quality was taken into account by Maffei et al. (1999), whose
995 data demonstrate that UV-A radiation on peppermint during the day generates an
996 increase in total leaf area and total essential oil content, menthofuran, and menthol.

997 Many other examples could be considered to demonstrate the importance of envi-
998 ronmental factors in assessing (alone, in interactions with themselves, or in geno-
999 typic interactions) the various quality aspects of essential oil crops. It is not incor-
1000 rect to note that cropping techniques are also an important source of variation in the
1001 growth of plants, and that a difference in crop management may therefore generate
1002 important variations in plant biochemistry and quality.

1003

1004

1005 **6 Breeding Activity**

1006

1007 Research into the breeding and genetic improvement of essential oil crops has been
1008 sparser than the efforts expended on other crops such as cereals, and much work
1009 remains to be done: genetic variability in essential oil crops is considerable and
1010 scarcely explored, and a great possibility exists to use this variability for future
1011 breeding programs. Notwithstanding, the literature shows many examples of screen-
1012 ing, selection, and breeding processes of essential oil crops, utilizing various tech-
1013 niques ranging from traditional crossing and selection methods (Dudai et al., 1999;
1014 Landi, 1994; Landi and Bertone, 1996) to the most advanced biotechnology pro-
1015 grams (Shetty et al., 1996; Novak, 2006).

1016 Efforts into breeding essential oil crops may take one of two different approaches
1017 (sometimes both): genetic improvement for crude yield and genetic improvement for
1018 one, or more, selected qualitative features. In many cases, unfortunately, it seems
1019 that most of the results of breeding and selection efforts are still unavailable to
1020 farmers; very few essential oil crops may show satisfactory availability of certified
1021 reproduction material, and most are cultivated using locally grown ecotypes, devot-
1022 ing little interest to the choice of the best genotype.

1023

1024

1025

1026 **6.1 Breeding for Biomass Yield**

1027

1028 The approach oriented to the obtainment of high crude yield involves selection for
1029 enhancing the biomass yield of a certain plant, or its marketable part (seeds, roots,
1030 or flowers). That means, the plant's growth mechanisms should be pushed to the
1031 highest efficiency in exploiting environmental resources. Some authors (McConnell
1032 and Anderson, 2002) call attention to the generally low environmental plasticity of
1033 some of the crops above, in that behaving as "weedy" species does not enable them
1034 to succeed in exploiting environmental resources, and they improve performance
1035 under low fertility conditions. This is the case for some species grown for fruit

1036
1037
1038
1039
1040
1041
1042
1043
1044
1045
1046**This figure will be printed in b/w**1047
1048
1049

1050

Fig. 11 Indeterminate growth habit may be a problem in many essential oil crops. In the photo: Coriander (*Coriandrum sativum* L.) plants bearing flowers and seeds at different ripening stages. (Photo: A. Carrubba)

1051
1052

1053

1054

1055

1056

(“seed”), such as coriander and dill, where higher fertility conditions push towards an enhancement of biomass production, consequently reducing seed yield.

1057

1058

It is likely that much work remains to be done to develop genotypes more capable of “capitalizing” on environmental resources, and therefore to react more positively to technical inputs such as fertilization.

1059

1060

1061

1062

1063

1064

1065

1066

1067

1068

1069

1070

1071

1072

1073

1074

1075

1076

1077

In fact, many of the most common essential oil crops bear morphobiological traits originating from their adaptation to growing in the wild, and that retaining such traits often sets limits to their agronomic suitability. Breeding was, therefore, also addressed to solve some agronomic problems that may arise in cultivation, such as seed dormancy, indeterminate growth habit, or lodging tendency (Holm and Slinkard, 2002; Langbehn et al., 2002). Seed dormancy may be an important concern when planning and managing sowing operations, and strategies to cope with this inconvenience may vary depending on whether it is caused by physical (such as thickness or special traits of the outer seed layer, which is easily fixed by seed scarification) or physiological mechanisms. A few studies have been oriented towards the study of the mechanisms underlying seed germination, and, although information is far from complete, some interesting conclusions may be drawn. For example, it has been ascertained that in some species, especially those bearing small seeds, the germination process is tightly dependent upon light, showing a strong inverse correlation with the depth of planting (Benvenuti et al., 2006). In other studies, the use of hormones such as gibberellic acid has shown good effects on breaking dormancy in seeds of *Lavandula angustifolia* Mill. (Macchia et al., 1996).

1078

1079

An indeterminate growth habit is considered an important adaptive trait to extend the reproductive period and ensure reproductive success for plants in environments

1080

Essential Oil Crops for Sustainable Agriculture

1081 in which the availability of water in the soil is variable and unpredictable (Arnon,
1082 1992). Similar to seed dormancy, this is a very common trait correlated to the lack
1083 of genetic amelioration in many essential oil species, especially in the *Apiaceae*,
1084 but also in other families. It is mostly considered unwelcome because the presence
1085 of reproductive organs at various stages of development in plants may be a serious
1086 constraint to the mechanization of harvest.

1087 In some species, the results of breeding activity addressed to solve these agro-
1088 nomical problems and enhance plants productivity have been rather satisfactory:
1089 due to the efforts of research centers, e.g. from Canada (Blade and Slinkard, 2002)
1090 and India (Kallapurackal and Ravindran, 2005), in a few annuals such as coriander,
1091 caraway, fennel, and dill, some improved material is already available. Similarly,
1092 high-yielding clones of essential oil perennial species such as rosemary, lavender,
1093 or thyme have been selected (Catizone et al., 1986; Mulas et al., 2002; Rey, 1992;
1094 Verlet, 1992). Additional efforts should be oriented to a wider diffusion of such
1095 improved genotypes.

1096 1097 1098 **6.2 Breeding for Qualitative Traits**

1099
1100 Concerning breeding for essential oil yield and chemical characteristics, intense
1101 research has been conducted worldwide, and many plants have been studied to
1102 investigate the composition of their oils to detect the occurrence of valuable and
1103 stable chemotypes. Chemotypes, or “chemical breeds” (Bruneton, 1995) are groups
1104 of individuals within each species that even while bearing the same morphological
1105 structure may be distinguished according to special characteristics of their chemical
1106 traits. Studies in this direction have led to the establishment of a new discipline:
1107 the study of plant classification called chemotaxonomy (Granger and Passet, 1973;
1108 Granger et al., 1973; Weiss, 1997).

1109
1110 Of course, the choice of the most proper chemotype, suitable for a selected mar-
1111 ket sector or industry, could be crucial for the commercial success of the species
1112 to be cultivated. Table 1 shows some of the chemotypes found in various essential
1113 oil crops from the available literature; examples are given for thyme, oregano, and
1114 lavender, which are targeted to the many studies characterizing and exploiting their
1115 essential oils (Verlet, 1992).

1116
1117 Breeding activity regarding chemical oil characteristics has been primarily
1118 directed to the selection of genotypes having high quantities of special compounds
1119 with a particular economic value or considered primarily responsible for the aromatic
1120 properties of the essential oil, such as *cis*-sabinene hydrate in marjoram
1121 (Langbehn et al., 2002), and chamazulene and bisabolol in chamomile (Franz,
1122 1992). Otherwise, it was directed towards obtaining genotypes with a low content
1123 of unwanted compounds, such as thujone in sage or elemicin in tarragon (Catizone
1124 et al., 1986). Also in this case, a further diffusion of these improved genotypes would
1125 be of great practical interest.

1126

1127

1128

1129

1130

1131

This figure will be printed in b/w

1132

1133

1134

1135

1136

1137

1138

1139

1140

1141



1142

1143

1144

1145

1146

1147

1148

1149

1150

1151

1152

1153

1154

1155

1156

1157

1158

1159

1160

1161

1162

1163

1164

1165

1166

1167

1168

1169

1170

Fig. 12 Emergence may be a crucial factor in the establishment of essential oil crops. In the photo: a germinating fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) plantlet. (Photo: R. la Torre)

7 Cropping Technique and Quality Traits

Because they act to modify the growth environment of plants, cropping techniques are often crucial in assessing many quality traits of essential oil crops; a search of the literature shows a major influence of agronomic factors on their yields and essential oil composition. Hence, the choice of cropping technique must be straightforward and fit into the rotations and mechanization of the farm. However, it appears that much effort must still be applied to the development of seed selection, breeding, harvesting technology, distillation technology, and organic production.

7.1 Propagation and Planting Management

Many essential oil crops (such as hybrid peppermint) are sterile; hence, they must be propagated vegetatively by rhizomes, stolons, or plant parts. When seed propagation is possible, it could present an interesting opportunity for farmers. However, the choice of propagation method is claimed to exert a significant effect on the quality traits of many essential oil species. When the crops are open-pollinated, their seeds often produce plants that are not homogeneous for growth or aroma. Bruneton (1995) reports, as an example, significant variations in the chemical composition of essential oil obtained from lavender plants propagated by seed or vegetative multiplication, and he concludes that the second method is more suitable for cultivating plants bearing constant selected morphological, biological, and qualitative characteristics. The use of direct seeding in the field is a rather difficult practice for perennials, because, as experienced for sage (Caligani and Adamo, 1987), their

Essential Oil Crops for Sustainable Agriculture

1171
1172
1173
1174
1175
1176
1177
1178
1179
1180
1181
1182
1183
1184

Fig. 13 A proper settlement of rows and inter-row distances has a major importance in crop management. In the photo: 1-year-old Oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart) at full blooming. (Photo: M. Militello)

1188
1189

generally slow establishment in the field causes many problems concerning competition with weeds.

In addition, planting methods (population density, arrangement in space, time of sowing, or planting) may be crucial for obtaining the best cultivation results. Plant population is important because essential oil crops may have varying responses to increases in intraspecific competition. In sage, a higher plant density was accompanied by a lower unitary plant biomass, because of a lower number of leaves per plant and a smaller leaf size, but the higher number of plants per unit area seemed to compensate for this feature (Bezzi et al., 1992). Similarly, many species cultivated only for plant biomass (such as sage, oregano, rosemary, and thyme) seem to react positively to an enhancement of plant population provided there is a satisfactory level of water and nutrients in the soil (De Mastro et al., 2006). It is not clear, however, if such a positive response in terms of aerial biomass is accompanied or not (and if it is, to what extent) by modifications in essential oil composition. Some results regarding this may have been obtained for peppermint (Dellacecca, 1996), in which variations both in yield and content of essential oils were assessed with varying plant populations. However, in oregano, a decrease in essential oil yield with higher plant density seemed to be mostly due to a higher percentage of stems and woody parts (having a lower essential oil content) in the harvested material (Scarpa et al., 2004).

Concerning planting date, many annual essential oil species (anise, cumin, and coriander), being fairly sensitive to frost and cold, are usually sown in spring. Notwithstanding, in Mediterranean environments, in which climatic patterns are characterized by mild winter temperatures, a prevailing distribution of rainfall in autumn and winter, and severe drought periods in spring and summer, an earlier sowing date is claimed to exert a major effect on the establishment of crops. This

1210
1211
1212
1213
1214
1215

This figure will be printed in b/w

1216 is because it allows plants to grow when the water content in the soil is still sat-
1217 isfactory, i.e., before drought occurs. In any case, an earlier intervention allows,
1218 generally speaking, a higher stand uniformity and plant population, and therefore
1219 higher biomass yields (Catizone et al., 1986).

1220 This general statement seems especially important in annual crops, since sow-
1221 ing date may influence the timing of harvest. This, in turn, may be very important
1222 both for quantitative and qualitative aspects of production. The advantage of an ear-
1223 lier sowing date, well assessed in coriander (Carrubba et al., 2006b; Luayza et al.
1224 1996), fennel (Leto et al., 1996; Masood et al., 2004), anise (Zehtab-Salmasi et al.,
1225 2004), and cumin (Mirshekari, 2004), could be due to the progressive lengthening
1226 of the vegetative growth stages, especially those immediately preceding the onset of
1227 flowering, the duration of which has shown a high direct correlation with yield in
1228 some experiments (Carrubba et al., 2006b).

1229 In perennials, experimental findings seem to give the same results, and under
1230 semi-arid climatic conditions, there is a substantial agreement on the necessity to
1231 make the planting date close to rainy periods, even when the crop is managed under
1232 irrigation (Rajeswara Rao, 1999). Such a choice allows a better establishment of
1233 crops, e.g., in peppermint it allowed the formation of many runners and an ear-
1234 lier canopy closure, which resulted in higher biomass yields when compared to a
1235 spring-planted crop (Piccaglia et al., 1993). A similar result may be found con-
1236 cerning essential oil yields, which clearly showed a decrease with a postponement
1237 in sowing date for peppermint (Piccaglia et al., 1993), dill (Hornok, 1980), anise
1238 (Zehtab-Salmasi et al., 2004), and cumin (Mirshekari, 2004). In coriander, sowing
1239 date seemed to have a slight influence on oil composition (Carrubba et al., 2006b).

1240

1241 7.2 Weed Management

1242

1243 This is one of the major constraints on the cultivation of essential oil crops.
1244 Weeds exert an effect as crop competitors, are responsible for problems of harvest

1245

1246

1247

1248

1249

1250

1251

1252

1253

1254

1255

1256

1257

1258



1259

1260

Fig. 14 Weeds may be a major concern for essential oil crops cultivation. In the photo, a heavily infested fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) plot. (Photo: A. Carrubba)

Essential Oil Crops for Sustainable Agriculture

1261 mechanization, and when mixed with the harvested product may alter its end qual-
1262 ity. Competition with weeds, which are involved in the sharing and consequent allo-
1263 cation of environmental resources, may reasonably be considered a factor affect-
1264 ing essential oil yield and composition. In an Argentinean coriander landrace (Gil
1265 et al., 2002), weeds were a significant factor in determining the geraniol and geranyl
1266 acetate content in the oil, but it was difficult to ascertain their real effect because it
1267 acted in interaction with location and year.

1268 In some cases, the use of herbicides has been studied with good results. For
1269 example, the production of aromatic oils seems unaffected by herbicide applica-
1270 tion (provided the crop is tolerant to its active ingredients), and the quality of oil
1271 may even be improved (Pank, 1992; Zheljazkov and Topalov, 1992). It is true, how-
1272 ever, that many active ingredients in herbicides have not been expressly tested on
1273 essential oil crops. Furthermore, the choice of organic production method (which, as
1274 previously stated, is often a precise choice for essential oil crop growers) sets a limit
1275 to the possibility of intervention with chemical products; in this case, the choice
1276 is restricted to a few allowed techniques. Many nonchemical solutions suitable for
1277 use under organic management have been suggested (Bond et al., 2003; Kristiansen,
1278 2003), with results that varied according to plant species, timing of intervention, and
1279 expected results.

1280 First, the use of transplantation instead of direct sowing may be useful for plant-
1281 ing larger, and therefore more competitive, individuals in the field. The adoption
1282 of double instead of single rows, successfully tried for oregano (Carrubba et al.,
1283 2002a), could allow a more satisfactory execution of mechanical weed control.



1303 **Fig. 15** Mulching may help in managing weeds, but the more resistant weeds may pass through
1304 the plastic film. In the photo: plastic mulch on coriander (*Coriandrum sativum* L.). (Photo: A.
1305 Carrubba)

This
figure
will be
printed
in b/w

1306 Mechanical weeding is, by far, the most immediately applicable method for weed
1307 management when the use of chemicals is undesirable (Chicouene, 2007). It must
1308 be applied taking into consideration the growth stages of the crop and weeds, as
1309 well as the biology and characteristics of the weeds, but in most cases, one or two
1310 treatments are enough.

1311 In fact, the greatest difficulty in mechanical weed control is the necessity of plan-
1312 ning crop settlement and taking into account, from initiation, the kind of equipment
1313 used for weeding, and therefore properly setting inter-row distances. Many of the
1314 failures of mechanical weeding are linked to this lack of management.

1315 Mulching has been successfully tried, and many growers have obtained good
1316 results using polyethylene mulch or black porous plastic (Galambosi and Szebeni-
1317 Galambosi, 1992). In cultivation trials of *Artemisia absinthium*, mulching resulted
1318 in a 5% increase in average plant weight (Giorgi et al., 2006).

1319 Alternatively, an environmentally friendly technique is flame control, performed
1320 with special equipment that when passed over and around weeds, quickly boils the
1321 water in their cells, causing wilting of the apex and death. Flaming was tried on
1322 some essential oil crops such as coriander and fennel (Carrubba and la Torre, 2006),
1323 and sage and lavender (Martini, 1996), and the results seemed to depend upon the
1324 seasonal climatic patterns and the competition between the crop and the weeds. The
1325 low labor required represents an important advantage of flaming, but for effective
1326 weed control, an exact timing of the intervention is crucial, since flammers should
1327 be used when weeds are still young and tender. Flaming kills annual weeds com-
1328 pletely (although more will reappear), but it does not kill the roots of perennial
1329 weeds. These will send up new shoots within a week or so after flaming; therefore,
1330 additional treatments are often required.

1331

1332

1333 **7.3 Soil Nutrients and Fertilization**

1334

1335 The nutrient level in the soil is one of the most investigated aspects of agricultural
1336 research, also including research into essential oil crops. The effect of N fertilization
1337 has been studied in detail for peppermint (Dellacecca, 1996; Piccaglia et al., 1993),
1338 sage (Bezzi et al., 1992), and marjoram (Trivino and Johnson, 2000). In general,
1339 N fertilization seems to promote plant development, but without any enhancement
1340 in essential oil. In some cases, it even seemed to negatively affect crop results, for
1341 example, allowing leaves to develop instead of other desired plant parts, delaying
1342 flowering, or interfering with the production of essential oils, such as in *Lavan-
1343 dula spica* (Catizone et al., 1986). An interesting hypothesis (Mirshekari, 2004)
1344 suggests that there is an inverse correlation between protein and essential oils in
1345 plants; hence, all factors that promote protein synthesis (such as N fertilization)
1346 would have a depressive effect on essential oil yield. Apparently, contrasting data
1347 come from experiments on peppermint (Piccaglia et al., 1993) and geranium (Araya
1348 et al., 2006), in which N fertilization increased not only plant biomass but also the
1349 essential oil yield per unit area. This increase could possibly be a consequence of the
1350 increased biomass level rather than an effect of the enhancement in oil percentage.

Essential Oil Crops for Sustainable Agriculture

1351 In coriander, significant variations were found both in essential oil content and com-
1352 position when N fertilization was enhanced from 0 kg ha⁻¹ to 135 kg ha⁻¹, but the
1353 direction and amplitude of these variations were also affected by growing conditions
1354 (year and cultivation site) and genotype (Gil et al., 2002).

1355 Much less abundant (and less conclusive) is the literature about the effects of
1356 N fertilization on essential oil quality traits. Gil et al. (2002) found that it affected
1357 the linalool content of coriander, but this was noted only in a European landrace;
1358 an Argentinean landrace was not affected at all. Piccaglia et al. (1993) found an
1359 increase in pulegone content in peppermint oil by increasing the N fertilization rate,
1360 but such an effect was detected only in one of two years.

1361 Some interesting findings concern the effect on yield of organic N fertilization:
1362 yield enhancements have been claimed for biomass and oil in *Pelargonium* spp.
1363 (Araya et al., 2006) and in coriander seeds (Ursulino Alves et al., 2005). In both
1364 cases, the authors suggest that, besides the bare nutritional effect, some influence
1365 should be attributed to the positive action of organic fertilizers towards some soil
1366 characteristics, namely the water holding capacity, cation exchange capacity, and
1367 microbial activity.

1368 Concerning other nutrients, there are few reference papers: generally speaking,
1369 P is claimed to have a positive influence on the development of reproductive organs
1370 and to stimulate flowering, whereas K has positive effects on root development
1371 (Radanović et al., 2004). However, to our knowledge, few experiments have been
1372 performed regarding the effect of such elements on yield and quality traits of essen-
1373 tial oil crops. An experiment on P fertilization in peppermint (Piccaglia et al., 1993)
1374 recorded an increase in menthol content with increasing P dose, but this was only
1375 noted in one of two years. As such, no definite conclusions can be drawn.

1376
1377

1378 **7.4 Irrigation**

1379

1380 Water deficiency has a major role in the growth and yield of crops, and this has been
1381 studied in depth for many plants that are native to, or cultivated in, Mediterranean
1382 environments. The effects of water shortage may vary according to the duration and
1383 severity of stress, the resistance and/or tolerance features of the plant, and the plant
1384 material to be harvested (whole aerial biomass, leaves, roots, flowers, or seeds).
1385 In myrtle (Vicente et al., 2006) and *Mentha arvensis* (Misra and Srivastava, 2000)
1386 water stress exerted significant reductions in plant biomass, including plant height
1387 and leaf area, but it did not have, at least in the latter species, any significant effect on
1388 oil yield and composition. However, in *Artemisia annua*, it resulted in a shortening
1389 of plant height, but only when induced in the two weeks before harvest (Charles
1390 et al., 1993).

1391 When yield is represented by seeds and fruits, it is very often mainly deter-
1392 mined by photosynthesis occurring after flowering (Arnon, 1992), and water stress
1393 should therefore have more negative effects when experienced at that phase than
1394 at any other growth stage. A direct consequence is that all annual species that fin-
1395 ish their growth cycles in summer could be seriously affected by water shortage at

This
figure
will be
printed
in b/w



Fig. 16 Watering has a major effect on biomass yield, especially in dry and semi-arid climates. In the photo: sage (*Salvia officinalis* L.) under irrigation. (Photo: A. Carrubba)

the seed-filling stage, a feature not rare in Mediterranean environments. Under such situations, emergency watering could be a great help to production.

In perennials grown under dry or semi-arid climates, the recourse to irrigation (better if coupled with N fertilization) should push production towards its highest levels, and therefore represent an effective technical choice to obtain abundant and homogeneous yields. This is, for example, the choice of many Mediterranean farmers who want to cultivate sage or oregano in open irrigated fields. In this case, the costs needed for such an operation (water supply and the setting of watering lines) must be justified by the higher prices obtained from the sale of the product.

Frequently, water is not readily available and the recourse to irrigation is too expensive; here, essential oil crops are grown under a dry regime. In this case, annual plants can only use the water stored in the soil after the autumn–winter rainfall, and perennials are restricted to one cutting, normally taken at flowering time. In intermediate cases, farmers let the crop grow without irrigation for most of its cycle, and perform an irrigation after the main cutting is taken (at flowering time); in this way, the plants are allowed to bear a second harvest during the year, formed by the leaves that have regrown after watering.

When the water supply is limited, irrigation may be used occasionally as an emergency intervention if water stress threatens intolerable injury to plants. Above all, it is used following little or no rainfall, or as a planned intervention scheduled for the more critical development stages of crops, namely, the phases in which a water deficit could exert the worst effects on yield. Because good crop establishment is crucial for the success of almost all perennial crops, including lavender, oregano, thyme, mint, and rosemary, watering soon after transplantation is considered an essential practice.

If in Mediterranean semi-arid environments irrigation exerts a strong positive effect on biomass yield, under different climatic conditions crop responses are not

1441 always so positive: a field trial in Saskatchewan on German chamomile, as an exam-
1442 ple, gave a surprisingly much higher herbage yield under dryland conditions than
1443 following recourse to irrigation (Wahab and Larson, 2002).

1444 An overall increment in oil yield per area unit, due to the highest leaf production,
1445 was observed under irrigation in sage (Bezzi et al., 1992), even when the essential
1446 oil percentage was not affected. In mint, it has been noted that a controlled induction
1447 of water stress could even increase oil accumulation, without having any effect on
1448 oil composition (Simon, 1993). Many authors, however, call attention to a negative
1449 effect that irrigation could have on essential oil content, stressing the importance of
1450 proper water management on oil yields.

1451

1452

1453 **7.5 Mechanization and Harvest**

1454

1455 Mechanization is one of the areas in which research is lacking, but in which there
1456 are the strongest opportunities to develop new techniques and facilities that may sig-
1457 nificantly reduce production costs. Studies regarding the mechanization of essential
1458 oil crops may be divided into three main sectors: seeding/transplanting operations,
1459 weeding, and harvest.

1460 The first group of operations differs in importance according to the species
1461 grown; it is generally a crucial aspect for many annual species, especially those
1462 with smaller seeds, in which setting seed distribution to desired values is more dif-
1463 ficult, and it is generally difficult to achieve the planned plant population. Further-
1464 more, smaller seeds require more care in soil preparation, because an uneven dis-
1465 tribution will generate inhomogeneity in stands and operational difficulties at har-
1466 vest. An interesting experience comes from southern Italy, where chamomile was
1467 mechanically sown by distributing the seeds on the tractor tires; it was also per-
1468 formed in this way to benefit simultaneous soil compression. In perennials, specific
1469 studies have addressed the mechanical transplantation of sage and lavender (young
1470 rooted plants), *Iris pallida* (the rhizomes), and saffron (the bulbs) by means of dif-
1471 ferent equipment obtained with small modifications to normally adopted machines
1472 (Caligani and Adamo, 1987).

1473 Along with mechanical weeding, that has been discussed already in a previous
1474 section, harvest exerts a strong effect on yield, both from quantitative and qualita-
1475 tive points of view. In many cases, and for many essential oil crops, manual harvest-
1476 ing allows a more careful operation, and therefore a higher yield and quality level.
1477 However, it is a time-consuming and labor-intensive practice, and its costs may be
1478 prohibitive when cultivation is performed over large areas.

1479 The scheduling and management of harvest are operations in which farmers must
1480 make crucial decisions that may dramatically alter the productive and qualitative
1481 results of essential oil crops, and many aspects of harvest management must be
1482 considered in order to achieve a satisfactory result. First, proper timing of such an
1483 operation is crucial, since it determines the age and the development stage of the
1484 harvested material. In oregano (Jerkovic et al., 2001) and rosemary (Nevo, 1998),
1485 it has been proven to significantly modify qualitative and quantitative traits, since

1486
1487
1488
1489
1490
1491
1492
1493
1494
1495
1496
1497
1498
1499

This
figure
will be
printed
in b/w

1500
1501
1502
1503
1504
1505
1506
1507
1508
1509
1510
1511
1512
1513
1514
1515
1516
1517
1518
1519
1520
1521
1522
1523
1524
1525
1526
1527
1528
1529
1530

Fig. 17 Cutting should spare the regrowth capacity of plants. In the photo, the restarting of vegetation after cutting in *Artemisia abrotanum* L. (Photo: A. Carrubba)

a delay in harvesting may cause the plants to become woody, which would reduce their active ingredients.

Second, the intensity of cutting is especially important in essential oil crops harvested for their foliage: the maximum biomass yield is reached when the stems are cut as close as possible to the soil. However, if excessive, this cutting may injure axillary buds, limiting the plants' capability to regrow for further harvests. Furthermore, too severe a cutting, which would result in a higher percentage of stems (that usually have a poorer quantity and quality of oil) with respect to leaves and shoots in the harvested material, may alter the chemical characteristics of the essential oil. In many perennials (such as mint, and sometimes sage or oregano), the crop is managed with the intention of executing more than one cutting. In cornmint, cases of six to seven cuttings taken throughout a cropping cycle 17–18 months long have been reported (Rajeswara Rao, 1999). Even if the subsequent harvests do not allow the same essential oil yield obtainable from the first (Piccaglia et al., 1993), and the chemical profile of the essential oil obtained from the different cuttings varies (Omer et al., 1994), the economical success of the cultivation may rely on the possibility of making more than one harvest. For this reason, the ability of the plant to regrow must be considered.

There are many examples of the machinery used to harvest essential oil crops, such as for oregano (Leto et al., 2002; Verlet, 1992), sage, lavender (Caligani and Adamo, 1987), and chamomile (Wahab and Larson, 2002). Results seem to vary with the dryness of the herb to be collected and the destination of the product: the herb picked up mechanically may tend to brown, which is unwanted if the product is destined for the herbal market, but less so if it is destined for the extraction of essential oils. Some simple adjustments may help when using mechanical equipment and solve many of the technical problems that may arise, e.g., choosing fast-growing genotypes, such as achieved in some selected *Salvia* hybrids (Dudai

Essential Oil Crops for Sustainable Agriculture

1531
1532
1533
1534
1535
1536
1537
1538
1539
1540
1541
1542
1543
15441545
1546
1547
1548

Fig. 18 Mechanization is a necessity for modern essential oil crops growers. In the photo, a prototype of mower modified for harvesting of oregano (*Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum* (Link) Letswaart). (Photo: A. Carrubba)

1549
1550
1551

et al., 1999), or setting a proper arrangement of rows for plant populations (Caligani and Adamo, 1987).

1552
1553
1554
1555
1556
1557
1558
1559
1560
1561
1562
1563

Different methods are required for essential oil crops where specific parts such as seeds are harvested, rather than the leaves or entire plants. Coriander, fennel, anise, and dill are examples of such production. Here, the tendency of growers and breeders is oriented to the mechanization of harvest, by means of the equipment normally used on farms. Difficulty may result from the indeterminate growth habit of many such herbs, which may cause the contemporary appearance of flowers, ripe and unripe seed on the same plant. In this case, the best recourse should be hand harvesting, picking up the seeds (or umbels) as soon as they are marketable. Obviously, this is time and labor intensive, and many techniques and facilities for mechanical harvesting have been developed. Coriander and fennel, for example, may be cut to ground level and after some hours of open-air drying, be threshed mechanically.

1564
1565

7.6 Diseases and Pest Control

1566
1567
1568
1569
1570
1571
1572
1573
1574
1575

Pathogens and pests may cause considerable losses to the yield and quality of essential oil crops. Generally speaking, this topic has not been debated in depth in terms of essential oil crops, and until a few years ago, a widespread idea was that most such crops had no serious pests or diseases (Simon et al., 1984). More probably, the lack of information regarding this issue was mostly due to the limited cropping area of essential oil crops. In fact, the sources of information related to the diseases of essential oil crops were mostly limited to areas in which their cultivation reached appreciable levels. For example, in the 1980s, an infestation of *Ramularia coriandri*

This figure will be printed in b/w

1576 was found in coriander cultivations in the former Soviet Union (Gabler, 2002), and
1577 it forced growers and researchers to concentrate (successfully) their efforts towards
1578 the breeding and selection of resistant genotypes. Similar histories may be found in
1579 the literature for other crops and other pathogens, such as stem necrosis in fennel
1580 caused by *Phomopsis foeniculi* (Anzidei et al., 1996; Mugnai and Anzidei, 1994),
1581 sweet basil wilt caused by *Fusarium oxysporum* (Dudai et al., 2002), coriander and
1582 caraway foliar necrosis caused by *Ascochyta* and *Aureobasidium* sp. (Anonymous,
1583 2002), rosemary root rot caused by *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia* sp. (Con-
1584 way et al., 1997; Mohan, 1994), laurel leaf blight caused by *Glomerella cingulata*
1585 (Constantinescu and Jonsson, 1987), and mint leaf rust caused by *Puccinia menthae*
1586 (Joy et al., 2001).

1587 Research concerning insects is also scarce in this context: red scale (*Aonidiella*
1588 *aurantii*) and several mealybugs have been reported to be common insect pests of
1589 jasmine, whereas hairy caterpillars, cut worms, semi-loopers, red pumpkin beetle,
1590 and termites have been observed in cultivations of Mint (*Mentha arvensis* L.) and
1591 controlled by means of suitable insecticides (Joy et al., 2001). However, the belief
1592 in the insecticidal effectiveness of many essential oil crops is so strong that some,
1593 such as *Artemisia vulgaris*, *Ocimum basilicum*, and *Mentha cordifolia*, have been
1594 suggested as intercrop species to repel insects from the main crop (IIRR, 1993).

1595 A growing presence of insects on crops is a source of risk. Other than their direct
1596 damage to crops, they have a well-known ability to transmit dangerous viruses and
1597 viroids that in the specific case of essential oil crops could injure plants both from
1598 a quantitative and qualitative point of view. A survey of the virus diseases of some
1599 essential oil crops was carried out in Italy by Bellardi and Rubies-Autonell (2003),
1600 where 12 different virus strains affecting about 40 species were detected. According
1601 to the authors, damage was not only on plant biomass, but also on essential oil
1602 production and composition. For example, oil production from clary sage infected
1603
1604

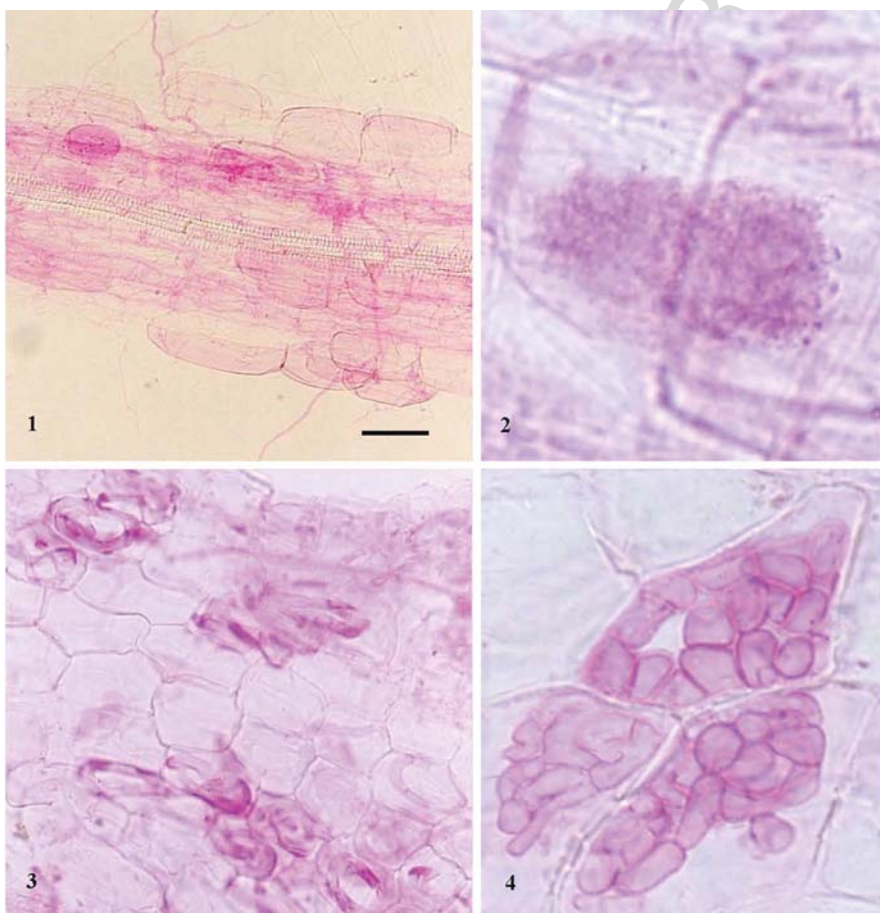


1611
1612 **This figure will be printed in b/w**
1613
1614
1615
1616
1617
1618 **Fig. 19** Pests may have some impact on essential oil crops cultivation. In the photo: a young plant
1619 of clary sage (*Salvia sclarea* L.) with evident symptoms of attack by mites (*Acari*). (Photo: A.
1620 Carrubba)

Essential Oil Crops for Sustainable Agriculture

1621 by Broad Bean Wilt Virus serotype I (BBWV-1) was one-third of that obtained from
 1622 healthy plants, with an increased content in α -terpineol, germacrene D, and sclareol,
 1623 and a lower percentage of myrcene and limonene.

1624 An increase in pathogens and pests in essential oil crops, however, may be
 1625 expected to be a direct consequence of the growing rate of cultivation (Gabler,
 1626 2002), and it is possible to foresee that if essential oil monocultures spread over
 1627 wider areas, such problems will become a major concern in the future. Experiments
 1628 aimed at evaluating insecticides and pesticides useful for essential oil crop culti-
 1629 vation could certainly be performed, but the specific orientation of markets and
 1630 the high “naturalness” content of such products implies special care in their field
 1631



1662 **Fig. 20** Mycorrhization has been studied for many essential oil plants. In the photo, from left
 1663 to right, examples of AM association in essential oil plants: (1) intra- and extramatrical
 1664 structures of AM fungi and (2) arbuscule in basil root; (3) hyphal coils in cortical cells of lavender
 1665 root; (4) mycelial structure in cortical cells of laurel root. Bar: 1, 3 = 30 μ m; 2, 4 = 10 μ m.
 (Photo: L. Torta)

This
figure
will be
printed
in b/w

1666 management. The general tendency in cultivation of such crops is therefore oriented
1667 to their organic or integrated management, as also expressly suggested for extracts
1668 destined for the pharmaceutical industry or human therapy by the WHO guidelines
1669 on Good Agricultural and Collection Practices (GACP) for medicinal plants. Such
1670 guidelines imply the use of agrochemicals at the minimum possible level and “only
1671 when no alternative measures are available” (WHO, 2003).

1672 With the purpose of improving general plant health conditions, many strategies
1673 have been recently developed. These include the employment of, and increase in,
1674 natural mycorrhization under many different agricultural environments (Kothari
1675 et al., 1999). Many essential oil crops have proven highly suitable to vesicular
1676 arbuscular mycorrhizal (VAM) fungal colonization, achieving a high percentage
1677 of internal infection (Camprubi et al., 1990), and some species (*Salvia officinalis*,
1678 *Lavandula officinalis*, and *Thymus vulgaris*) have been successfully used as indi-
1679 rect inoculation media to increase VAM root colonization of other tree species
1680 (Camprubi et al., 1992).

1681 Another relevant concern is tied to the occurrence of pathogens, such as molds,
1682 on harvested and stored plant material. Usually, the use of proper storage conditions
1683 in clean and well-aerated places, and avoiding any possible retention of moisture in
1684 containers and contamination with insects, rodents, or other pests, should be enough
1685 to ensure the long-term conservation of plant material.

1686

1687

1688 **7.7 Postharvest Treatments**

1689

1690 For quality features, postharvest treatments also play a crucial role. Depending on
1691 the species, the herb part used, the harvest timing and conditions, the water amount
1692 in herbs ranges from 40% to 80%. Some differences in essential oil characteristics
1693 have been claimed between dry and fresh plant material (Cioni et al., 1991; Shalaby
1694 et al., 1995), but drying is often necessary to increase the shelf life of the final prod-
1695 uct, to allow proper conditions for storage, and for the long-distance transport of the
1696 harvested product. Drying acts by slowing the growth of microorganisms and pre-
1697 venting some biochemical reactions that may alter the organoleptic characteristics
1698 of the herb (Díaz-Maroto et al., 2003).

1699 In earlier times, most research papers available on this topic referred mostly to
1700 drying methods. This was in relation to the kind of material to be dried (tubers, roots,
1701 leaves, and bark), rather than to the different species (Chiumenti and Da Borso,
1702 1996). More recently, many trials have been performed to find the best drying tech-
1703 nique for most herbs, and it is certainly possible to find among them the best tech-
1704 nique for the chosen environment and species.

1705 There is no standard method for drying herbs, and each individual grower has
1706 often developed his own system, choosing from among the numerous methods that
1707 have been suggested, from air-drying to oven, microwave, or freezing systems. Each
1708 method has advantages and disadvantages, and the choice (besides the economic
1709 aspects) mostly relies on the desired result (texture, color, or scent) of the final prod-
1710 uct, and, of course, the requirements of its market destination. Method, duration,

Essential Oil Crops for Sustainable Agriculture

1711 and temperature of drying, moreover, can affect the volatile oil content of the herb,
1712 which is a crucial factor in its quality. Such effects may vary according to the chosen
1713 plant material: in dill and parsley, oven- and freeze-drying lead to significant losses
1714 of volatiles with respect to fresh herbs, whereas such techniques exert a lower effect
1715 in sage and thyme (Díaz-Maroto et al., 2003). In the latter species, freeze-drying
1716 was found to produce oil yields about 10% higher than after a flow-through method
1717 (Lawrence, 1998).

1718 An important target of research activity is to find, for each species, the maximum
1719 temperature for drying, in order to maximize volatile oil yield and quality. Generally,
1720 the higher the drying temperature, the greater the killing effect on microorganisms.
1721 However, a thermal excess could seriously damage the quality of essential oil; in
1722 thyme and sage, oven-drying induced lower losses of volatiles at 30°C and higher
1723 losses at 60°C (43% in thyme and 31% in sage with respect to the fresh herb) (Díaz-
1724 Maroto et al., 2003), whereas in French tarragon, the best oil retention was obtained
1725 at a working temperature of 45°C (Arabhosseini et al., 2007). In some cases, more
1726 attention is required on the duration of heat exposure than on the final temperature.
1727 For example, Charles et al. (1993) found that a treatment at 80°C for 12 h had
1728 approximately the same effect on the artemisinin content of *Artemisia annua* as
1729 exposure to a much lower temperature (50°C) for a longer time (48 h).

1730 The most ancient and traditional drying system is air-drying, which is performed
1731 outdoor (in warmer environments) or indoor (when external climatic conditions are
1732 not optimal and adequate structures are available). Many crops, such as mint and
1733 sage, may be successfully dried in plastic-covered greenhouses. Usually, the process
1734 involves stacking flat trays of herbs in the shadows (direct light may often alter the
1735 color of the product) and in aired places, sometimes with the help of dehumidifiers
1736
1737



1753 **Fig. 21** Mixed cropping systems including essential oil crops may enhance farm productivity
1754 and biodiversity level. In the photo: oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart) in
1755 association with young olive trees. (Photo: M. Militello)

This
figure
will be
printed
in b/w

1756 or forced circulating air equipment. Air-drying is a slow and labor-intensive process
1757 (there is the need to often move the mass to exsiccate so as to avoid brownish,
1758 fermentations and microbial attacks), but many experiments (Charles et al., 1993)
1759 have demonstrated that it allows the best results in terms of product quality.

1760 Solar drying has been successfully tried in many environments (Buckenhüskes
1761 et al., 1996; Charles et al., 1993; Garg et al., 1998), and it has proven to give bet-
1762 ter color, texture, and content of active ingredients than conventional stove driers.
1763 Much equipment is available, is easy to set up, and can quickly dry large amounts of
1764 different plant material. Traditionally, such equipment has always been cheap, but
1765 nowadays problems have arisen due to quality control requirements and the need to
1766 reduce the bacterial count. When more sophisticated machinery (such as dehydra-
1767 tion machines) is necessary, herb drying starts to become more capital intensive and
1768 the cost of equipment is often too high for many herb growers.

1769

1770

1771 **8 Conclusions**

1772

1773 Plants producing aromatic oils have been used for flavoring throughout history.
1774 Many of them have formed part of the economy of countries with growing popula-
1775 tions where there is an inevitable pressure on agricultural land as a resource for food
1776 and fuel crops. Many species for essential oil production might have direct interest
1777 as crop species for Mediterranean areas. Although some are native to Mediterranean
1778 environments, others are from different areas of the world, yet targeted to a grow-
1779 ing interest as food or flavoring items. Most of the aforementioned herbs, especially
1780 those that are native, are easily grown and adapted to a wide variety of soil and cli-
1781 matic conditions. Therefore, they have already been cultivated by many farmers at
1782 a small scale, mostly for domestic or local use.

1783 Currently, problems with essential oil crop production are above all commer-
1784 cial, linked to the establishment of market channels, to their high investment costs,
1785 and to the rapid expansion of competitive production from developing countries. In
1786 Mediterranean environments, such problems often add to general marginality con-
1787 ditions, requiring appropriate and well-constructed land management.

1788 Notwithstanding, today, a considerable pressure is exerted by consumers world-
1789 wide, to use perceived natural compounds in edible and personal products, and many
1790 opportunities seem therefore to be open for such crops. It is essential that produc-
1791 ers are able to service this growing demand efficiently, economically, and above
1792 all, reliably. It is therefore important to understand and develop ways of ensuring
1793 maximum return on the investments made in establishing and growing these crops
1794 (Weiss, 1997). The great amount of experimental research carried out worldwide has
1795 brought important advances to cropping techniques. In some cases, it has improved
1796 the plant material available for cultivation, although its availability to growers is far
1797 from satisfactory. Much work still remains to be done to further advance the tech-
1798 niques required for the special environmental conditions of Mediterranean environ-
1799 ments, and for the wider application of such techniques and improvement of genetic
1800 materials available to farmers.

References

- 1801
- 1802
- 1803 Altieri M.A. (2004) Linking ecologists and traditional farmers in the search for sustainable agri-
 1804 culture. *Frontiers in Ecol. Environ.*, 2(1): 35–42.
- 1805 Amri A., Ajlouni M., Assi R., Sbeih Y., Nassar A. (2006) Medicinal and herbal plants cultivation
 1806 for promoting the conservation of dryland agrobiodiversity. *Proc. International Symposium on*
 1807 *“Perfume, Aromatic and Medicinal Plants: from production to valorisation”*. Nov. 2–4, Jerba,
 1808 Tunisie, 6.
- 1809 Angioni A., Barra A., Cereti E., Barile D., Coisson J.D., Arlorio M., Dessi S., Coroneo V., Cabras
 1810 P. (2004) Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity
 1811 investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 3530–
 1812 3535.
- 1813 Anonymous. (2002) Blight disease of coriander and caraway in Saskatchewan. Information
 1814 brochure by Saskatchewan Department of Agriculture, Food and Rural Revitalization, Room
 1815 125, 3085 Albert Street, Regina SK S4T 0B1.
- 1816 Anzidei M., Mugnai L., Schiff S., Sfalanga A., Bennici A., Surico G. (1996) Saggi preliminari
 1817 per la selezione in vitro di piante di *Foeniculum vulgare* Mill. da seme resistenti a *Phomop-*
 1818 *sisi foeniculi* Du Manoir et Vegh. *Atti Conv. Int. “Coltivazione e miglioramento delle piante*
 1819 *officinali”*. Trento (Italy), June 2–3 1994, pp. 527–529 (In Italian, with English abstract).
- 1820 Arabhosseini A., Huisman W., van Boxtel A., Müller J. (2007) Long-term effects of drying condi-
 1821 tions on the essential oil and color of tarragon leaves during storage. *J. Food Engineer.* 79:
 1822 561–566.
- 1823 Araya H.T., Soundy P., Steyn J.M., Teubes C., Learmonth R.A., Mojela N. (2006) Response of
 1824 herbage yield, essential oil yield and composition of South African rose-scented geranium
 1825 (*Pelargonium* sp.) to conventional and organic nitrogen. *J. Essential Oil Res.*, 18, (Spec. Ed.):
 1826 111–115.
- 1827 Arnon I. (1992) Agriculture in dry lands, principles and practice, *Developments in Agricultural*
 1828 *and Managed-Forest Ecology*, 26. Elsevier Science Publ., 979 pp.
- 1829 Babulka P. (2004) L’anis vert (*Pimpinella anisum* L.). *Phytothérapie*, 2: 57–59 (In French, with
 1830 English abstract).
- 1831 Bagarello V., Di Piazza C.V., Ferro V. (2004) Recenti acquisizioni nel settore delle sistemazioni
 1832 idraulico-forestali. Indagine di campo sull’efficacia del Vetiver per la conservazione del suolo
 1833 e dell’acqua. *Quaderni di idronomia montana*, 24: 413–431 (In Italian, with English abstract).
- 1834 Baldovini N., Ristorcelli D., Tomi F., Casanova J. (2000) Intraspecific variability of the essential
 1835 oil of *Calamintha nepeta* from Corsica (France). *Flavour Fragr. J.*, 15: 50–54.
- 1836 Bandoni A.L., Juarez M.A., Mizrahi I. (1991) Contribucion al studio de las esencias de comino
 1837 (*Cuminum cyminum*L.), *Ess. Der. Agrum.*, 1: 32–47 (In Spanish, with English abstract).
- 1838 Bellardi M.G., Rubies-Autonell C. (2003) Update on virus diseases of medicinal and aromatic
 1839 plants in Italy. *Agricoltura Mediterranea*, 133(1): 1–6.
- 1840 Ben fadel N., Mkaddem M., Boussaïd M. (2006) Allozyme and essential oil variation within and
 1841 among natural Tunisian *Mentha pulegium* L. (*Lamiaceae*) populations. *Acta Horticulturae*, 723:
 1842 117–125.
- 1843 Benvenuti S., Ceccarini L., Macchia M. (2006) Propagazione per seme di specie spontanee
 1844 mediterranee di interesse estetico-paesaggistico. *Proc. III conv. naz. “Piante Mediterranee”*,
 1845 Bari (Italy), Sept. 27–Oct. 1: 56 (In Italian).
- Bernath J., Kattaa A., Nemeth E., Franke R. (1996) Production-biological investigation of fennel
 (*Foeniculum vulgare*) populations of different genotype. *Atti Conv. Int. “Coltivazione e miglio-*
ramento delle piante officinali”, Trento (Italy), June 2–3, 1994, pp. 201–212 (In Italian, with
 English abstract).
- Betray G., Vömel A. (1992) Influence of temperature on yield and active principles of *Chamomilla*
recutita (L.) Rausch. under controlled conditions. *Acta Horticulturae*, 306: 83–87.
- Bezzi A., Aiello N., Albasini A., Landi R., Marzi V., Melegari M., Ventrelli A., Zanzucchi C.
 (1992) *Salvia* (*Salvia officinalis* L.): lavori effettuati nell’ambito dei progetti finalizzati del
 Ministero dell’Agricoltura e delle foreste: risultati e prospettive. *Agricoltura Ricerca*, 97–104
 (In Italian).

- 1846 Bianco R., Santoprete G. (1996) Coltive agricole non eccedentarie per il sud dell'Italia:
1847 l'opportunit  delle piante e dei prodotti officinali. Proc. XVII Congr. naz. merceologia, Lecce
1848 (Italy), Oct. 3–5, vol. I: 315–321 (In Italian).
- 1849 Blade S.F., Slinkard A.E. (2002) New crop development: The Canadian experience. In: J. Janick,
1850 A. Whipkey (eds.), Trends in New Crops and New Uses. ASHS Press, Alexandria, VA, pp.
1851 62–75.
- 1852 Boira H., Blanquer A. (1998) Environmental factors affecting chemical variability of essential oils
1853 in *Thymus piperella* L. Biochem. Syst. Ecol., 26: 811–822.
- 1854 Bond W., Turner R.J., Grundy A.C. (2003) A Review of Non-Chemical Weed Management.
1855 HDRA, the Organic Organisation, Ryton Organic Gardens, Coventry, UK, 81 pp.
- 1856 Bottega S., Corsi G. (2000) Structure, secretion and possible functions of calyx glandular hairs of
1857 *Rosmarinus officinalis* L. (*Labiateae*). Bot. J. Linnean Soc., 132: 325–335.
- 1858 Bouwmeester H.J., Davies J.A.R., Smid H.G., Welten R.S.A. (1995) Physiological limitations to
1859 carvone yield in caraway (*Carum carvi* L.). Industrial Crops and Products, 4: 39–51.
- 1860 Brown J.T., Charlwood B.V. (1986) The accumulation of essential oils by tissue cultures of
1861 *Pelargonium fragrans* (Willd.). FEBS Lett., 204(1): 117–120.
- 1862 Bruneton J. (1995) Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants. Lavoisier Publ., Paris, pp.
1863 427–466.
- 1864 Brul S., Coote P. (1999) Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance
1865 mechanisms. Int. J. Food Microbiol., 50: 1–17.
- 1866 Bruni A. (1999) Farmacognosia Generale e Applicata. I Farmaci Naturali. Piccin Publ., Padova,
1867 Italy, 419 pp (In Italian).
- 1868 Buchanan R.A., Otey F.H., Hamerstrand O.E. (1980) Multi-use botanochemical crops, an eco-
1869 nomic analysis and feasibility study. Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev., 19(4): 489–496.
- 1870 Buckenh s H.J., Müller J., Fischer U., Omran H., M hlbauer W. (1996) Solar drying of mar-
1871 joram in Egypt. Atti Conv. Int. “Coltivazione e miglioramento delle piante officinali”. Trento
1872 (Italy), June 2–3, 1994, pp. 659–662.
- 1873 Caligani P., Adamo A. (1987) Le macchine per le officinali. Terra e vita, 10: 62–70 (In Italian).
- 1874 Camprubi A., Estaun V., Calvet C., Pera J. (1990) Infectivity and effectivity of *Glomus mosseae*
1875 mycorrhizae in four different species of medicinal plants. Symbiosis, 9, 1/3: 305–307.
- 1876 Camprubi A., Estaun V., Calvet C. (1992) Effect of aromatic plant species on vesicular-arbuscular
1877 mycorrhizal establishment in *Pistacia terebinthus*. Plant and Soil, 139(2): 299–301.
- 1878 Carrasco J. (1980) Investigation analytique sur l'huile essentielle d'Aspic cultivate, Paper n. 112, VIII
1879 Int. Congr. Essent. Oils, Cannes (France).
- 1880 Carrubba A., Catalano C. (2007) Potential role of medicinal and aromatic plants for the sustainable
1881 development of Mediterranean marginal lands. Proc. I Congr. Farming System Design 2007 –
1882 Field-farm scale design and improvement. Catania (Italy), Sept. 10–12: 21–22.
- 1883 Carrubba A., la Torre R. (2006) La coltivazione delle specie officinali in ambiente mediterraneo:
1884 il pirodiserbo come tecnica ecocompatibile di gestione delle infestanti. Proc. III conv. naz.
1885 “Piante Mediterranee”, Bari (Italy), Sept. 27–Oct. 1: 157 (In Italian).
- 1886 Carrubba A., la Torre R., Di Prima A., Saiano F., Alonzo G. (2002) Statistical analyses on essential
1887 oil of Italian Coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruits of different ages and origin. J. Essential
1888 Oil Res., 14: 389–396.
- 1889 Carrubba A., la Torre R., Di Prima A., Saiano F., Alonzo G. (2005) Variations in the volatile
1890 compounds of a Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) variety grown in a semi-arid Mediterranean
environment. J. Essential Oil Bearing Plants, 8(3): 275–288.
- Carrubba A., la Torre R., Matranga A. (2002a) Effect of the choice of different row arrange-
ments on the bio-agronomical behaviour of *Origanum heracleoticum*. Acta Horticulturae, 576:
247–252.
- Carrubba A., la Torre R., Piccaglia R., Grandi S. (2006a) Chemical and botanical characterization
of a *Rosmarinus officinalis* biotype from Sicily. Acta Horticulturae, 723: 197–201.
- Carrubba A., la Torre R., Piccaglia R., Marotti M. (2002b) Characterization of an Italian biotype of
clary sage (*Salvia sclarea* L.) grown in a semi-arid Mediterranean environment. Flavour Fragr.
J., 17: 191–194.

Essential Oil Crops for Sustainable Agriculture

- 1891 Carrubba A., la Torre R., Saiano F., Alonzo G. (2006b) Effect of sowing time on Coriander perfor-
1892 mance in a semiarid Mediterranean environment. *Crop Science*, 46: 437–447.
- 1893 Carrubba A., la Torre R., Zaffuto G. (2006c) Exploitation of native *Labiatae* in Sicily. *Acta Horti-*
1894 *culturae*, 723: 111–116.
- 1895 Catizone P., Marotti M., Toderi G., Tetenyi P. (1986) Coltivazione delle piante medicinali e aroma-
1896 tiche. Patron publ., Bologna, Italy, 399 pp (In Italian).
- 1897 Ceruti A., Ceruti M., Vigolo G. (1993) Botanica medica, farmaceutica e veterinaria. Zanichelli
1898 Publ., Bologna, Italy, 686 pp (In Italian).
- 1899 Chalchat J.C., Garry R.P., Lamy J. (1994) Influence of harvest time on yield and composition of
1900 *Artemisia annua* oil produced in France. *J. Essential Oil Res.*, 6: 261–268.
- 1901 Charles D.J., Simon J.E., Shock C.C., Feibert E.B.G., Smith R.M. (1993) Effect of water stress and
1902 post-harvest handling on Artemisinin content in the leaves of *Artemisia annua* L. In: J. Janick,
1903 J.E. Simon (eds.), *New Crops*. Wiley, New York, pp. 628–631.
- 1904 Chicouene D. (2007) Mechanical destruction of weeds. *A review. Agron. Sustain. Dev.* 27: 19–27.
- 1905 Chiumenti R., Da Borso F. (1996) Essiccazione artificiale di cimette di salvia: risultati di prove
1906 sperimentali. *Atti Conv. Int. "Coltivazione e miglioramento delle piante officinali"*. Trento
1907 (Italy), June 2–3, 1994, pp. 381–390 (In Italian, with English abstract).
- 1908 Cioni P.L., Flamini G., Morelli I. (1991) Indagine preliminare su una coltivazione di *Rosmarinus*
1909 *officinalis* in provincia di Pisa: caratterizzazione dell'olio essenziale. *Riv. Ital. EPPOS*, 3: 3–6
1910 (In Italian, with English abstract).
- 1911 Cioni P.L., Flamini G., Buti Castellini C., Ceccarini L., Macchia M. (2006) Composition and yields
1912 of the essential oils from whole plant, leaves and branches of *Rosmarinus officinalis* L. grow-
1913 ing in minor islands of "Parco nazionale dell'Arcipelago Toscano". *Acta Horticulturae*, 723:
1914 255–260.
- 1915 Circella G., Franz Ch., Novak J., Resch H. (1995) Influence of day length and leaf insertion on the
1916 composition of marjoram essential oil. *Flav. Fragr. J.*, 10: 317–324.
- 1917 Collin H.A. (2001) Secondary product formation in plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation*,
1918 34: 119–134.
- 1919 COM (2006) Commission of the European Communities. 216 final. Halting the loss of biodiversity
1920 by 2010 – and beyond – Sustaining ecosystem services for human well-being. Communication
1921 from the Commission, Brussels, 22.5.2006.
- 1922 Constantinescu O., Jonsson L. (1987) Omfattande angrepp av *Glomerella cingulata* (Ascomycetes)
1923 på 'Linnélagarna' (*Laurus nobilis*). *Vaxtskyddsnotiser*, 51(1): 11–13 (In Swedish).
- 1924 Conway K.E., Maness N.E., Motes J.E. (1997) Integration of biological and chemical controls for
1925 *Rhizoctonia* aerial blight and root rot of rosemary. *Plant Dis.* 81:795–798.
- 1926 Cooper Marcus C., Barnes M. (1999) *Healing gardens: therapeutic benefits and design recommen-*
1927 *dations*. John Wiley & sons, Chichester, UK, 610 pp.
- 1928 Cristóbal R., Fanlo M., Melero R., More E. (2005). Aromatic and Medicinal Plants (MAP) pro-
1929 duction as a rural development strategy. Proc. 2005 AAIC Annual Meeting; Intern. Conf. on
1930 Industrial Crops and Rural Development, Murcia (Spain), Sept. 17–21.
- 1931 Croteau R., Satterwhite D.M., Cane D.E., Chang C.C. (1986) Biosynthesis of Monoterpenes. Enan-
1932 tioselectivity in the enzymatic cyclization of (+)- and (-)-linalyl pyrophosphate to (+)- and (-)-
1933 bornyl pyrophosphate. *J. Biol. Chem.*, 261(29): 13438–13445.
- 1934 D'Andrea L. (2006) Distribuzione e morfologia dei tricomi ghiandolari nelle foglie di rosmarino
1935 (*Rosmarinus officinalis* L.). Proc. III conv. naz. "Piante Mediterranee", Bari (Italy), Sept. 27–
1936 Oct. 1, 111 pp (In Italian).
- 1937 D'Andrea L., Circella G. (2006) Densità dei tricomi ghiandolari nelle foglie di origano (*Origanum*
1938 *vulgaressp. hirtum*) durante la sua crescita. Proc. III conv. naz. "Piante Mediterranee", Bari
1939 (Italy), Sept. 27–Oct. 1, 112 pp (In Italian).

- 1936 Deidda P., Mulas M. (2004) La coltivazione e la valenza polifunzionale delle piante mediterranee.
 1937 Italus Hortus, 11(4): 31–36 (In Italian, with English abstract).
- 1938 de la Fuente E.B., Gil A., Lenardis A.E., López Pereira M., Suárez S.A., Ghera C. M., Yaber Grass
 1939 M. (2003) Response of winter crops differing in grain yield and essential oil production to some
 1940 agronomic practices and environmental gradient in the Rolling Pampa, Argentina. Agriculture, Ecosystems and Environment, 99: 159–169.
- 1941 Dellacecca V. (1996) Ricerche sulla menta piperita (*Mentha piperita* L.). Proc. Int. Conf. “Coltiva-
 1942 zione e miglioramento delle piante officinali”, Trento (Italy), June 2–3, 1994, pp. 201–212
 1943 (In Italian, with English abstract).
- AQ3 1944 Dellacecca V. (1996a) Un quinquennio di ricerche sulla camomilla comune (*Chamomilla recutita*
 1945 (L.) Rausch.). Proc. Int. Conf. “Coltivazione e miglioramento delle piante officinali”, Trento
 1946 (Italy), June 2–3, 1994, pp. 27–45 (In Italian).
- 1947 Demarco M.F., Sarruggieri H., Lopez M.A. (1999) Good agricultural practices for the organic
 1948 production of medicinal plants. Acta Horticulturae, 502: 21–27.
- 1949 De Mastro G., Brunetti G., Venerito P., Verdini L., Manolio G. (2006) Comportamento produttivo
 1950 di piante aromatiche per il consumo fresco in sistemi colturali biologico e convenzionale. Proc.
 1951 III conv. naz. “Piante Mediterranee”, Bari (Italy), Sept. 27–Oct. 1, 116 pp (In Italian).
- 1952 De Mastro G., Ruta C., Marzi V. (2004) Agronomic and technological assessment of Oregano
 1953 (*Origanum vulgare* ssp.) biotypes. Acta Horticulturae, 629: 355–363.
- 1954 De Mastro G., Ruta C., Mincione A., Poiana M. (2004a) Bio-morphological and chemical charac-
 1955 terization of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) biotypes. Acta Horticulturae, 629: 471–482.
- 1956 Devecchi M. (2006) The use of *Labiatae* of ornamental interest in the design of parks and gardens.
 1957 Acta Horticulturae, 723: 51–57.
- 1958 Díaz-Maroto M.C., Pérez-Coello M.S., González Viñas M.A., Cabézudo M.D. (2003) Influence
 1959 of drying on the flavor quality of Spearmint (*Mentha spicata* L.). J. Agric. Food Chem., 51:
 1960 1265–1269.
- 1961 Diederichsen A. (1996) Coriander (*Coriandrum sativum* L.). Promoting the conservation and use
 1962 of underutilized and neglected crops. 3, IPK, Gatersleben/IPGRI, Rome, 83 pp.
- 1963 Domizi L., Rossini F., Scarici E. (2006) Impiego di piante mediterranee per la valorizzazione pae-
 1964 saggistica di un’area a verde. Proc. III conv. naz. “Piante Mediterranee”, Bari (Italy), Sept.
 1965 27–Oct. 1, 171 pp (In Italian).
- 1966 Dudai N., Chaimovitch D., Reuveni R., Ravid U., Larkov O., Putievsky E. (2002) Breeding of
 1967 sweet basil (*Ocimum basilicum*) resistant to *Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum* f.sp.
 1968 *basilicum*. In: C.B. Johnson, Ch. Franz (eds.), Breeding Research on Aromatic and Medicinal
 1969 Plants. The Haworth Herbal Press, Binghamton, NY, pp. 45–51.
- 1970 Dudai N., Lewinsohn E., Larkov O., Katzir I., Ravid U., Chaimovitch D., Sa’adi D., Putievsky
 1971 E. (1999) Dynamics of yield components and essential oil production in a commercial hybrid
 1972 Sage (*Salvia officinalis* cv. *Salvia fruticosa* cv. Newe Ya’ar No. 4). J. Agric. Food Chem., 47:
 1973 4341–4345.
- 1974 Durán Zuazo V.H., Francia Martínez J.R., Martínez Raya A. (2004) Impact of vegetative cover on
 1975 runoff and soil erosion at hillslope scale in Lanjaron, Spain. The Environmentalist, 24: 39–48.
- 1976 Elementi S., Neri R., D’Antuono L.F. (2006) Biodiversity and selection of “European” Basil (*Oci-
 1977 mum basilicum* L.) types. Acta Horticulturae, 723: 99–104.
- 1978 Etter S.C. (2004) *Rosmarinus officinalis* as an antioxidant. J. Herbs, Spices Med. Plants, 11(1/2):
 1979 121–159.
- 1980 Fahlén A., Welander M., Wennersten R. (1997) Effects of light-temperature regimes on plant
 growth and essential oil yield of selected aromatic plants. J. Sci. Food Agric., 73: 111–119.
- FAO (2007) FAO Statistics Division, Tradestat, Detailed Trade Data. Fao, Rome.
- FAO-CGIAR (1999) Reducing Poverty through Cutting-edge Science. CGIAR Research Priorities
 for Marginal Lands. International Centers Week, Oct. 25–29, Washington, DC, 136 pp.
- Ferrini F. (2003) Horticultural therapy and its effect on people’s health. Advances in Horticultural
 Sciences, 17(2): 77–87.

Essential Oil Crops for Sustainable Agriculture

- 1981 Fluck H. (1955) The influence of climate on the active principles in medicinal plants. *J. Pharm.*
 1982 *Pharmacol.*, 7: 361–383.
- 1983 Franz Ch. (1992) Genetica, biochimica e coltivazione della camomilla (*Chamomilla recutita* (L.)
 1984 Rausch.). *Agricoltura Ricerca*, 131: 87–95 (In Italian).
- 1985 Franz Ch. (1996) Significant medicinal and aromatic plants to be cultivated in the Mediterranean
 1986 region. *Proc. Int. Conf. “Coltivazione e miglioramento di piante officinali” – Trento (Italy)*,
 June 2–3, 1994, pp. 239–250 (In Italian, with English abstract).
- 1987 Gabler J. (2002) Breeding for resistance to biotic and abiotic factors in Medicinal and Aromatic
 1988 plants: general situation and current results in annual Caraway (*Carum carvi* L. var. *annuum*).
 1989 In: C.B. Johnson, Ch. Franz (eds.), *Breeding Research on Aromatic and Medicinal Plants*. The
 1990 Haworth Herbal Press, Binghamton, NY, pp. 1–11.
- 1991 Galambosi B., Szebeni-Galambosi Z. (1992) The use of black plastic mulch and ridges in the
 1992 production of herbicide free herbs. *Acta Horticulturae*, 306: 353–356.
- 1993 Garg H.P., Kumar R., Datta G. (1998) Simulation model of the thermal performance of a natural
 1994 convection-type solar tunnel dryer. *Int. J. Energy Res.*, 22(13): 1165–1177.
- 1995 Gatti E., Predieri S. (2006) Propagazione in vitro di specie della macchia mediterranea. *Proc. III*
 1996 *conv. naz. “Piante Mediterranee”*, Bari (Italy), Sept. 27–Oct 1, 67 (In Italian).
- 1997 Gil A., de La Fuente E.B., Lenardis A.E., López Pereira M., Suárez S.A., Bandoni A., Van Baren
 1998 C., Di Leo Lira P., Ghersa C.M. (2002) Coriander essential oil composition from two genotypes
 1999 grown in different environmental conditions. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 2870–2877.
- 2000 Giorgi A., Mandrini S., Bona S. (2006) Produzione di assenzio in Valle Camonica. *Proc. III conv.*
 2001 *naz. “Piante Mediterranee”*, Bari (Italy), Sept. 27–Oct. 1, 120 pp (In Italian).
- 2002 Goidanich G. (1981) *Manuale di Patologia vegetale*. Edagricole Publ., Bologna, Italy, vol. I:
 2003 713 pp; vol. IV: 839 pp (In Italian).
- 2004 Granger R., Passet J. (1973) *Thymus vulgaris* spontane de France: races chimiques et chemotax-
 2005 onomie. *Phytochemistry*, 12: 1683–1691 (In French, with English abstract).
- 2006 Granger R., Passet J., Arbousset G. (1973) *Plantes medicinales a essences et chimiotaxonomie*,
 2007 *Riv. Ital. EPPOS*, 6: 353–356 (In French, with English abstract).
- 2008 Grayer R.J., Kite G.C., Goldstone F.J., Bryan S.E., Paton A., Putievsky E. (1996) Intraspecific
 2009 taxonomy and essential oil chemotypes in sweet basil, *Ocimum basilicum*. *Phytochemistry*,
 2010 43(5): 1033–1039.
- 2011 Gruszczyk M. (2004) Effect of methods of peppermint culture on the yield and quality of herb
 2012 and leaves. In: S.-E. Jacobsen, C.R. Jensen, J.R. Porter (eds.), VIII ESA Congress “European
 2013 Agriculture in a Global Context”, Books of proceedings, Copenhagen (Denmark), July 11–15,
 2014 2004, pp. 515–516.
- 2015 Gung G.S., Kollmair M. (2005) Marginality: concepts and their limitations. North-South dia-
 2016 logue, IP6 Working Paper No. 4, 21 pp.
- 2017 Herrmann K.M. (1995) The shikimate pathway as an entry point to aromatic secondary
 2018 metabolism. *Plant Physiol.* 107: 7–12.
- 2019 Hirata K., Miyamoto K., Miura Y. (1994) *Catharanthus roseus* L. (Periwinkle): production of
 2020 Vindoline and Catharanthine in multiple shoot cultures. In: Y.P.S. Bajaj (ed.), *Biotechnology in*
 2021 *Agriculture and Forestry*, vol. 26, Medicinal and Aromatic Plants VI, pp. 46–55.
- 2022 Holm F.A., Slinkard A.E. (2002) Spice Breeding and Agronomic Research. AFIF Project
 2023 96000289: Res-ID IIFE (usask 7-74701). Final Report, Mar. 31, 2002. Crop Development Centre,
 2024 University of Saskatchewan, 14 pp.
- 2025 Hornok L. (1980) Effect of nutrition supply on yield of Dill (*Anethum graveolens* L.) and its
 essential oil content. *Acta Horticulturae*, 96: 337.
- Iapichino G., Amico Roxas U., Bertolino M. (2006) Esperienze sulla propagazione in vitro di un
 ecotipo siciliano di *Thymus capitatus*. *Proc. III conv. naz. “Piante Mediterranee”*, Bari (Italy),
 Sept. 27–Oct. 1, 124 pp (In Italian).
- Ietswaart J.H. (1980) A taxonomic revision of the genus *Origanum* (*Labiatae*). Leiden Botanical
 series, vol. 4, Leiden University Press, The Hague.

- 2026 IIRR (1993) International institute of rural reconstruction. The bio-intensive approach to small-
 2027 scale household food production. Silang, Cavite (Philippines), 180 pp.
- 2028 ITC (2006) International Trade Centre, UNCTAD/WTO. Product and Market Development –
 2029 World Markets in the Spice Trade 2000–2004. Geneva, Switzerland, 111 pp.
- 2030 ITC (2006a) International Trade Centre, UNCTAD/WTO. Marketing Manual and Web Directory
 2031 for Organic Spices, Culinary Herbs and Essential Oils. 2nd Edition. Geneva, Switzerland,
 2032 52 pp.
- 2033 Jerkovic I., Mastelic J., Milos M. (2001) The impact of both the season of collection and drying
 2034 on the volatile constituents of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* growing wild in Croatia. Int. J.
 2035 Food Sci. Technol., 36: 649–654.
- 2036 Joy P.P., Thomas J., Mathew S., Jose G., Joseph J. (2001) Aromatic plants. In: T.K. Bose, J. Kabir,
 2037 P. Das, P.P. Joy (eds.), Tropical Horticulture, vol. 2, Naya Prokash, Calcutta, India, pp. 633–733.
- 2038 Kalembe D., Kunicka A. (2003) Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Curr.
 2039 Med. Chem., 10(10): 813–829.
- 2040 Kallapurackal J.A., Ravindran P.N. (2005) Over 225 hi-yielding spice varieties in India (part IV),
 2041 Spice India, July, pp. 36–49.
- 2042 Katerinopoulos H.E., Pagona G., Afratis A., Stratigakis N., Roditakis N. (2005) Composition and
 2043 insect attracting activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis*. J. Chem. Ecol., 31(1):
 2044 111–122.
- 2045 Kaul P.N., Rajeswara Rao B.R., Singh K., Singh C.P. (1997). Effect of partial shade on essential
 2046 oils of three geranium (*Pelargonium* species) cultivars. Indian Perfum., 41(1): 1–4.
- 2047 Kosar M., Özek T., Göger F., Kürkcüoğlu M., Baser K.H.C. (2005) Comparison of microwave-
 2048 assisted hydrodistillation and hydrodistillation methods for the analysis of volatile secondary
 2049 metabolites. Pharmaceutical Biol., 43(6): 491–495.
- 2050 Kothari S.K., Singh S., Singh U.B., Kumar S. (1999) Response of bergamot mint (*Mentha citrata*)
 2051 to vesicular arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorous supply. J. Med. Aromatic Plant Sci.,
 2052 21(4): 990–995.
- 2053 Kristiansen P.E. (2003) Sustainable weed management in organic herb and vegetable production.
 2054 Ph.D. thesis, University of New England, June 2003, 225 pp.
- 2055 Kutchan T.M. (1995) Alkaloid biosynthesis – the basis for metabolic engineering of medicinal
 2056 plants. Plant Cell, 7: 1059–1070.
- 2057 Lamarti A., Badoc A., Deffieux G., Carde J.-P. (1994) Biogénèse des Monoterpènes – II – La
 2058 chaîne isoprénique. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 133: 79–99 (In French).
- 2059 Landi R. (1994) Il miglioramento genetico delle specie aromatiche e medicinali. Atti Accad. Geor-
 2060 gofil, Firenze, vol. XL: 161–189 (In Italian).
- 2061 Landi R., Bertone G. (1996) Tecniche seguite nella costituzione di una varietà sintetica di *Salvia*
 2062 *officinalis* L. Atti Conv. Int. “Coltivazione e miglioramento delle piante officinali”. Trento
 2063 (Italy), June 2–3, 1994, pp. 667–672 (In Italian, with English abstract).
- 2064 Langbehn J., Pank F., Novak J., Franz Ch. (2002) Influence of selection and inbreeding on *Ori-*
 2065 *ganum majorana* L. In: C.B. Johnson, Ch. Franz (eds.), Breeding Research on Aromatic and
 2066 Medicinal Plants. The Haworth Herbal Press, Binghamton, NY, pp. 21–29.
- 2067 Lawrence B.M. (1994) Progress in essential oils. Perfumer & Flavorist, 19(5): 83–95.
- 2068 Lawrence B.M. (1996) Progress in essential oils. Perfumer & Flavorist, 21(3): 55–67.
- 2069 Lawrence B.M. (1998) Progress in essential oils. Perfumer & Flavorist, 23(3): 39–50.
- 2070 Leto C., Carrubba A., Trapani P. (1996) Effetti dell’epoca di semina sul finocchio da seme
 (*Foeniculum vulgare* Mill.) nell’ambiente caldo-arido siciliano. Atti Conv. Int. “Coltivazione
 e miglioramento delle piante officinali”. Trento (Italy), June 2–3, 1994, 513–522 (In Italian,
 with English abstract).
- Leto C., La Bella S., Tuttolomondo T., Licata M., Carrara M., Febo P., Catania P., Orlando S.
 (2002) La risposta dell’origano a diverse densità di investimento. Osservazioni preliminari
 sulla raccolta meccanica. Proc. Workshop “Piante Medicinali: prospettive per la coltivazione
 ed esigenze di ricerca”, Sanremo (Italy), Mar. 21 2002 (In Italian).
- Lodi G. (1986) Piante officinali italiane. Edagricole Publ., Bologna, Italy, 792 pp (In Italian).

Essential Oil Crops for Sustainable Agriculture

- 2071 Luayza G., Brevedan R., Palomo R. (1996). Coriander under irrigation in Argentina. In J. Janick
2072 (ed.), *Progress in New Crops*. ASHS Press, Arlington, VA, pp. 590–594.
- 2073 Lucchesini M., Blando F., Mensuali Sodi A. (2003) Coltivazione di specie officinali: dalle colture
2074 in vitro convenzionali ai protocolli alternativi di propagazione in vitro per la realizzazione di
2075 colture “microponiche”. *Italus Hortus*, 10(3): 166–168 (In Italian, with English abstract).
- 2076 Macchia M., Moscheni E., Angelini L.G. (1996) La germinazione dei semi di lavanda: aspetti
2077 legati alla dormienza e metodi atti ad aumentare il vigore. *Proc. Int. Congr. “Coltivazione e
2078 miglioramento di piante officinali”*, Trento (Italy), June 2–3, 1994, pp. 391–397 (In Italian,
2079 with English abstract).
- 2080 Macchia M., Pagano A., Ceccarini L., Benvenuti S., Cioni P.L., Flamini G. (2006) Agronomic and
2081 phytochemical characteristics in some genotypes of *Ocimum basilicum* L. *Acta Horticulturae*,
2082 723: 143–149.
- 2083 Maffei M., Canova D., Berteza C.M., Scannerini S. (1999) UV-A effects on photomorphogene-
2084 sis and essential-oil composition in *Mentha piperita*. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 52:
2085 105–110.
- 2086 Maleci Bini L., Giuliani C. (2006) The glandular trichomes of the *Labiatae*. A review. *Acta Horti-
2087 culturae*, 723: 85–90.
- 2088 Malizia R.A., Molli J.S., Cardell D.A., Retamar J.A. (1996) Essential oil of *Mentha citrata* grown
2089 in Argentina. Variation in the composition and yield at full-and post-flowering. *J. Essential Oil
2090 Res.*, 4(8): 347–349.
- 2091 Marotti M., Piccaglia R., Giovanelli E. (1996) Differences in essential oil composition of basil
2092 (*Ocimum basilicum*L.) Italian cultivars related to morphological characteristics. *J. Agric. Food
2093 Chem.*, 44: 3926–3929.
- 2094 Martini A. (1996) Prototipo per il pirodiserbo delle colture officinali. *Atti Conv. Int. “Coltivazione
2095 e miglioramento delle piante officinali”*. Trento (Italy), June 2–3, 1994, 663–666 (In Italian).
- 2096 Masood A., Asghar Hussain S., Zubair M., Rab A. (2004) Effect of different sowing seasons and
2097 row spacing on seed production of Fennel (*Foeniculum vulgare*). *Pakistan J. Biol. Sci.*, 7(7):
2098 1144–1147.
- 2099 McConnell J., Anderson S. (2002). Micronutrients for Coriander and Dill; macronutrients for
2100 coriander, dill, and caraway. In: Spoke Program Research Report, Saskatchewan Agriculture
2101 and Food, pp. 175–176.
- 2102 Melegari M., Severi F., Bertoldi M., Benvenuti S., Circella G., Morone Fortunato I., Bianchi A.,
2103 Leto C., Carrubba A. (1995) Chemical characterization of essential oils of some *Origanum vul-
2104 gare* L. sub-species of various origin, *Riv. It. EPPOS (Essenze, Profumi, P. Officin. e Saponi)*,
2105 16(8): 21–28.
- 2106 Mentreddy S.R., Mohamed A.I., Rimando A.M. (2005) Medicinal plants with hypoglycemic/anti-
2107 hyperglycemic properties: a review. *Proc. 2005 AAIC Annual Meeting: Intern. Conf. on Indust-
2108 rial Crops and Rural Development, Murcia (Spain)*, Sept. 17–21.
- 2109 Mirshekari B. (2004) Effects of sowing dates and plant densities on seed yield and seed essence
2110 of cumin “*Cuminum cyminum*” in Tabriz region. In: S.-E. Jacobsen, C.R. Jensen, J.R. Porter
2111 (eds.), VIII ESA Congress “European Agriculture in a Global Context”, Books of proceedings.
2112 Copenhagen (Denmark), July 11–15, 2004, pp. 941–942.
- 2113 Misra P., Chaturvedi H.C. (1984) Micropropagation of *Rosmarinus officinalis* L. *Plant Cell Tiss.
2114 Org. Cult.* 3: 163–168.
- 2115 Misra A., Srivastava N.K. (2000) Influence of water stress on Japanese Mint. *J. Herbs, Spices and
Med. Plants*, 7(1): 51–58.
- Mohan L. (1994) Sclerotinia rot in rosemary. *Indian Phytopathol.* 47: 443.
- Motsa N.M., Soundy P., Steyn J.M., Learmonth R.A., Mojela N., Teubes C. (2006) Plant shoot
age and temperature effects on essential oil yield and oil composition of rose-scented geranium
(*Pelargonium* sp.) grown in South Africa. *J. Essential Oil Res.*, 18: 106–110.
- Mulas M., Dias Francesconi A.H., Perinu B., Del Vais E. (2002) Selection of Rosemary (*Ros-
marinus officinalis* L.) cultivars to optimize biomass yield. In: C.B. Johnson, Ch. Franz (eds.),
Breeding Research on Aromatic and Medicinal Plants. The Haworth Herbal Press, Binghamton,
NY, pp. 133–138.

- 2116 Mulas M., Mulas G. (2005) Cultivar selection from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) sponta-
 2117 neous populations in the Mediterranean area. *Acta Horticulturae*, 676: 127–133.
- 2118 Mugnai L., Anzidei M. (1994) Casi di necrosi corticale da *Phomopsis foeniculi* del finocchio da
 2119 seme in Italia. *Petria*, 4(3): 237–244 (In Italian, with English abstract).
- 2120 Müller-Riebau F.J., Berger B.M., Yegen O., Cakir C. (1997) Seasonal variations in the chemical
 2121 compositions of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. *J. Agric.*
Food Chem., 45: 4821–4825.
- 2122 Munné - Bosch S., Alegre L. (2001) Subcellular compartmentation of the diterpene carnosic acid
 2123 and its derivatives in the leaves of rosemary. *Plant Physiol.*, Feb., 125: 1094–1102.
- 2124 Nevo D. (1998) Rosemary: developing a new field crop. Proc. Annual Conference on “New Crops
 2125 and New Uses: Biodiversity and Sustainability”, Nov. 8–11, Phoenix, Arizona, USA.
- 2126 Novak J. (2006) Molecular support for genetic improvement of *Lamiaceae*. *Acta Horticulturae*,
 2127 723: 61–67.
- 2128 Olesen J.E., Bindi M. (2002) Consequences of climate change for European agricultural produc-
 2129 tivity, land use and policy, *Eur. J. Agron.*, 16: 239–262.
- 2130 Olszowska O., Furmanowa M. (1990) Micropropagation of *Salvia officinalis* by shoot buds. *Planta*
 2131 *Medica*, 56: 637.
- 2132 Omer E.A., Ouda H.E., Ahmed S.S. (1994) Cultivation of sweet marjoram *Majorana hortensis* in
 2133 newly reclaimed lands of Egypt. *J. Herbs, Spices Med. Plants*, 2: 9–16.
- 2134 Pank F. (1992) The influence of chemical weed control on quality characters of medicinal plants.
 2135 *Acta Horticulturae*, 306: 145–154.
- 2136 Pank F. (1993) Methods of contemporary large scale cultivation of medicinal and aromatic plants.
 2137 *Acta Horticulturae*, 331: 89–108.
- 2138 Paris M., Bercht C.A.L., Unger J., Clair G. (1974) Intérêt de la Menthe-bergamote en aromatique.
 2139 *Riv. Ital. EPPOS*, 11: 655–658 (In French).
- 2140 Pauli A., Knobloch K. (1987) Inhibitory effects of essential oil components on growth of food-
 2141 contaminating fungi. *Z. Lebensm. Unters Forsch*, 185: 10–13.
- 2142 Perry N.B., Anderson R.E., Brennan N.J., Douglas M.H., Heaney A.J., McGimpsey J.A., Small-
 2143 field B.M., (1999) Essential oils from Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.): variations among
 2144 individuals, plant parts, seasons, and sites. *J. Agric. Food Chem.*, 47(5): 2048–2054.
- 2145 Petersen M. (1994) *Coleus* spp.: in vitro culture and the production of Forskolol and Rosmarinic
 2146 acid. In: Y.P.S. Bajaj (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 26, *Medicinal and*
 2147 *Aromatic Plants VI*, pp. 69–92.
- 2148 Piccaglia R., Dellacecca V., Marotti M., Giovanelli E. (1993) Agronomic factors affecting the
 2149 yields and the essential oil composition of peppermint (*Mentha x piperita* L.). *Acta Horticul-*
 2150 *turae*, 344: 29–40.
- 2151 Piccaglia R., Marotti M., Galletti G.C. (1991) Characterization of essential oil from a *Satureja*
 2152 *montana* L. chemotype grown in northern Italy. *J. Essential Oil Res.*, 3: 157–162.
- 2153 Pintore G., Usai M., Bradesi P., Juliano C., Boatto G., Tomi F., Chessa M., Cerri R., Casanova J.
 2154 (2002) Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from
 2155 Sardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance J.*, 17: 15–19.
- 2156 Platin S., Özer E.Ö., Akman U., Hortaçsu Ö. (1994) Equilibrium distribution of key components
 2157 of spearmint oil in sub/supercritical carbon dioxide. *JAOCS*, 71(8): 833–837.
- 2158 Prohens J., Rodríguez-Burruero A., Nuez F. (2003) New crops: an alternative for the development
 2159 of horticulture. *Food, Agric. Environ.*, 1(1): 75–79.
- 2160 Putievsky E., Ravid U., Dudai N. (1988) Phenological and seasonal influences on essential oil of a
 cultivated clone of *Origanum vulgare* L. *J. Sci. Food Agric.*, 43: 225–228.
- Quinn J., Belkowitz N., Schortz J. (1998) An on-farm evaluation of sustainable herb production
 for small farmers in three states. Proc. Annual Conference on “New Crops and New Uses:
 Biodiversity and Sustainability”. Nov. 8–11, Phoenix, Arizona.
- Radanović D., Antić M.S., Sekulić P., Nastovski T. (2004) Influence of soil characteristics and
 nutrient supply on medicinal and aromatic plants. Proc. 3rd Conference on Medicinal and Aromatic
 Plants of Southeast European Countries, Nitra (Slovak Republic), Sept. 5–8, 2004, 15 pp.

Essential Oil Crops for Sustainable Agriculture

- 2161 Rajeswara Rao B.R. (1999) Biomass and essential oil yields of cornmint (*Mentha arvensis* L. f.
2162 *piperascens* Malinvaud ex Holmes) planted in different months in semi-arid tropical climate.
2163 *Industrial Crops and Products*, 10: 107–113.
- 2164 Rajeswara Rao B.R., Kaul P.N., Syamasundar K.V., Ramesh S. (2005) Chemical profiles of primary
2165 and secondary essential oils of palmarosa (*Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats var. *motia* Burk.
2166 *Industrial Crops and Products*, 21: 121–127.
- 2167 Raven P.E., Evert R.F., Curtis H. (1979) *Biologia delle piante*. Zanichelli Publ., Bologna, Italy,
2168 620 pp (Italian translation from the original).
- 2169 Retamar J.A. (1993) Flower extracts for perfumery, cosmetics and therapeutical fragrances.
2170 Hexagon dragoco of the fragrance families. *Ess. Der. Agrum*, 3: 2–7.
- 2171 Rey C. (1992) Selection of thyme for extreme areas (of Switzerland). *Acta Horticulturae*, 306:
2172 66–70.
- 2173 Riela S., Bruno M., Formisano C., Rigano D., Rosselli S., Saladino M.L., Senatore F. (2008)
2174 Effects of solvent-free microwave extraction on the chemical composition of essential oil of
2175 *Calamintha nepeta* (L.) Savi compared with the conventional production method. *J. Sep. Sci.*,
2176 31: 1–8.
- 2177 Rigoldi M.P., Satta D. (2006) Propagazione in vitro di alcuni cloni di mirto della Sardegna meridionale.
2178 Proc. III conv. naz. “Piante Mediterranee”, Bari (Italy), Sept. 27–Oct. 1: 140 (In Italian).
- 2179 Ristorcelli D., Tomi F., Casanove J. (1996) Essential oils of *Calamintha nepeta* subsp. *nepeta* and
2180 subsp. *glandulosa* from Corsica (France). *J. Essential Oil Res.*, 8(4): 363–366.
- 2181 Rodrigues L.S., Monteiro P., Moldão-Martins M., Monteiro A., Póvoa O., Teixeira G. (2006) Bio-
2182 diversity studies on Portuguese *Thymbra capitata*. *Acta Horticulturae*, 723: 127–132.
- 2183 Roller S. (1995) The quest for natural antimicrobials as novel means of food preservation: status
2184 report on a European Research Project. *Int. biodeterioration and biodegradation*, 333–345.
- 2185 Ruta C., Perrini R., Blanco A., Morone Fortunato I. (2006) Ottimizzazione del protocollo di micro-
2186 propagazione per l’*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. Proc. III conv. naz. “Piante Mediter-
2187 raneanee”, Bari (Italy), Sept. 27–Oct. 1, 142 pp (In Italian).
- 2188 Salvatore G., Tateo F. (1992) Oli essenziali e corrispondenti ricostituiti: correlazioni, realtà strut-
2189 turali ed applicative. *Ind. bevande*, 21, Feb.: 5–12 (In Italian, with English abstract).
- 2190 SAN (2004) Sustainable Agricultural Network. *Diversifying Cropping Systems*, 20 pp.
- 2191 Sangwan N.S., Farooqi A.H.A., Shabih F., Sangwan R.S. (2001) Regulation of essential oil pro-
2192 duction in plants. *Plant Growth Regulation* 34: 3–21.
- 2193 Santos P.M., Figueiredo A.C., Oliveira M.M., Barroso J.G., Pedro L.G., Deans S.G., Younus
2194 A.K.M., Scheffer J.J.C. (1998) Essential oils from hairy root cultures and from fruits and roots of
2195 *Pimpinella anisum*. *Phytochemistry*, 48(3): 455–460.
- 2196 Santos-Gomes P.C., Fernandes-Ferreira M. (2003) Essential oils produced by in vitro shoots of
2197 Sage (*Salvia officinalis* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 51: 2260–2266.
- 2198 Savona M., Mascarello C., Bisio A., Romussi G., Profumo P., Warchol M., Bach A., Ruffoni B.
2199 (2003) *Salvia cinnabarina* Martens & Galeotti: optimisation of the extraction of a new com-
2200 pound, tissue culture and hairy root transformation. *Agricoltura Mediterranea*, 133: 28–35.
- 2201 Scarpa G.M., Dedola R., Mereu A.R. (2006) Moltiplicazione in vitro di *Salvia desoleana* Atzei
2202 & Picci. Proc. III conv. naz. “Piante Mediterranee”, Bari (Italy), Sept. 27–Oct. 1, 143 pp (In
2203 Italian).
- 2204 Scarpa G.M., Milia M., Addis E. (2004) Influenza della densità di impianto sulla coltivazione
2205 dell’origano. *Italus Hortus*, 11(4): 222–224 (In Italian, with English abstract).
- 2206 Scartezzini F., Aiello N., Vender C., Costantino L. (2006) Influence of two plant materials on oil
2207 content and composition of three garden Sage varieties. *Acta Horticulturae*, 723: 227–231.
- 2208 Schippmann U., Leaman D.J., Cunningham A.B. (2002) Impact of cultivation and gathering of
2209 Medicinal Plants on biodiversity: global trends and issues. In: *FAO, 2002. “Biodiversity and the
2210 ecosystem approach in Agriculture, Forestry and Fisheries”*. Satellite event on the occasion of
2211 the Ninth Regular Session of the Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture,
2212 Oct. 12–13, 2002. Inter-Departmental Working Group on Biological Diversity for Food and
2213 Agriculture, Rome, 21 pp.

- 2206 Sedláková J., Kocourková B., Lojková L., Kubáň V. (2003) Determination of essential oil content in caraway (*Carum carvi* L.) species by means of supercritical fluid extraction. *Plant Soil Environ.*, 49(6): 277–282.
- 2207
- 2208 Sedláková J., Kocourková B., Lojková L., Kubáň V. (2003a) The essential oil content in caraway species (*Carum carvi* L.). *Hort.Sci. (Prague)*, 30(2): 73–79.
- 2209
- 2210 Shalaby A.S., El-Gengaihi S., Khatib M. (1995) Oil of *Melissa officinalis* L., as affected by storage and herb drying. *J. Essential Oil Res.*, 7(6): 667–669.
- 2211
- 2212 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.
- 2213
- 2214 Shultz G., Stahl-Biskup E. (1991) Essential oils and glycosidic-bound volatiles from leaves, stems, flowers and roots of *Hyssopus officinalis* L. (*Lamiaceae*). *Flavour and Fragrance J.*, 6(1): 69–73.
- 2215
- 2216 Sifola M.I., Barberi G. (2006) Growth, yield and essential oil content of three cultivars of basil grown under different levels of nitrogen in the field. *Scientia Horticulturae*, 108: 408–413.
- 2217
- 2218 Simmonds M.S.J. (1997) Actividad antiinsectos en plantas: insecticidad y modificadores del comportamiento. *Consejería de medio ambiente, agricultura y agua. Murcia (Spain)*, pp. 11–25 (In Spanish).
- 2219
- 2220 Simon J.E. (1990) Essential oils and culinary herbs. In: J. Janick and J.E. Simon (eds.), *Advances in New Crops*. Timber Press, Portland, OR, pp. 472–483.
- 2221
- 2222 Simon J.E. (1993) New crop introduction: exploration, research and commercialization of aromatic plants in the new world. *Acta Horticulturae*, 331: 209–221.
- 2223
- 2224 Simon, J.E., Chadwick A.F., Craker L.E. (1984) Herbs: an indexed bibliography, 1971–1980. The scientific literature on selected herbs, and aromatic and medicinal plants of the temperate zone. Archon Books: 770 pp.
- 2225
- 2226 Simon J.E., Quinn J., Murray R.G. (1990) Basil: A source of essential oils. In: J. Janick, J.E. Simon (eds.), *Advances in New Crops*. Timber Press, Portland, OR, pp. 484–489.
- 2227
- 2228 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 pp.
- 2229
- 2230 Smallfield B.M., Perry N.B., Beauregard D.A., Foster L.M., Dodds K.G. (1994) Effects of postharvest treatments on yield and composition of Coriander herb oil. *J. Agric. Food Chem.*, 42: 354–359.
- 2231
- 2232 Su W.W., Asali E.C., Humphrey A.E. (1994) *Anchusa officinalis*: production of Rosmarinic acid in perfusion cell cultures. In: Y.P.S. Bajaj (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 26. Medicinal and Aromatic Plants VI, pp. 1–20.
- 2233
- 2234 Tariqul Islam Md., Leunufna S., Dembele D.P. Joachim Keller E.R. (2003) In vitro conservation of four mint (*Mentha* spp.) accessions, *Plant Tissue Cult.* 13(1): 37–46.
- 2235
- 2236 Thomas C.D. et al. (2004) Extinction risk from climate change. *Nature*, 427: 145–148.
- 2237
- 2238 Thomas L.V., Dorko C. (2006) Natural antioxidant and antimicrobial solutions used in food. *Acta Horticulturae*, 709: 15–21.
- 2239
- 2240 Trivino M.G., Johnson C.B. (2000) Season has a major effect on the essential oil yield response to nutrient supply in *Origanum majorana*. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.*, 75(5): 520–527.
- 2241
- 2242 Tucker A.O., Maciarello M.J., Howell J.T. (1984) A preliminary analysis of some lavender and lavandin cultivars. *Perfumer and Flavorist*, 4(9): 49–52.
- 2243
- 2244 UN (2002) United Nations Report of the World Summit on Sustainable Development, Johannesburg, South Africa, Aug. 26–Sept. 4, 2002. A/CONF.199/20, United Nations publication Sales No. E.03.II.A.1.
- 2245
- 2246 UN-ESC (2008) United Nations Economic and Social Council, Commission on Sustainable Development, Sixteenth session. Rural development. *J. United Nations 2008/90, E/CN.17/2008/4*, 21 pp.
- 2247
- 2248 Ursulino Alves E., Pereira De Oliveira A., De Lucena Alcântara Bruno R., Sader R., Ursulino Alves A. (2005) Rendimento e qualidade fisiológica de sementes de coentro cultivado com adubação orgânica e mineral. *Revista Brasileira de Sementes*, 27: 132–137 (In Portuguese, with English abstract).
- 2249
- 2250

Essential Oil Crops for Sustainable Agriculture

- 2251 Van Beek T.A., de Groot A.E. (1986) Terpenoid antifeedant (part I). An overview of terpenoid
2252 antifeedants of natural origin. Recl. Trav. Chim. Pays-Bas, CV: 513–527.
- 2253 Verlet N. (1992) Trends of the medicinal and aromatic plant sector in France. Acta Horticulturae,
2254 306: 169–175.
- 2255 Ventrella D., Giglio L., Moriondo M., Bindi M. (2007) Soil water balance of a winter crop culti-
2256 vated in southern Italy as influenced by future climate. Proc. I Congr. Farming System Design
2257 2007 – Farm-regional scale design and improvement. Catania (Italy), Sept. 10–12, pp. 185–186.
- 2258 Vicente M.J., Martínez-Sánchez J.J., Conesa E., Bañón S., Navarro A., Sánchez-Blanco M.J.
2259 (2006) Studio della modificazione dello sviluppo e dello stato idrico di piantine di *Myrtus com-
2260 munitis* causati da deficit idrico e paclobutrazolo. Proc. III conv. naz. “Piante Mediterranee”, Bari
2261 (Italy), Sept. 27–Oct. 1, 194 pp (In Italian).
- 2262 Voirin B., Brun N., Bayet C. (1990) Effects of daylength on the monoterpene composition of leaves
2263 of *Mentha piperita*. Phytochemistry, 29(3): 749–755.
- 2264 Wagner C., Friedt W., Marquard R.A., Ordon F. (2005) Molecular analyses on the genetic diver-
2265 sity and inheritance of (α)-a-bisabolol and chamazulene content in tetraploid chamomile
2266 (*Chamomilla recutita* (L.) Rausch.). Plant Sci., 169: 917–927.
- 2267 Wahab J., Larson G. (2002) German Chamomile – agronomic practices for Saskatchewan produc-
2268 tion. In: Spoke Program Research Report, Saskatchewan Agriculture and Food, pp. 191–192.
- 2269 Weiss E.A. (1997) Essential Oil Crops. CABI Publishing, Wallingford, UK, 616 pp.
- 2270 Werker E., Ravid U., Putievsky E. (1985) Glandular hairs and their secretions in the vegetative and
2271 reproductive organs of *Salvia sclarea* and *S. dominica*. Israel J. Bot., 34: 239–252.
- 2272 WHO (2003) World Health Organization. WHO guidelines on good agricultural and collection
2273 practices (GACP) for medicinal plants. Geneva, Switzerland, 72 pp.
- 2274 Zehtab-Salmasi S., Javanshir A., Omidbaigi R., Alyari H., Ghassemi-Golezani K (2004) Effects
2275 of water supply and sowing date on water use efficiency of anise (*Pimpinella anisum* L.). In:
2276 S.-E. Jacobsen, C.R. Jensen, J.R. Porter (eds.), VIII ESA Congress “European Agriculture in a
2277 Global Context”, Books of proceedings Copenhagen (Denmark), July 11–15, 2004.
- 2278 Zheljzkov V.D., Topalov V. (1992) Effect of mechanical and chemical weed control on the growth,
2279 development and productivity of *Mentha* growing for planting material. Proc. 23rd Int. Symp.
2280 on Essential Oils. SAC, Auchincruive, Ayr, Scotland, UK, Sept. 9–12, 1992.
- 2281
- 2282
- 2283
- 2284
- 2285
- 2286
- 2287
- 2288
- 2289
- 2290
- 2291
- 2292
- 2293
- 2294
- 2295

AQ4

Chapter 8

2296
2297
2298
2299
2300
2301
2302
2303
2304
2305
2306
2307
2308
2309
2310
2311
2312
2313
2314
2315
2316
2317
2318
2319
2320
2321
2322
2323
2324
2325
2326
2327
2328
2329
2330
2331
2332
2333
2334
2335
2336
2337
2338
2339
2340

Q. No.	Query
AQ1	Please provide citation for all figures.
AQ2	Please specify whether “Carrubba et al. (2006)” should be 2006a or 2006b or 2006c?
AQ3	“Dellacecca (1996a)” is not cited in the text part. Please provide.
AQ4	“Werker et al. (1985)” is not cited in the text part. Please provide.

UNCORRECTED PROOF