

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

Dottorato di Ricerca in
Scienze Geologiche, Biologiche e Ambientali
XXXI Ciclo 2015-2018



CHEMOTASSONOMIA E ATTIVITÀ BIOLOGICA DEGLI OLI
ESSENZIALI DI *TAXA* DEL GENERE *THYMUS*

Carmen Impelluso

Tutor:
Chiar.ma Prof.ssa Antonia Cristaudo

Co-tutors:
Chiar.mo Dott. Giuseppe Ruberto
Chiar.mo Prof.re Andrea Onofri

Coordinatore: Chiar.ma Prof.ssa Agata Di Stefano

INDICE

ABSTRACT	4
RIASSUNTO.....	5
CAPITOLO 1	
IL GENERE <i>THYMUS</i>	6
1. INTRODUZIONE	7
1.1 Inquadramento tassonomico	10
1.2 Caratteristiche generali	12
2. MATERIALI E METODI	14
2.1 <i>Taxa</i> allo studio.....	14
2.2 Analisi morfologica	16
2.3 Identificazione dei <i>taxa</i>	16
3. SCHEDE BOTANICHE	17
CAPITOLO 2	
CHEMOTASSONOMIA DEL GENERE <i>THYMUS</i>	42
1 INTRODUZIONE	43
2. MATERIALI E METODI	47
2.1 Trattamento del materiale vegetale.....	47
2.2 Estrazione e analisi degli oli essenziali	49
2.3 Identificazione dei componenti.....	51
2.4 Analisi statistica.....	51
3. RISULTATI E DISCUSSIONI	52
3.1 Rese in olio essenziale	52
3.2 Composizione chimica degli oli essenziali.....	54
3.2.1 Oli essenziali parti vegetative (accessioni 2016)	65
3.2.2 Oli essenziali parti vegetative (accessioni 2017).....	68
3.2.3 Comparazione tra oli essenziali di accessioni 2016/2017	72
3.2.4 Comparazione tra oli essenziali di parti vegetative e fiorali.....	77
3.3 Considerazioni	80
CAPITOLO 3	
ATTIVITÀ DEGLI OLI ESSENZIALI DI <i>THYMUS</i> SPP. SU GERMINAZIONE E CRESCITA DI PIANTE INFESTANTI	83
1. INTRODUZIONE	84
2. MATERIALI E METODI	89
2.1 Materiale vegetale per i saggi di bioattività <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	89

2.2 Preparazione delle nanoemulsioni	90
2.3 Preparazione delle nanoparticelle di zeina	90
2.3.1 Dimensione media delle nanoparticelle e potenziale- ζ	91
2.4 Test di germinazione <i>in vitro</i> con oli essenziali “tal quali”	92
2.5 Test di germinazione <i>in vitro</i> con olio essenziale di <i>Thymus spinulosus</i> in nanoemulsione e in nanoparticelle	95
2.6 Test di tossicità <i>in vivo</i> con olio essenziale di <i>Thymus spinulosus</i> in soluzione acquosa	96
2.7 Analisi statistica.....	98
3. RISULTATI	99
3.1 Attività <i>in vitro</i> degli oli essenziali “tal quali” sulla germinazione di piante infestanti.....	99
3.1.1 Olio essenziale di <i>Thymus longicaulis subsp. longicaulis</i>	100
3.1.2 Olio essenziale di <i>Thymus paronychioides</i> (accessioni TP-VENT-2017, TP- Camm-2017).....	102
3.1.3 Olio essenziale di <i>Thymus praecox subsp. parvulus</i>	104
3.1.4 Olio essenziale di <i>Thymus richardii subsp. nitidus</i>	105
3.1.5 Olio essenziale di <i>Thymus spinulosus</i>	106
3.1.6 Olio essenziale di <i>Thymus vulgaris subsp. vulgaris</i>	107
3.2 Attività <i>in vitro</i> degli oli essenziali “tal quali” sull’accrescimento di piante infestanti	108
3.2.1 Olio essenziale di <i>Thymus longicaulis subsp. longicaulis</i>	110
3.2.2 Olio essenziale di <i>Thymus paronychioides</i> (accessioni TP-VENT-2017, TP- Camm-2017)	112
3.2.3 Olio essenziale di <i>Thymus praecox subsp. parvulus</i>	114
3.2.4 Olio essenziale di <i>Thymus richardii subsp. nitidus</i>	116
3.2.5 Olio essenziale di <i>Thymus spinulosus</i>	117
3.2.6 Olio essenziale di <i>Thymus vulgaris subsp. vulgaris</i>	119
3.3 Attività dell’olio essenziale di <i>Thymus spinulosus</i> in nanoemulsione e in nanoparticelle sulla germinazione dei semi e sull’accrescimento di piante infestanti	120
3.4 Attività erbicida dell’olio essenziale di <i>Thymus spinulosus</i> in soluzione acquosa	123
4. DISCUSSIONI	127
5. CONCLUSIONI	131
BIBLIOGRAFIA	133
RINGRAZIAMENTI	159

ABSTRACT

High taxonomic confusion associated with low morphological disparity makes the genus *Thymus* an ideal model system to study chemical profiles to resolve taxonomic status. Furthermore, the genus contains species that have chemicals that can be phytotoxic (harmful to plants), which can prove useful for developing as natural herbicides. During my PhD program, I characterized the chemical constituents of essential oils from different *taxa* of the *Thymus* genus and used chemotaxonomic markers to resolve the taxonomic confusion. The analysis of the chemical components of essential oils was carried out using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/FID, GC/MS) in multiple different *taxa*: *T. longicaulis* C. Presl subsp. *longicaulis*; *T. paronychioides* Čelak., *T. praecox* Opiz subsp. *parvulus* (Lojac.) Bartolucci, Peruzzi & N.G. Passal., *T. spinulosus* Ten., *T. richardii* Pers. subsp. *nitidus* (Guss.) Jalas, *T. striatus* Vahl subsp. *striatus*, *T. vulgaris* L. subsp. *vulgaris*, *Thymus* sp.

To quantify both the intra and interspecific similarity of chemical components, we conducted a cluster analysis using UPGMA (Unweighted pair method using arithmetic averages) based on Euclidean distances. My research also focused on evaluating the biological activity of *Thymus* essential oils, *in vitro* and *in vivo*, against the germination, survival, and growth of weeds for their potential use as bio-herbicides. To do so, I performed phytotoxicity assays on a range of *taxa* (*Amaranthus blitum* L., *Amaranthus retroflexus* L., *Portulaca oleracea* s.l., *Avena fatua* L., *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv. e *Lepidium sativum* L.) by evaluating the effect of essential oils *in vitro*, on seeds and seedlings, calculating the percentages of germination inhibition (GI%) and phytotoxicity. I then tested the effects *in vivo* by estimating phytotoxicity on plant tissue using a scale of values related to the degree of damage suffered. Overall, the chemical characterization of essential oils showed intra and interspecific variability, and contributed to consolidating the taxonomic relationships among the *taxa* within Sicily. The phytotoxicity assays exhibited a significant inhibiting action of the essential oils of *T. longicaulis* subsp. *longicaulis*, *T. praecox* subsp. *parvulus*, *T. spinulosus* and *T. vulgaris* subsp. *vulgaris*. Results from my dissertation showed that differences in chemical composition of aromatic species can resolve difficult taxonomic scenarios. I characterized the essential oils that can be used as bioherbicide agents in several species, which will be interesting for practical applications in agronomy.

KEY-WORDS: *Thymus*, Lamiaceae, essential oils composition, chemotaxonomy, phytotoxicity.

RIASSUNTO

Il lavoro di ricerca prende spunto dalle problematiche tassonomiche inerenti al genere *Thymus* correlate alla notevole variabilità dei tratti morfologici spesso non sufficientemente discriminanti.

Lo studio ha riguardato la caratterizzazione dei componenti chimici degli oli essenziali di differenti *taxa* del genere *Thymus*, quali validi marcatori chemotassonomici, per contribuire all'identificazione delle entità indagate.

La ricerca è stata finalizzata anche alla valutazione dell'attività biologica, *in vitro* e *in vivo*, degli oli essenziali di *Thymus* su germinazione, sopravvivenza e crescita di diverse specie infestanti, per un loro potenziale impiego come bio-erbicidi.

L'analisi dei componenti chimici degli oli essenziali è stata condotta utilizzando la gas cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC/FID, GC/MS), in differenti *taxa* del genere *Thymus*: *T. longicaulis* C. Presl subsp. *longicaulis*; *T. paronychioides* Čelak., *T. praecox* Opiz subsp. *parvulus* (Lojac.) Bartolucci, Peruzzi & N.G. Passal., *T. spinulosus* Ten., *T. richardii* Pers. subsp. *nitidus* (Guss.) Jalas, *T. striatus* Vahl subsp. *striatus*, *T. vulgaris* L. subsp. *vulgaris*, *Thymus*. sp.

Per il confronto in termini composizionali tra i *taxa*, a livello intra ed interspecifico, è stata applicata l'analisi cluster con il metodo agglomerativo UPGMA (Unweighted pair group method using arithmetic averages), basato su distanze Euclidee.

I saggi di fitotossicità sono stati realizzati, *in vitro* e *in vivo*, su differenti specie target (*Amaranthus blitum* L., *Amaranthus retroflexus* L., *Portulaca oleracea* s.l., *Avena fatua* L., *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv. e *Lepidium sativum* L.) impiegando oli essenziali di *Thymus* tal quali, nanoemulsionati con diverse sostanze naturali (es. gomma arabica e proteine del siero del latte) o microincapsulati in particelle di zeina.

L'effetto *in vitro* degli oli essenziali è stato stimato calcolando le percentuali di inibizione della germinazione (GI%) e di fitotossicità. L'azione erbicida, *in vivo*, è stata valutata adottando una scala di valori che commisura il grado di danneggiamento delle piante. La caratterizzazione chimica degli oli essenziali ha evidenziato una variabilità intra e interspecifica tra i *taxa* indagati e ha contribuito a consolidare e ampliare, per le entità distribuite in Sicilia, le relative conoscenze tassonomiche. I saggi di fitotossicità hanno evidenziato una significativa azione inibente degli oli essenziali di *T. longicaulis* subsp. *longicaulis* e *T. praecox* subsp. *parvulus*, *T. spinulosus*, *T. vulgaris* subsp. *vulgaris*. Essi, si configurano, quindi, potenzialmente interessanti per applicazioni in ambito agronomico.

PAROLE CHIAVE: *Thymus*, Lamiaceae, composizione oli essenziali, chemotassonomia, fitotossicità.

CAPITOLO 1

IL GENERE *THYMUS*

1. INTRODUZIONE

La regione mediterranea rappresenta uno dei più importanti centri di origine e diversificazione delle piante aromatiche e medicinali (Barbero & Maffei, 2016). Secondo quanto stimato da Ross & Sombbrero (1991) il 49% dei generi che includono specie aromatiche sono diffusi in aree caratterizzate da un clima di tipo mediterraneo.

Tra le piante aromatiche mediterranee, il genere *Thymus*, istituito da Linneo nel 1753 in *Species Plantarum* (Linnaeus, 1753), rappresenta uno tra i più importanti *taxa* della famiglia delle *Lamiaceae* Martinov per l'elevato numero di specie che include: circa 250 *taxa* (Morales, 2002).

Il genere *Thymus* è stato oggetto di studi classici da parte di numerosi Autori dopo Linneo, soprattutto a partire dal XIX secolo (Brotero, 1804; Hoffmannsegg & Link, 1809; Boissier, 1839-1845; Bentham, 1832-1836; Čelakovsky, 1882; 1883; Braun, 1888; 1889; 1891; 1912; Briquet, 1897; Velenovský, 1904; 1906; Pawlowski, 1966; 1967; 1968). Di particolare rilievo sono gli studi di Ronninger (1924; 1925; 1927; 1930; 1932; 1942; 1944), al quale si deve un erbario di grande pregio (attualmente custodito a Vienna), e di Jalas che ha trattato il genere *Thymus* in Flora Europaea (1972), Flora Iranica (1982a) e Flora of Turkey and East Aegean Islands (1982b). Numerosi altri Autori, anche in epoca più recente, hanno esaminato il genere (Aytas, 2003; Blanco *et al.*, 2007; De La Torre & Paya, 2001; Gomes Pinto *et al.*, 2006; Hügin & Schmidt, 2003; Kaya *et al.*, 2000; Marhold & Martonfi, 1998; Martonfi, 1997a; 1997b; Orellana *et al.*, 2005; Pavia & Salgueiro, 1994; Riera *et al.*, 2007; Satil *et al.*, 2005). Particolarmente significativi sono i contributi apportati dal botanico spagnolo Morales (1986a; 1986b; 1989; 1995; 1997; 2002), riguardo soprattutto le specie diffuse nella Penisola Iberica, e da Bartolucci e Bartolucci *et al.* (Bartolucci, 2010; Bartolucci *et al.*, 2013; Bartolucci & Peruzzi, 2014; Bartolucci & Domina, 2014; 2015; Bartolucci & Scharfetter, 2015; Bartolucci & Walter, 2015; Bartolucci & Mráz, 2016; Bartolucci, 2018), per quanto riguarda quelle distribuite in Italia.

Thymus costituisce uno dei generi più complessi della flora italiana ed europea (Morales, 1997; 2002; Bartolucci, 2010; Bartolucci *et al.*, 2013; Federici *et al.*, 2013; Bartolucci & Domina, 2014; 2015) e, sebbene sia stato ampiamente indagato, l'approccio sistematico è, tuttavia, piuttosto difficile e problematico, soprattutto in alcuni gruppi (sect. *Hyphodromi* e *Serpyllum*) (Morales, 2002). Le difficoltà di delimitazione di molte entità sono correlate all'elevato polimorfismo di alcuni caratteri morfologici, chimici, cariologici e sessuali. In quest'ultimo caso, si tratta di una forma di polimorfismo sessuale definita ginodioicia (Darwin, 1877; Thompson *et al.*, 1998; Thompson, 2002) per cui è possibile osservare, all'interno di popolazioni naturali, due tipi di individui: alcuni provvisti di fiori ermafroditi e altri con fiori femminili caratterizzati da calici e fiori più piccoli. I due tipi possono differire

fenotipicamente anche nel portamento, nel tipo di infiorescenza e nell'indumento dei fusti e delle foglie.

Un ulteriore elemento di difficoltà per la corretta delimitazione dei *taxa* è attribuibile al fenomeno dell'ibridazione, evento piuttosto frequente, soprattutto nell'ambito della sect. *Serpyllum*, che può verificarsi anche tra specie distanti tassonomicamente (Morales, 2002; Bartolucci, 2010). Solo nella Penisola Iberica, ad esempio, sono stati individuati più di sessanta diversi ibridi (Morales, 1995; 2002).

L'espressione di una così ampia variabilità ha generato, soprattutto in passato, una grande confusione nel quadro sistematico del genere, in conseguenza della descrizione di un elevato numero di *taxa* (oltre 1000), di errate attribuzioni e di molteplici sinonimi nomenclaturali (Morales, 2002; Bartolucci, 2010).

Per quanto riguarda i *taxa* presenti in Italia, un prezioso contributo è stato apportato da recenti lavori a carattere tassonomico (Bartolucci, 2010; Bartolucci *et al.*, 2013; Bartolucci & Domina 2014; 2015; Bartolucci & Peruzzi 2014; Bartolucci & Scharfetter 2015; Bartolucci & Walter 2015; Bartolucci & Mráz, 2016; Bartolucci, 2018), grazie ai quali è stata fatta maggiore chiarezza circa la posizione tassonomica delle diverse entità presenti e la relativa distribuzione sul territorio. Riguardo la Sicilia, gli studi di Bartolucci & Domina (2015), condotti principalmente su materiale d'erbario, sebbene abbiano contribuito alla conoscenza dei *taxa* del genere *Thymus* distribuiti nella regione [(*T. longicaulis* C. Presl, *T. paronychioides* Čelak., *T. praecox* Opiz subsp. *parvulus* (Lojac.) Bartolucci, Peruzzi & N.G. Passal., *T. spinulosus* Ten., *T. richardii* Pers. subsp. *nitidus* (Guss.) Jalas], invalidando molteplici sinonimi ed evidenziando le errate attribuzioni, lasciano aperte alcune questioni tassonomiche riguardanti *taxa* segnalati per il territorio siciliano ma non chiaramente identificati (es. *T. pedicellatus* Lojac. incluso nella variabilità di *T. spinulosus*).

Obiettivi e scopo dello studio

Il presente lavoro di ricerca prende spunto proprio dalle suddette problematiche tassonomiche, correlate alla notevole variabilità che caratterizza il genere sia a livello interspecifico sia intra-specifico e che rende complessa l'attribuzione specifica. In tal senso, si è tentato di apportare un contributo alla tassonomia classica attraverso un approccio interdisciplinare che ha visto, da una parte, l'analisi dei principali tratti morfologici di diversi *taxa* del genere *Thymus* (*T. longicaulis* subsp. *longicaulis*; *T. paronychioides*, *T. praecox* subsp. *parvulus*, *T. spinulosus*, *T. richardii* subsp. *nitidus*, *T. striatus* Vahl subsp. *striatus*, *T. vulgaris* L. subsp. *vulgaris*, *Thymus*. sp.), campionati in Sicilia, Calabria, Basilicata e Liguria e, dall'altra, la caratterizzazione quali-quantitativa degli oli essenziali da questi estratti.

Il principale scopo dell'attività di ricerca è stato, quindi, di fornire eventuali evidenze chimiche, a supporto delle osservazioni morfologiche, per differenziare le varie entità.

1.1 Inquadramento tassonomico

Thymus L. è uno dei più importanti generi della famiglia delle *Lamiaceae* Martinov, riferito alla subfamiglia *Nepetoideae* Kostel., tribù *Mentheae* Dumort. Le specie attribuite al genere, secondo il criterio tassonomico di Morales (2002) che ne minimizza la variabilità sono circa 215 (250 *taxa*), distribuite in Europa, Asia, Africa nord-occidentale (Marocco, Algeria, Tunisia e Libia) e sulle coste della Groenlandia. Popolazioni introdotte si sono spontaneizzate in Canada (*T. serpyllum* L. e *T. pulegioides* L.), Cile (*T. vulgaris* L.) e Nuova Zelanda (*T. pulegioides* e *T. vulgaris*). Il centro di diversità del genere, con circa 110 specie, è comunemente considerato il bacino del Mediterraneo e la porzione occidentale, in particolare, sembrerebbe corrispondere al suo centro d'origine (Morales, 1989; 1997; 2002).

Secondo la classificazione morfologica proposta da Jalas (1971) il genere è suddiviso nelle seguenti otto sezioni: *Micantes* Velen., *Mastichina* (Mill.) Benth., *Piperella* Willk., *Teucrioides* Jalas, *Pseudothymbra* Benth., *Thymus*, *Hypodromi* (A. Kern.) Halácsy e *Serpyllum* (Mill.) Benth.

Lo schema tassonomico riportato di seguito (Tab. 1) è tratto dal lavoro di Morales (2002).

Tabella 1. Sezioni e sottosezioni del genere *Thymus*.

I. Sect. MICANTES	VII. Sect. HYPHODROMI
	Subsect. Subbracteati
II. Sect. MASTICHINA	Subsect. Serpyllastrum
III. Sect. PIPERELLA	Subsect. Thymbropsis
IV. Sect. TEUCRIOIDES	VIII. Sect. SERPYLLUM
V. Sect. PSEUDOTHYMBRA	Subsect. Insulares
Subsect. Pseudothymbra	Subsect. Kotschyani
Subsect. Anomalae	Subsect. Pseudopiperellae
VI. Sect. THYMUS	Subsect. Isolepides
Subsect. Thymastra	Subsect. Alternantes
Subsect. Thymus	Subsect. Pseudomarginati
	Subsect. Serpyllum

Delle diverse sezioni sopra riportate, quattro (*Micantes*, *Mastichina*, *Piperella*, *Pseudothymbra*) sono endemiche della Penisola Iberica e Nord Africa (Morales, 1989; 1997), una (*Teucrioides*) è endemica della Penisola Balcanica (Grecia e Albania), la sezione *Thymus* è rappresentata da specie distribuite nella Regione Mediterranea Occidentale (nord Italia, sud della Francia, Penisola Iberica e Nord Africa), mentre la sezione *Hyphodromi* include specie (circa 60) diffuse sia nel bacino del Mediterraneo sia al di fuori di tale area. Infine, la sezione *Serpyllum*, che sembra essere la più antica del genere e con la maggiore variabilità a livello

cromosomico, comprende circa 120 specie, alcune delle quali diffuse nel bacino del Mediterraneo e altre (subsect. *Alternantes*, *Kotschyani* e *Serpyllum*) in aree extra-mediterranee (Yemen, Etiopia e Russia) (Morales, 1997; 2002).

Per quanto riguarda il territorio italiano, secondo quanto riportato da Bartolucci in Flora d'Italia (2018), sono rappresentate 3 delle sezioni sopraelencate (*Hyphodromi*, *Serpyllum* e *Thymus*), includenti complessivamente 18 *taxa* (tra specie e subspecie).

1.2 Caratteristiche generali

Il genere *Thymus* comprende piante perenni, di piccole dimensioni (raramente superano i 50 cm di altezza) con portamento cespitoso, sub-eretto o prostrato, in quest'ultimo caso caratterizzate da fusti striscianti più o meno lunghi e legnosi alla base, terminanti con un'infiorescenza (pseudorepenti) o con un rametto sterile di sole foglie (repenti). I fusti fioriferi sono di forma quadrangolare o cilindrica e ricoperti, più o meno densamente, da peli di lunghezza variabile che nelle diverse specie possono assumere differente disposizione e distribuzione. Si parla di fusti olotrichi se la pelosità interessa tutta la superficie, anfitrichi se ricopre i due lati opposti in maniera alternata agli internodi, goniotrichi nel caso in cui i peli siano disposti solo agli angoli (sect. *Alternantes*), mixotrichi se la pelosità è diversa tra l'internodio superiore e quello inferiore. Le foglie dei fusti fioriferi (medie e superiori) possono essere tutte della stessa dimensione (omofillia) o differenti (eterofillia) per cui le foglie più vicine all'infiorescenza sono più grandi rispetto a quelle della base.

Le foglie sono semplici, piane o con margine revoluto, di forma ovata, spatolata, ellittica, lanceolata o lineare, hanno una consistenza più o meno coriacea, una superficie glabra o rivestita, più o meno densamente, da tricomi (peli) con funzione protettiva (peli di rivestimento) e/o secretoria (peli ghiandolari). I peli ghiandolari, contenenti oli essenziali, sono diffusi anche negli organi florali, sono generalmente sessili, di forma sferoidale e colorazione variabile dal rosso rubino al giallo chiaro. Il margine della foglia può essere completamente ciliato o presentare ciglia solo alla base.

Le nervature (centrale e laterali) costituiscono un carattere diagnostico e, a seconda dello spessore, possono essere attribuite a tre tipologie principali:

- camptodroma, se le nervature laterali, parallele o curve, sono da poco evidenti a evanescenti in prossimità del margine fogliare;
- pseudo-marginata, se le nervature laterali sono evidenti, curve, e non raggiungenti il margine della foglia;
- marginata, se le nervature laterali sono spesse e anastomosate, formanti un margine ben evidente.

L'infiorescenza è costituita da fascetti sovrapposti di fiori riuniti in verticillastri spiciformi o globoso/capituliformi, in relazione alla lunghezza degli internodi. L'infiorescenza può essere anche "interrotta" se almeno i primi verticilli sono distanziati l'uno dall'altro. Ai fiori sono generalmente associate piccole foglie (brattee), spesso colorate, da lanceolate a ovate, simili o dissimili (in *Thymus* sect. *Hyphodromi*) alle foglie cauline. I fiori sono composti da 5 petali fusi formanti una corolla tipicamente bilabiata, più o meno tubulare, con labbro superiore bilobo e quello inferiore trilobo. Generalmente, sono provvisti di peli a livello della fauce e di

pedicelli a cui è associata una piccola bratteola; hanno una colorazione variabile dal bianco al viola-porpora e sono racchiusi all'interno di un calice di forma campanulata o cilindrica, costituito da cinque sepali concresciuti a formare un tubo bilabiato (gamosepalo), lungo 2.5-8 mm e provvisto di cinque denti ciliati ai margini, due più lunghi e ricurvi verso l'alto, nel labbro inferiore, e tre triangolari più brevi, nel labbro superiore, talvolta ridotti a uno come in *T. caespititius* Brot., specie endemica del Nord Ovest della Penisola Iberica.

Il gineceo è caratterizzato da un ovario supero bicarpellare e tetraloculare, sormontato da uno stilo ginobasico con stimma bifido. L'androceo consta di quattro stami, talvolta ridotti a due o assenti nel caso si tratti di individui femminili (ginodioica), inseriti a metà del tubo corollino e più o meno sporgenti dalla corolla.

I frutti sono nucule di piccole dimensioni e di forma ovoidale, generalmente quattro per ciascun fiore (tetrachenio), con una colorazione marrone più o meno scura. Le nucule rimangono all'interno del calice fino a maturità, ovvero fin quando quest'ultimo viene staccato e trasportato lontano dalla pianta madre per opera del vento (disseminazione anemocora) e dell'acqua piovana.

Il momento della fioritura è variabile (da aprile ad agosto) ma, in gran parte delle specie, coincide con il periodo primaverile. Nell'area del Mediterraneo non mancano, tuttavia, specie a fioritura autunnale (*T. vulgaris* L. subsp. *aestivus* (Willk.) O. Bolos & A. Bolos, *T. piperella* L.) o invernale (*T. hyemalis* Lange) (Morales, 2002). L'impollinazione è di tipo entomogama, mediata da insetti quali imenotteri, ditteri (es. *Bombyliidae*), lepidotteri (appartenenti soprattutto alle famiglie dei *Lycaenidae*, *Nymphalidae*, *Sphingidae* e *Noctuidae*) (Morales, 1986).

La maggior parte delle specie sono piante pioniere ad accrescimento rapido, tipicamente eliofile, capaci di insediarsi in ambienti aspri e su substrati con diversa tessitura purché caratterizzati da un buon drenaggio. Possono crescere su diverse tipologie di terreni (argillosi, calcarei, sabbiosi, silicei) ma prediligono suoli edaficamente aridi quali rocce affioranti, litosuoli, pendii rocciosi, prati aridi e pascoli montani.

In generale, si tratta di piante diffuse dalla fascia costiera (*T. hyemalis*, *T. vulgaris*, *T. capitellatus* Hoffmanns. & Link, *T. camphoratus* Hoffmanns. & Link, *T. carnosus* Boiss.) a quella montana, fino a 3.400 metri di altitudine (*T. serpyllodes* Bory) (Morales, 1986). Le tipiche aree di crescita sono caratterizzate da un macroclima di tipo mediterraneo contraddistinto da inverni brevi e piovosi, con temperature miti, ed estati lunghe e siccitose.

2. MATERIALI E METODI

2.1 *Taxa* allo studio

Per studiare la variabilità intra- e inter-specifica all'interno del genere *Thymus* sono state campionate ed esaminate differenti popolazioni naturali, provenienti da diverse località della Sicilia, Calabria, Basilicata e Liguria, appartenenti ai seguenti *taxa*: *T. longicaulis* subsp. *longicaulis*, *T. paronychioides*, *T. praecox* subsp. *parvulus*, *T. spinulosus*, *T. richardii* subsp. *nitidus*, *T. striatus* subsp. *striatus* e *T. vulgaris* subsp. *vulgaris*, *Thymus* sp. L'indagine ha riguardato il 38% delle entità di *Thymus* presenti in Italia (Bartolucci, 2018) e l'attenzione è stata principalmente focalizzata sui *taxa* presenti in Sicilia e Calabria.

Per il raggiungimento del suddetto obiettivo sono state condotte preliminari osservazioni in campo, finalizzate a valutare la distribuzione e la consistenza delle popolazioni, a seguito delle quali è stata avviata una considerevole attività di campionamento realizzata durante la stagione di fioritura delle piante (tra maggio e luglio), nel biennio 2016-2017.

Per ciascun *taxon* sono state caratterizzate le seguenti accessioni (Fig. 1 e Tab.2):

- 4 di *T. longicaulis* subsp. *longicaulis*, 5 di *T. paronychioides*; 2 di *T. praecox* subsp. *parvulus*, 8 di *T. spinulosus*, 1 di *T. richardii* subsp. *nitidus*, 1 di *Thymus* sp., campionate in diversi distretti floristici del dominio siculo (Drepano-Panormitano, Egadense, Agrigentino, Madonita, Nebrodense, Peloritano, Ibleo) (Brullo *et al.*, 1995);
- 7 di *T. longicaulis* subsp. *longicaulis* e 2 di *T. spinulosus*, campionate in Calabria (nelle province di Reggio Calabria, Vibo Valentia e Cosenza);
- 1 di *T. striatus* subsp. *striatus* e 1 di *T. vulgaris* subsp. *vulgaris*, campionate in Basilicata (PZ) e in Liguria (SV), rispettivamente.

Oltre ai suddetti campioni, provenienti da popolazioni selvatiche, sono state valutate tre ulteriori accessioni, due di *T. spinulosus* (raccolte 2016 e 2017) e una di *T. richardii* subsp. *nitidus*, derivanti da piante coltivate in vivaio. Queste, sono state propagate da semi collezionati da popolazioni naturali (Marettimo-Isole Egadi e Serre Quacella-Madonie).



Figura 1. Siti di raccolta delle varie accessioni di *Thymus*.

Tabella 2. *Taxa* e accessioni del genere *Thymus* investigati. Per ciascun *taxon* sono riportate: data di raccolta, località e relativa provincia, area geografica, altitudine (m s. l. m.), sigla identificativa, coordinate geografiche del sito di raccolta.

Campionamenti 2016-2017								
Taxa	Data di raccolta	Località	Prov.	Area geografica	Altitudine (m s.l.m.)	Sigla accessione	Coordinate geografiche (WGS84)	
							N	E
<i>Thymus longicaulis</i> C. Presl subsp. <i>longicaulis</i>	10/06/2016	Monte Trefinaite	ME	Peloritani	1237	TL-3-FIN	37°58'18.6"	15°0'739.5"
<i>Thymus longicaulis</i> C. Presl subsp. <i>longicaulis</i>	11/05/2017	Pizzo Mualio	ME	Peloritani	1047	TL-MUAL	38°02'13.1"	15°1'745.5"
<i>Thymus longicaulis</i> C. Presl subsp. <i>longicaulis</i>	10/06/2016	Pizzo Pinto	ME	Peloritani	1211-1303	TL-PINT	37°56'49.0"	15°1'102.3"
	24/05/2017							
<i>Thymus longicaulis</i> C. Presl subsp. <i>longicaulis</i>	04/06/2016	Lago Lacina	VV	Serre Calabre	1067-1120	TL-LL	38°35'57"	16°24'20"
<i>Thymus longicaulis</i> C. Presl subsp. <i>longicaulis</i>	02/06/2016	Ponte Gioacchino	VV	Serre Calabre	971	TL-PG	38°28'59.0"	16°1'703.0"
<i>Thymus longicaulis</i> C. Presl subsp. <i>longicaulis</i>	26/05/2017	Cassari (Allaro)	VV	Serre Calabre	770	TL-ALLA	38°27'50.09"	16°18'43.08"
<i>Thymus longicaulis</i> C. Presl subsp. <i>longicaulis</i>	26/05/2017	Cassari	VV	Serre Calabre	1189	TL-CASS	38°25'58.0"	16°18'42.6"
<i>Thymus longicaulis</i> C. Presl subsp. <i>longicaulis</i>	06/06/2017	Villaggio Zomaro	RC	Aspromonte	968-979	TL-ZOMA	38°17'58.7"	16°06'45.4"
<i>Thymus longicaulis</i> C. Presl subsp. <i>longicaulis</i>	07/06/2017	Gambarie	RC	Aspromonte	1423	TL-GAMB	38°10'36.7"	15°5'050.5"
<i>Thymus longicaulis</i> C. Presl subsp. <i>longicaulis</i>	25/06/2017	SP 256- Monte Scurò (Fago del soldato)	CS	Sila	1597	TL-FAGO	39°20'22.0"	16°23'54.2"
<i>Thymus paronychioides</i> Čelak.	18/05/2016	Portella del Vento (Rocca Busambra)	PA	Sicani	1106	TP-VENT	37°50'38.2"	13°2'622.0"
	16/05/2017							
<i>Thymus paronychioides</i> Čelak.	18/05/2016	Piano della Tramontana (Rocca Busambra)	PA	Sicani	1176	TP-TRAM	37°50'53.0"	13°2'544.1"
	16/05/2017							
<i>Thymus paronychioides</i> Čelak.	09/06/2017	Monte Cammarata	AG	Sicani	1564	TP-CAMM	37°37'07.75"	13°3'628.1"
						TP-CAMM-INF		
<i>T. praecox</i> Opiz subsp. <i>parvulus</i> (Lojac.) Bartolucci, Peruzzi & N.G. Passal.	26/05/2016	Monte Scuderi	ME	Peloritani	1039-1143	T-PRAEX	38°04'00.0"	15°24'15.0"
	25/05/2017							
<i>Thymus spinulosus</i> Ten.	27/05/2017	Cozzo S. Elia	CS	Pollino	547	TS-ELIA	39°48'01.9"	16°16'24.7"
<i>Thymus spinulosus</i> Ten.	27/05/2017	Timpone delle Fave	CS	Pollino	700	TS-EL-INF	39°49'10.50"	16°17'21.10"
						TS-FAVE		
<i>Thymus spinulosus</i> Ten.	17/06/2016	Pizzo Leo	ME	Nebrodi	1234	TS-FV-INF	37°57'03.1"	14°5'749.0"
						TS-LEO		
<i>Thymus spinulosus</i> Ten.	03/06/2017	Monte Lauro	SR/RG	Iblei	794	TS-LAUR	37°06'50.79"	14°49'12.18"
<i>Thymus spinulosus</i> Ten.	09/06/2017	Monte Cammarata	AG	Sicani	1192	TS-CAMM	37°37'17.5"	13°3'707.1"
<i>Thymus spinulosus</i> Ten.	22/06/2016	Vivaio Pianta Faro	CT	Pendici Monte Etna	103	TS-FARO	37°41'47.76"	15°11'25.37"
	10/06/2017							
<i>Thymus spinulosus</i> Ten.	15/06/2017	Pizzo S. Nicola	ME	Nebrodi	1204	TS-SNIC	37°58'19.2"	14°41'36.6"
	17/06/2016					TS-SN-INF		
<i>Thymus spinulosus</i> Ten.	17/06/2016	Monte Castellazzo	ME	Nebrodi	1262	TS-CAST	37°58'57.3"	14°58'57.4"
	15/06/2017					TS-CA-INF		
<i>Thymus spinulosus</i> Ten.	21/06/2017	Monte delle Rose	AG/PA	Sicani	1430	TS-ROSE	37°39'10.21"	13°25'03.77"
						TS-RO-INF		
<i>Thymus spinulosus</i> Ten.	28/06/2017	Serre Quacella	PA	Madonie	1385	TS-QUAC	37°51'43.2"	14°00'54.5"
						TS-QINF		
<i>Thymus richardii</i> Pers. subsp. <i>nitidus</i> (Guss.) Jalas	08/07/2017	Marettimo	TP	Isole Egadi	360-446	TR-MARE	37°57'41.49"	12°03'56.90"
							37°59'07.30"	12°03'22.77"
<i>Thymus richardii</i> Pers. subsp. <i>nitidus</i> (Guss.) Jalas	10/06/2017	Vivaio Pianta Faro	CT	Pendici Monte Etna	103	TR-FARO	37°41'47.76"	15°11'25.37"
<i>Thymus</i> sp.	09/06/2017	Monte Cammarata	AG	Sicani	1450	TSP-3	37°37'18.0"	13°3'637.2"
<i>Thymus striatus</i> Vahl subsp. <i>striatus</i>	24/06/2017	Piano Ruggio	PZ	Pollino	1500	TST-RUG	39°54'55.9"	16°0'750.0"
<i>Thymus vulgaris</i> L. subsp. <i>vulgaris</i>	20/05/2017	Monte Caprazoppa	SV	Prealpi Liguri	200	TV-LIGU	44°09'44.3"	8°19'04.6"

Di ciascuna accessione un *voucher* è stato depositato presso l'erbario (CAT) della Sezione di Biologia vegetale del Dipartimento di Scienze Biologiche, Geologiche e Ambientali, dell'Università di Catania.

Alcuni dei *taxa* studiati sono stati inoltre propagati agamicamente (per talea) e coltivati presso l'azienda vivaistica Piante Faro.

2.2 Analisi morfologica

La caratterizzazione morfologica delle accessioni del genere *Thymus* collezionate è stata effettuata attraverso l'acquisizione di immagini digitali di differenti parti epigee della pianta (foglie, brattee e calici), ricorrendo a uno stereomicroscopio binoculare (Olympus SZX12, obiettivo DF PLAPO 1x PF) munito di fotocamera digitale (Olympus DP 70).

A partire dalle immagini digitali, sono stati acquisiti i parametri dimensionali (lunghezza e larghezza) di foglie, brattee e calici (tubo e denti inferiori), con l'ausilio del programma Digimizer image analysis (© MedCalc Software bvba, Belgium). Per ciascuna accessione, inoltre, sono stati rilevati il tipo di indumento dei fusti fioriferi (primo internodio sotto l'infiorescenza), il colore e la densità delle ghiandole.

Le misurazioni sono state eseguite su materiale essiccato (3 voucher per accessione) e i dati sono stati espressi come valore medio di 3 repliche per organo. Le brattee misurate corrispondono a quelle del secondo e terzo verticillo florale, partendo dalla base dell'infiorescenza; le foglie dei fusti fioriferi coincidono con quelle del tratto compreso tra la metà del fusto e la base dell'infiorescenza.

2.3 Identificazione dei *taxa*

L'identificazione dei diversi *taxa* studiati è stata effettuata sulla base delle descrizioni e chiavi analitiche proposte da Bartolucci & Domina e da Bartolucci (2014; 2015; 2018) e con l'ausilio di recenti lavori di revisione riguardanti il genere *Thymus* (Bartolucci, 2010; Bartolucci *et al.*, 2013; Bartolucci & Peruzzi, 2014; Bartolucci & Domina, 2014; 2015; Bartolucci & Scharfetter, 2015; Bartolucci & Walter, 2015; Bartolucci & Mráz, 2016; Bartolucci, 2018). Per ognuno dei *taxa* studiati è stata redatta una scheda in cui sono stati riportati: sezione e sottosezione, sinonimi nomenclaturali, ambiente preferenziale, elenco delle stazioni di raccolta, documentazione fotografica.

3. SCHEDE BOTANICHE

Thymus longicaulis* C. Presl subsp. *longicaulis

sect. *Serpyllum* (Mill.) Benth.

subsect. *Pseudomarginati* (Heinr. Braun ex Borbás) Jalas.

[Syn: *Thymus striatus* var. *longicaulis* (C. Presl) Nyman (1881); *Thymus serpyllum* var. *longicaulis* (C. Presl) Bég (1903); *Thymus elongatus* Presl (1817); *Thymus glabratus* Hoff. et Link.; *Thymus serpyllum* a *vulgaris* β *dalmaticus* Rchb.f. (1858); *Thymus serpyllum* subsp. *dalmaticus* (Rchb.f.) Nyman (1881); *Thymus dalmaticus* (Rchb.) Freyn (1878); *Thymus longicaulis* var. *dalmaticus* (Rchb.f.) Ronniger (1924); *Thymus brevicalyx* Strobl (1883); *Thymus longicaulis* var. *brevicalyx* (Strobl.) Ronniger (1924); *Thymus adriaticus* Velen.; *Thymus moesiacus* Velen.].

Specie caratterizzata da elevato polimorfismo dei caratteri morfologici. Il portamento delle piante è tipicamente repente (raramente pseudorepente) con fusti fioriferi anfitrichi. Le foglie, di forma ellittico-lanceolata, glabre, sono provviste di ciglia alla base e densamente coperte da ghiandole sessili di color rubino o ambra, presenti anche a livello del calice. La nervatura centrale della foglia è evidente, quelle laterali evanescenti. Le infiorescenze capitate o allungate, sono costituite da fiori di colore rosa-violaceo e provviste di brattee di forma simile alle foglie vegetative (Tab.3, Figg. 2, 3, 4).

Periodo di fioritura: da maggio a giugno-luglio.

Distribuzione: sud-est del Mediterraneo. In Italia è presente solo la subspecie *longicaulis*. In Sicilia la specie non è comune, segnalata per i distretti Peloritano, Nebrodense e Agrigentino.

Habitat preferenziale: margini di boschi, radure, pascoli. La specie generalmente non è caratterizzata da particolari esigenze in termini di tipologia di suolo. È distribuita a quote altitudinali comprese tra 0–1900 m s.l.m. (Bartolucci, 2018). In Sicilia e Calabria la specie è frequente in pascoli montani, a quote al di sopra dei 700 m s.l.m.

Siti di raccolta: in Sicilia la specie è stata campionata nel settore nord-orientale (distretto Peloritano), a quote altitudinali comprese tra 770 e 1597 m s.l.m., presso il Monte Trefinaite (37°58'18.6"N, 15°07'39.5"E), Pizzo Pinto (37°56'49.0"N, 15°11'02.3"E) e nei pressi di Pizzo Mualio (38°02'13.1"N, 15°17'45.5"E). In Calabria i campionamenti sono stati effettuati in Aspromonte, Sila e nell'area delle Serre Calabre in aree circostanti le località: Gambarie

(38°10'36.7"N, 15°50'50.5"E); Villaggio Zomaro (38°17'58.7"N, 16°06'45.4"E); SP 256 per Monte Scuro-Fago del Soldato (39°20'22.0"N, 16°23'54.2"E); Lago Lacina (38°35'57"N, 16°24'20"E), Ponte Gioacchino (38°28'59.0"N, 16°17'03.0"E) e in due diversi siti nei pressi di Cassari (38°25'58.0"N, 16°18'42.6"E; 38°27'50.09"N 16°18'43.08"E).

Tabella 3. Dati morfometrici relativi alle diverse accessioni di *T. longicaulis* subsp. *longicaulis*. Le misure sono espresse come valore medio (mm). Per ciascuna accessione, si riportano il tipo di indumento dei fusti fioriferi (primo internodio sotto l’infiorescenza), la densità e il colore delle ghiandole.

Thymus longicaulis subsp. longicaulis																			
LAGO LACINA		PONTE GIOACCHINO		VILLAGGIO ZOMARO		GAMBARIE		MONTE SCURO		PIZZO MUALIO		MONTE TREFINAITE		PIZZO PINTO		CASSARI (ALLARO)		CASSARI	
FOGLIE																			
Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza
9,39±0,24	2,24±0,1	8,77±0,48	2,42±0,1	6,92±0,34	2,32±0,1	9,31±1,06	2,99±0,3	9,801±0,42	3,01±0,2	10,46±0,49	3,06±0,1	11,49±0,09	3,73±0,1	9,37±0,37	2,45±0,1	12,87±0,77	3,93±0,5	9,98±0,66	2,51±0,1
BRATTEE																			
Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza
3,03±0,19	1,49±0,1	3,44±0,14	1,34±0,04	4,02±0,02	2,07±0,05	4,30±0,10	2,05±0,1	6,99±0,56	3,07±0,1	5,26±0,34	1,71±0,1	5,32±0,10	2,13±0,1	3,83±0,34	1,33±0,2	3,78±0,35	1,22±0,1	3,51±0,25	1,27±0,1
TUBI CALICINI																			
Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza
0,97±0,07	0,92±0,05	1,17±0,03	1,07±0,03	1,33±0,09	1,31±0,1	0,85±0,12	1,28±0,1	1,44±0,17	1,53±0,2	0,82±0,05	1,12±0,1	1,46±0,32	1,43±0,1	1,10±0,04	1,24±0,1	1,44±0,06	1,55±0,05	1,14±0,09	1,37±0,02
DENTI INFERIORI DEL CALICE																			
Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza
1,62±0,12	1,72±0,08	1,73±0,12	1,57±0,12	2,37±0,04	2,17±0,06	2,06±0,02	1,80±0,07	1,91±0,04	1,94±0,05										
LUNGHEZZA TOT CALICE																			
Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza
2,59±0,17	2,90±0,06	3,06±0,12	2,42±0,17	3,81±0,19	2,99±0,10	3,52±0,30	2,89±0,05	3,35±0,06	3,14±0,09										
FUSTO FIORIFERO																			
Anfritrico																			
DENSITA' E COLORE GHIANDOLE																			
Abbondanti, di colore rosso/ambrato																			



Figura 2. Habitat di crescita di *T. longicaulis* subsp. *longicaulis*, sito di raccolta nei pressi di Monte Scuro (Fago del Soldato, Sila).



Figura 3. *T. longicaulis* subsp. *longicaulis* in fioritura e *Brenthis daphne* (Lepidoptera, Nymphalidae).

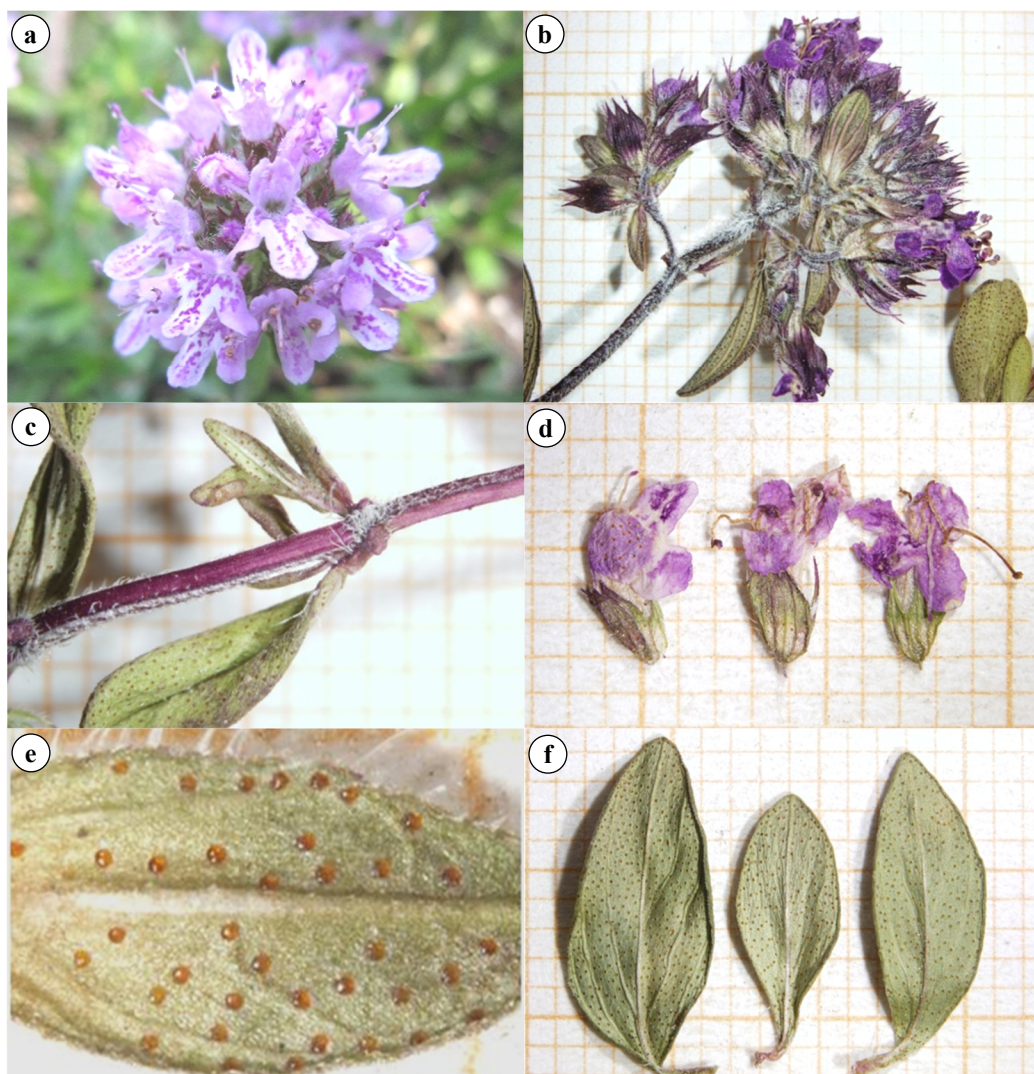


Figura 4. *T. longicaulis* subsp. *longicaulis*: a) infiorescenza, b) infiorescenza essiccata, c) pelosità fusto fiorifero, d) fiori, e) ghiandole sferoidali su brattea, f) foglie cauline.

***Thymus paronychioides* Čelak.**

sect. *Hyphodromi* (A. Kern.) Halácsy

subsect. *Serpyllastrum* Villar.

[Syn: *Thymus gussonei* Lojac. (1907), nome invalido; *Thymus gussonei* var. *diminutus* Lojac. (1907), nome invalido; *Thymus acicularis* Auct. p.p. non Waldest. & Kit.: Guss. (1828); *Thymus siculus* Lojac., nom. nud., in schedis; *Thymus spinulosus* auct. p.p. non Ten.: Grande (1924); Jolas in Tutin *et al.* (1972); Pignatti (1982); Greuter *et al.* (1986); *Thymus striatus* auct. p.p. non Vahl: Nyman (1881); Parlato (1884); Arcang. (1894); Fiori (1926); Zang. (1976); Conti *et al.* (2005); Giardina *et al.* (2007); *Thymus zygis* Auct. p.p. non L.: Guss. (1844); Arcang. (1882); Tornab. (1887)].

Pianta erbacea perenne con fusti tipicamente striscianti. I fusti fioriferi, olotrichi, sono molto brevi, portano un'infiorescenza capitata con brattee di forma angoloso-ovata (trullata), e fiori con corolla rosea raramente bianca. Foglie subsessili di forma da ellittico-lanceolata a subspatolata, provviste di peli su entrambe le facce, generalmente più abbondanti sulla pagina inferiore che sulla superiore. Il margine delle foglie è ciliato alla base e le nervature sono piuttosto evidenti (pseudomarginate). Sui diversi organi della pianta (foglie, brattee, fiori, calice) sono presenti rare ghiandole sessili traslucide di colore giallo pallido (Tab. 4, Figg. 5, 6, 7).

Periodo di fioritura: da maggio a giugno.

Distribuzione: specie rara, endemica dell'area a nord-est della Sicilia occidentale. Segnalata per i distretti Deprano-Panormitano, Madonita (?) e Nebrodense (?).

Note: le ricerche in campo hanno portato alla segnalazione della specie per Monte Cammarata.

Habitat preferenziale: pendii rocciosi e pascoli aridi, prevalentemente su suoli calcarei a una altitudine compresa tra 600–1.800 m s.l.m.

Siti di raccolta: distretto Drepano-Panormitano, presso Portella del Vento (37°50'38.2"N, 13°26'22.0"E) e Piano della Tramontana (37°50'53.0"N, 13°25'44.1"E), localizzate rispettivamente a 1.106 m e 1.176 m s.l.m., nella porzione orientale del massiccio di Rocca Busambra, caratterizzato da un substrato di natura prevalentemente calcareo-dolomitica.

Un'altra accessione di *T. paronychioides* è stata campionata presso la cima di Monte Cammarata (37°37'07.75"N, 13°36'28.1"E), a una quota di 1.564 m s.l.m.

Tabella 4. Dati morfometrici relativi alle diverse accessioni di *T. paronychioides*. Le misure sono espresse come valore medio (mm). Per ciascuna accessione, si riportano il tipo di indumento dei fusti fioriferi (primo internodio sotto l'infiorescenza), la densità e il colore delle ghiandole.

Thymus paronychioides					
P.LLA DEL VENTO		PIANO DELLA TRAMONTANA		M.TE CAMMARATA	
FOGLIE					
Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza
7,10±0,36	2,15±0,1	6,20±0,23	1,54±0,2	6,49±0,37	2,36±0,1
BRATTEE					
Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza
4,90±0,24	2,27±0,05	4,87±0,48	2,76±0,2	4,76±0,29	2,32±0,1
TUBI CALICINI					
Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza
1,87±0,06	1,4±0,1	1,78±0,16	1,32±0,04	1,94±0,03	1,71±0,1
DENTI INFERIORI DEL CALICE					
Lunghezza		Lunghezza		Lunghezza	
2,64±0,11		2,91±0,16		2,79±0,08	
LUNGHEZZA TOT CALICE					
4,51±0,15		4,69±0,04		4,70±0,11	
FUSTO FIORIFERO					
Olotrico					
DENSITA' E COLORE GHIANDOLE					
Rare. di colore giallo pallido					



Figura 5. Habitat di crescita di *T. paronychioides* in località Portella del Vento (Rocca Busambra, Monti Sicani).



Figura 6. *T. paronychioides* in fioritura.

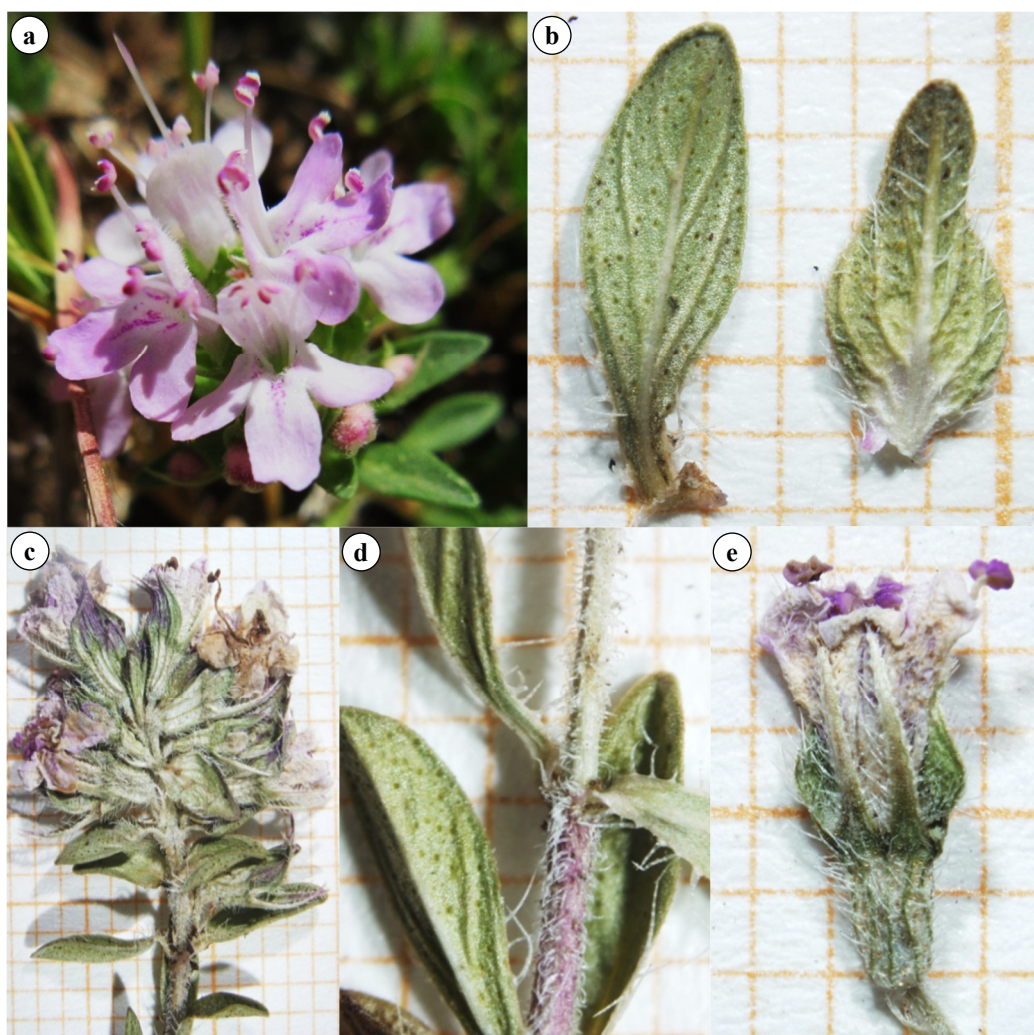


Figura 7. *T. paronychioides*: a) infiorescenza, b) foglia caulina (a sinistra) e brattea (a destra), c) infiorescenza essiccata, d) pelosità fusto fiorifero; e) fiore.

***Thymus praecox* Opiz subsp. *parvulus* (Lojac.) Bartolucci, Peruzzi & N.G. Passal.**

sect. *Serpyllum* (Mill.) Benth.

subsect. *Pseudomarginati* (Heinr. Braun ex Borbás) Jalas.

[Syn: *Thymus parvulus* Lojac. (1907); *Thymus serpyllum* auct. p.p. non L.: Guss. (1828); *Thymus praecox* auct. non Opiz: Giardina *et al.* (2007); *Thymus pulegioides* auct. Fl. Sicul. p.p.].

Pianta repente con fusti fioriferi eterofilli, olotrichi, con pelosità più evidente su due facce (le altre 2 con rari peli). Le foglie, di forma lanceolato-spatolata e prive di peli, sono punteggiate da ghiandole sessili di colore giallo. Le nervature laterali della foglia sono pronunciate ma non raggiungono il margine della foglia (pseudomarginate). Infiorescenza ± capitata con brattee da verdastre a rossastre, di forma simile alle foglie cauline. Il calice, di forma cilindrica e ± peloso, ha una colorazione verdastra soffusa di rosso ed è ricco di ghiandole di colore giallo intenso. Fiori con corolla roseo-porporina (Tab. 5, Figg. 8, 9, 10).

Periodo di fioritura: da maggio a luglio.

Distribuzione: specie rara, endemica della Sicilia nord orientale. Segnalata per i Nebrodi e i Peloritani.

Habitat preferenziale: pascoli montani aridi e pendii rocciosi, su suolo calcareo, a un'altitudine tra 800–1500 m s.l.m.

Siti di raccolta: il campione analizzato è stato raccolto a Monte Scuderi (38°04'00.0"N, 15°24'15.0"E) (Peloritani), *locus classicus* del *taxon*, a una quota compresa tra 1039 e 1143 m s.l.m.

Tabella 5. Dati morfometrici relativi all'accessione *T. praecox* subsp. *parvulus*. Le misure sono espresse come valore medio (mm). Si riportano il tipo di indumento dei fusti fioriferi (primo internodio sotto l'infiorescenza), la densità e il colore delle ghiandole.

<i>Thymus praecox</i> subsp. <i>parvulus</i>	
MONTE SCUDERI	
FOGLIE	
Lunghezza	Larghezza
9,39±0,05	3,26±0,1
BRATTEE	
Lunghezza	Larghezza
4,25±0,16	1,83±0,1
TUBI CALICINI	
Lunghezza	Larghezza
1,65±0,06	1,37±0,04
DENTI INFERIORI DEL CALICE	
Lunghezza	
2,27±0,08	
LUNGHEZZA TOT CALICE	
3,92±0,94	
FUSTO FIORIFERO	
Olotrico, quasi anfitrico nell'internodio sotto l'infiorescenza	
DENSITA' E COLORE GHIANDOLE	
Abbondanti, di colore giallo chiaro	



Figura 8. Habitat di crescita di *T. praecox* subsp. *parvulus* in località Monte Scuderi (Monti Peloritani).



Figura 9. *T. praecox* subsp. *parvulus* in fioritura.



Figura 10. *T. praecox* subsp. *parvulus*: a) infiorescenze, b) infiorescenza essiccata, c) foglie cauline, d) brattee, e) fiori, f) foglia caulina.

***Thymus richardii* Pers. subsp. *nitidus* (Guss.) Jalas**

sect. *Serpyllum* (Mill.) Benth.

subsect. *Insulares* Jalas.

[Syn: *Thymus nitidus* Guss. (1844); *Thymus serpyllum* var. *nitidus* (Guss.) Bég. (1903).

Thymus lucidus Guss. (1834)].

Pianta sub-eretta con fusti legnosi alla base, ricoperti da peli su tutte e quattro le facce (olotrichi), la pelosità si evidenzia maggiormente su due di queste. Le foglie, coriacee e glabre, sono di forma ovata con picciolo ben evidente e prive di ciglia. Le nervature laterali sono poco evidenti. L'infiorescenza può essere capitata o allungata con fiori caratterizzati da una corolla di colore roseo-purpureo (Tab. 6, Figg. 11, 12).

Periodo di fioritura: da maggio a giugno.

Distribuzione: specie rara, endemica della Sicilia occidentale (distretto Egadense), conosciuta solo per l'isola di Marettimo.

Habitat preferenziale: rupi calcaree a un'altitudine tra 0–600 m s.l.m.

Siti di raccolta: il campionamento è stato effettuato nelle località Pizzo Telegrafo (Semaforo) (37°57'41.49" N, 12°03'56.90"E) e Pizzo Madonnuzza (37°59'07.30"N, 12°03'22.77"E), a una quota compresa tra 360 e 446 m s.l.m. L'accessione proveniente da piante coltivate in vivaio è stata campionata nell'azienda Pianta Faro (37°41'47.76"N, 15°11'25.37"E), a quota 103 m s.l.m.

Tabella 6. Dati morfometrici relativi alle diverse accessioni di *T. richardii* subsp. *nitidus*. Le misure sono espresse come valore medio (mm). Per ciascuna accessione, si riportano il tipo di indumento dei fusti fioriferi (primo internodio sotto l'infiorescenza), la densità e il colore delle ghiandole.

Thymus richardii subsp. nitidus			
MARETTIMO		VIVAI FARO	
FOGLIE			
Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza
8,15±0,34	3,61±0,1	8,56±0,14	3,87±0,1
BRATTEE			
Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza
5,26±0,13	2,09±0,1	5,44±0,12	2,04±0,2
TUBI CALICINI			
Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza
2,24±0,09	1,21±0,1	2,29±0,09	1,55±0,05
DENTI INFERIORI DEL CALICE			
Lunghezza		Lunghezza	
2,40±0,03		2,71±0,10	
LUNGHEZZA TOT CALICE			
4,64±0,09		5,00±0,18	
FUSTO FIORIFERO			
Olotrico, pelosità più evidente su due facce			
DENSITA' E COLORE GHIANDOLE			
Rare, di colore giallo chiaro			



Figura 11. Rupi dell'isola di Marettimo (Isole Egadi), habitat di crescita di *T. richardii* subsp. *nitidus*.

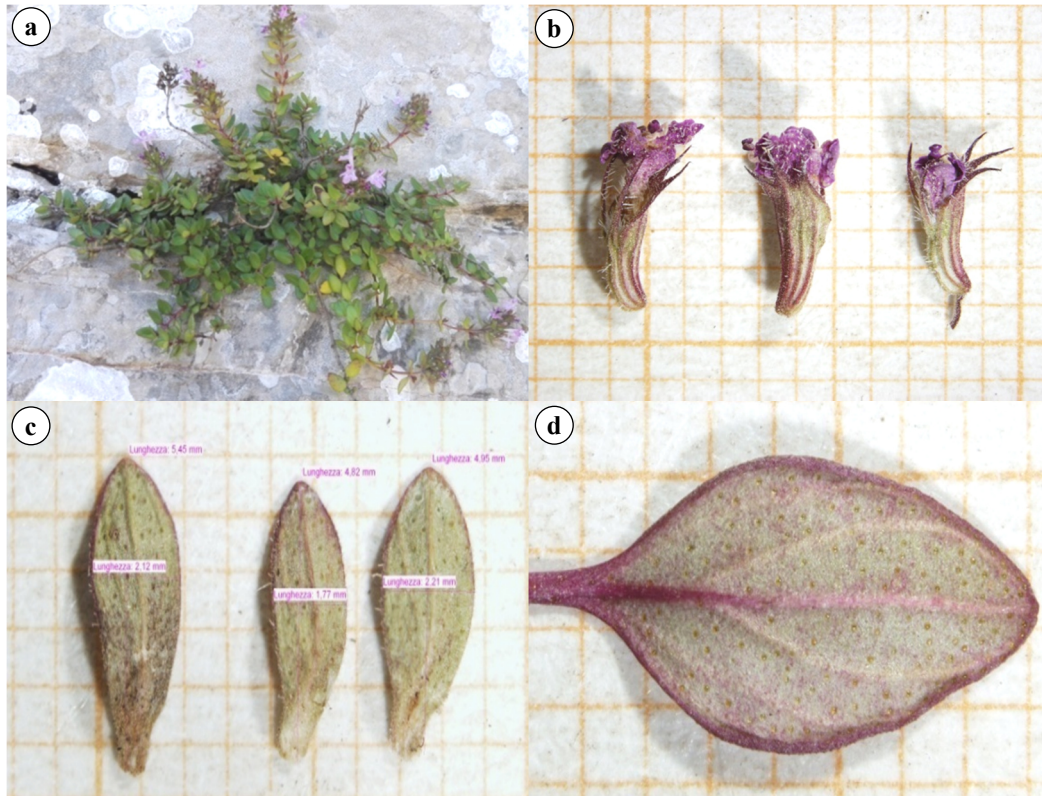


Figura 12. *T. richardii* subsp. *nitidus*: a) pianta in fioritura; b) fiori essiccati; c) brattee; d) foglia caulina.

***Thymus spinulosus* Ten.**

sect. *Hyphodromi* (A. Kern.) Halácsy

subsect. *Subbracteati* (Klokov) J alas.

[Syn: *Thymus striatus* var. *spinulosus* (Ten.) Fiori (1926); *Thymus acicularis* var. *virescens* Guss. (1828); *Thymus zygis* var. *virescens* (Guss.) Guss. (1844); *Thymus conspersus* Čělak. (1882); *Thymus striatus* subsp. *conspersus* (Čělak.) Nyman (1890); *Thymus albinervis* Strobl (1883); *Thymus conspersus* var. *hirsutum* Lojac. (1907); *Thymus rossi* Lojac. (1907); *Thymus pedicellatus* Lojac. (1907)].

Pianta con portamento erbaceo, repente o pseudorepente; fusti fioriferi con indumento olotrico. Le foglie lineari-ellittiche, subsessili, presentano pelosità sulla pagina superiore e ciglia alla base. Infiorescenza generalmente interrotta con brattee angoloso-ovate (trullate), diverse dalle foglie cauline. I fiori sono solitamente bianchi, raramente rosati. Le ghiandole, sessili e di forma globosa, sono di colore rosso rubino, raramente pallide, e abbondanti sui diversi organi della pianta (foglie, fiori, calice e brattee) (Tab. 7, Figg. 13, 14, 15, 16).

Periodo di fioritura: da maggio a luglio.

Distribuzione: specie comune, endemica dell'Italia centro-meridionale e della Sicilia.

Habitat preferenziale: ambienti xerici, pascoli montani e pendii rocciosi a 0–1.600 m s.l.m. di altitudine, predilige substrati calcarei.

Siti di raccolta: la specie è stata rilevata in diverse aree geografiche tra Sicilia e Calabria. In Sicilia le varie accessioni sono state raccolte nei distretti Deprano-Panormitano, Madonita, Nebrodense, Peloritano e Ibleo, a una altitudine compresa tra i 790 e i 1430 m s.l.m., nelle località: Monte Castellazzo (37°58'57.3"N, 14°58'57.4"E); Pizzo Leo (37°57'03.1"N, 14°57'49.0"E); Monte delle Rose (37°39'10.21"N, 13°25'03.77"E); Serre Quacella (37°51'43.2"N, 14°00'54.5"E); Monte Cammarata (37°37'17.5"N, 13°37'07.1"E); Pizzo S. Nicola (37°58'19.2"N, 14°41'36.6"E); Monte Lauro (37°06'50.79"N, 14°49'12.18"E). Le accessioni delle piante coltivate in vivaio sono state campionate nell'azienda Pianta Faro (37°41'47.76"N, 15°11'25.37"E), a quota 103 m s.l.m.

In Calabria i campionamenti sono stati effettuati nelle località Cozzo S. Elia (39°48'01.9"N, 16°16'24.7"E) e Timpone delle Fave (39°49'10.50"N, 16°17'21.10"E), in provincia di Cosenza, a quota 547 e 700 m s.l.m.

Tabella 7. Dati morfometrici relativi alle diverse accessioni di *T. spinulosus*. Le misure sono espresse come valore medio (mm). Per ciascuna accessione, si riportano il tipo di indumento dei fusti fioriferi (primo internodio sotto l'infiorescenza), la densità e il colore delle ghiandole.

Thymus spinulosus																			
MONTE LAURO		COZZO SELIA		TIMPONE DELLE FAVE		MONTE CAMMARATA		PIZZO LEO		MONTE CASTELLAZZO		MONTE DELLE ROSE		SERRE QUACELLA		PIZZO S. NICOLA		VIVAIO FARO	
FOGLIE																			
Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza
8,17±0,54	1,33±0,1	7,04±0,48	1,49±0,1	8,18±0,28	1,29±0,2	9,23±0,42	2,46±0,2	8,90±0,04	2,11±0,1	9,78±0,88	2,01±0,1	9,59±0,49	1,79±0,1	8,94±0,22	1,78±0,1	10,32±0,62	1,29±0,1	7,22±0,39	1,36±0,1
BRATTEE																			
MONTE LAURO		COZZO SELIA		TIMPONE DELLE FAVE		MONTE CAMMARATA		PIZZO LEO		MONTE CASTELLAZZO		MONTE DELLE ROSE		SERRE QUACELLA		PIZZO S. NICOLA		VIVAIO FARO	
Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza
4,52±0,34	1,75±0,2	4,61±0,41	1,66±0,04	4,17±0,22	1,62±0,1	4,85±0,46	2,26±0,1	5,15±0,24	1,79±0,2	4,17±0,24	1,45±0,1	5,33±0,28	1,74±0,1	6,31±0,42	2,62±0,03	4,76±0,23	1,55±0,2	4,52±0,34	1,75±0,2
TUBI CALICINI																			
MONTE LAURO		COZZO SELIA		TIMPONE DELLE FAVE		MONTE CAMMARATA		PIZZO LEO		MONTE CASTELLAZZO		MONTE DELLE ROSE		SERRE QUACELLA		PIZZO S. NICOLA		VIVAIO FARO	
Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza	Lunghezza	Larghezza
2,00±0,13	1,22±0,1	1,53±0,02	0,98±0,03	1,38±0,02	0,86±0,03	2,28±0,15	1,65±0,2	1,86±0,03	1,33±0,1	1,78±0,07	1,40±0,01	1,7±0,15	1,46±0,2	2,16±0,11	1,60±0,02	1,92±0,06	1,32±0,1	1,89±0,02	1,39±0,1
DENTI INFERIORI DEL CALICE																			
MONTE LAURO		COZZO SELIA		TIMPONE DELLE FAVE		MONTE CAMMARATA		PIZZO LEO		MONTE CASTELLAZZO		MONTE DELLE ROSE		SERRE QUACELLA		PIZZO S. NICOLA		VIVAIO FARO	
Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza	Lunghezza
2,02±0,22	2,05±0,10	1,95±0,13	2,65±0,13	2,96±0,05	2,45±0,07	2,12±0,08	2,69±0,05	2,17±0,14	1,96±0,05										
LUNGHEZZA TOT CALICE																			
MONTE LAURO		COZZO SELIA		TIMPONE DELLE FAVE		MONTE CAMMARATA		PIZZO LEO		MONTE CASTELLAZZO		MONTE DELLE ROSE		SERRE QUACELLA		PIZZO S. NICOLA		VIVAIO FARO	
4,01±0,18	3,58±0,08	3,33±0,14	4,93±0,25	4,82±0,04	4,23±0,14	3,91±0,08	4,85±0,17	4,09±0,18	3,84±0,06										
FUSTO FIORIFERO																			
Olotrico																			
DENSITA' E COLORE GHIANDOLE																			
Abbondanti, di colore rosso/giallo-ambrato																			



Figura 13. Habitat di crescita di *T. spinulosus* in località Serre Quacella (Madonie).



Figura 14. Habitat di crescita di *T. spinulosus* in località Timpone delle Fave (Pollino).



Figura 15. *T. spinulosus* in fioritura.

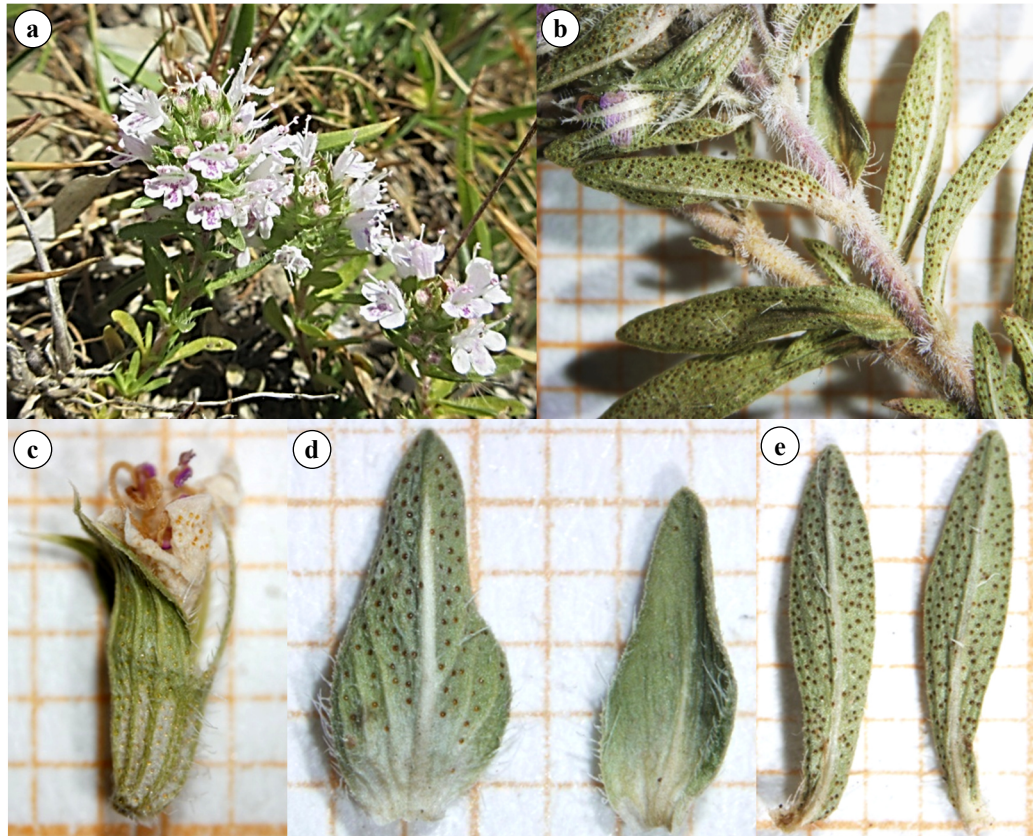


Figura 16. *T. spinulosus*: a) infiorescenze, b) pelosità fusto fiorifero, c) fiore, d) brattee (pag. inf. e sup.), e) foglie cauline.

Thymus striatus* Vahl subsp. *striatus

sect. *Hyphodromi* (A. Kern.) Halácsy

subsect. *Subbracteati* (Klokov) Jalas.

[Syn: *Thymus acicularis* var. *stebianus* Lacaita (1911); *Thymus acicularis* var. *lacaitae* Lojac. (1911); *Thymus striatus* subsp. *lacaitae* (Lojac.) Ronninger (1925); *Thymus striatus* var. *striatus* subvar. *lacaitae* (Lojac.) Moggi (1955); *Thymus striatus* subsp. *calvanicensis* Ronniger (1925); *Thymus striatus* subvar. *calvanicensis* (Ronniger) Ronninger (1930); *Thymus neapolitanus* A. Kern. ex Strobl (1883); *Thymus striatus* subsp. *salernitanus* Ronninger].

Pianta erbacea con fusti striscianti (repente), più o meno legnosa alla base, i fusti fioriferi sono olotrichi negli internodi superiori, anfitrichi in quelli inferiori, raramente interamente olotrichi o anfitrichi. Le foglie sono da lineari-lanceolate a spatolate, glabre o di rado pelose sulla pagina superiore, con nervature parallele piuttosto prominenti (camptodrome). L'infiorescenza, da capitata a interrotta, presenta brattee di forma differente dalle foglie cauline, generalmente di colore rossastro. I fiori con corolla violacea sono racchiusi all'interno di un calice tomentoso (Tab. 8, Figg. 17, 18, 19).

Periodo di fioritura: da maggio a giugno.

Distribuzione: est Mediterraneo. In Italia la specie è presente in Campania, Calabria e Basilicata, a 700–2300 m di altitudine.

Habitat preferenziale: pascoli rocciosi, pendii aridi e pietraie, su substrato calcareo.

Siti di raccolta: la singola accessione proviene dalla Basilicata ed è stata campionata in località Piano Ruggio (39°54'55.9"N, 16°07'50.0"E), a quota 1500 m s.l.m.

Tabella 8. Dati morfometrici relativi all'accessione di *T. striatus* subsp. *striatus*. Le misure sono espresse come valore medio (mm). Si riportano il tipo di indumento dei fusti fioriferi (primo internodio sotto l'infiorescenza), la densità e il colore delle ghiandole.

<i>Thymus striatus</i> subsp. <i>striatus</i>	
PIANO RUGGIO	
FOGLIE	
Lunghezza	Larghezza
8,86±0,52	1,76±0,1
BRATTEE	
Lunghezza	Larghezza
5,43±0,36	2,83±0,1
TUBI CALICINI	
Lunghezza	Larghezza
1,67±0,11	1,40±0,1
DENTI INFERIORI DEL CALICE	
Lunghezza	
2,21±0,08	
LUNGHEZZA TOT CALICE	
3,66±0,11	
FUSTO FIORIFERO	
Olotrico	
DENSITA' E COLORE GHIANDOLE	
Rare, di colore giallo chiaro	



Figura 17. *T. striatus* subsp. *striatus* in fioritura.



Figura 18. Habitat di crescita di *T. striatus* subsp. *striatus* in località Piano Ruggio (Pollino).

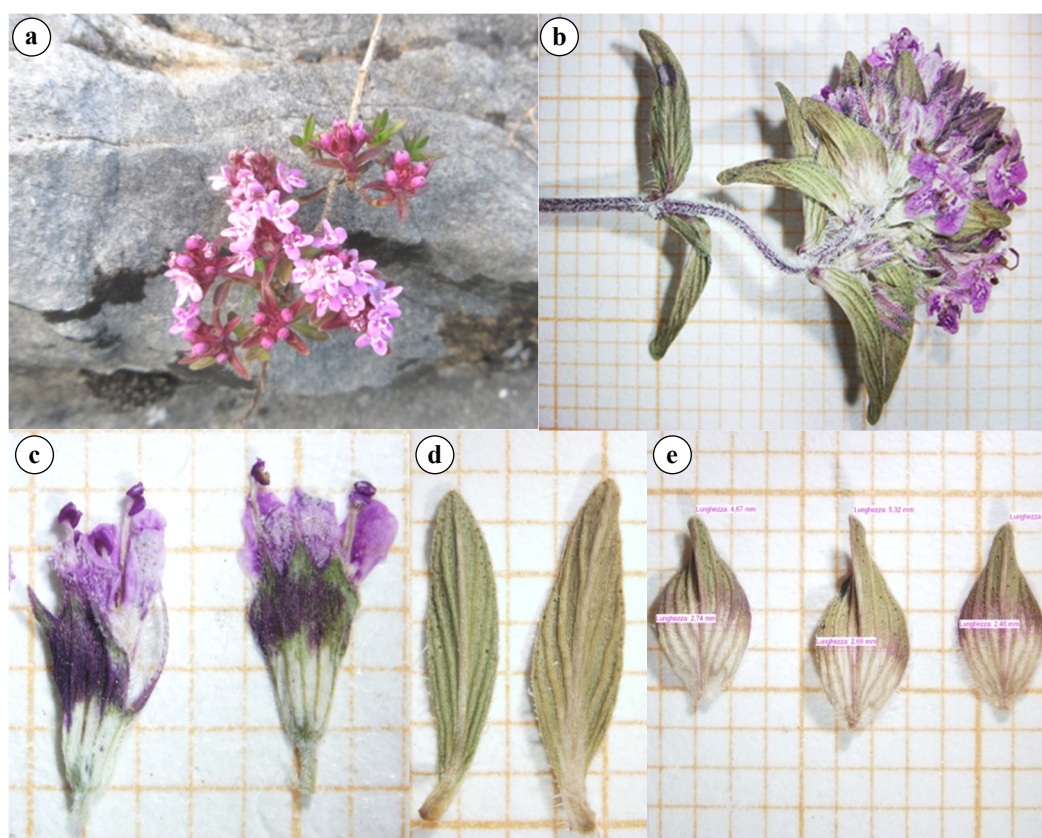


Figura 19. *T. striatus* subsp. *striatus*: a) infiorescenze, b) infiorescenze essiccate; c) fiori, c) foglie cauline, d) brattee.

Thymus vulgaris* L. subsp. *vulgaris

sect. *Thymus*

subsect. *Thymus*

[Syn: *Thymus vulgaris* var. *amiclaeus* Ten. (1831)].

Pianta con portamento sub-eretto o eretto, con fusti fioriferi olotrichi portanti infiorescenze sub-sferiche o allungate, i fiori hanno corolla rosea. Le foglie cauline, lanceolate o lineari, sono tomentose nella pagina inferiore, hanno margine revoluto e forma simile a quelle fiorali; presentano numerose ghiandole sessili di colore giallo (Tab. 9, Figg. 20, 21, 22).

Periodo di fioritura: da maggio a giugno.

Distribuzione: Mediterraneo centro-occidentale. In Italia è presente solo la subsp. *vulgaris*, riportata per la Valle d'Aosta, Piemonte, Liguria, Emilia Romagna, Abruzzo, Toscana, Umbria, Lazio.

Habitat preferenziale: garighe e pendii aridi, a 0–800 m s.l.m., su substrato calcareo.

Siti di raccolta: la singola accessione, proveniente dall'area delle Prealpi Liguri, è stata campionata presso il Monte Caprazoppa (SV) (44°09'44.3"N, 8°19'04.6"E), a una quota di circa 200 m s.l.m.

Tabella 9. Dati morfometrici relativi a *T. vulgaris* subsp. *vulgaris*. Le misure sono espresse come valore medio (mm). Si riportano il tipo di indumento dei fusti fioriferi (primo internodio sotto l'infiorescenza), la densità e il colore delle ghiandole.

<i>Thymus vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i>	
MONTE CAPRAZOPPA	
FOGLIE	
Lunghezza	Larghezza
5,97±0,19	2,01±0,2
BRATTEE	
Lunghezza	Larghezza
4,17±0,56	1,44±0,03
TUBI CALICINI	
Lunghezza	Larghezza
1,44±0,12	1,31±0,1
DENTI INFERIORI DEL CALICE	
Lunghezza	
2,18±0,01	
LUNGHEZZA TOT CALICE	
3,62±0,1	
FUSTO FIORIFERO	
Olotrico	
DENSITA' E COLORE GHIANDOLE	
Rare, di colore giallo chiaro	



Figura 20. *T. vulgaris* subsp. *vulgaris* in fioritura.



Figura 21. Infiorescenze di *T. vulgaris* subsp. *vulgaris* e *Callophrys rubi* (Lepidoptera, Lycaenidae).



Figura 22. *T. vulgaris* subsp. *vulgaris*: a) fiori, b) infiorescenza essiccata, c) brattea, d) foglie cauline.

***Thymus* sp.**

Questa accessione non è stata ancora definita dal punto di vista tassonomico per la presenza di caratteri morfologici intermedi tra le specie *T. paronychioides* e *T. spinulosus*. Ciò implica più approfondite indagini, attualmente in corso. Di seguito sono riportate le caratteristiche morfologiche rilevate su materiale fresco e le relative misure effettuate su materiale essiccato.

Pianta erbacea con portamento repente; foglie di forma ellittico-lanceolata, carnosette e provviste di ciglia alla base. Nervatura centrale della foglia più prominente rispetto alle laterali, più evanescenti. Brattee di forma ovato-lanceolata e diverse dalle foglie cauline; pelose sulla pagina inferiore, glabre su quella superiore. Presenta rare ghiandole sessili di colore giallo-ambrato, traslucide. I fusti fioriferi sono olotrichi, anche se la densità dei peli è piuttosto variabile nei diversi individui osservati ed è più marcata su due facce del fusto. Infiorescenza capitata con fiori di colore variabile dal rosa chiaro al porpora. (Tab. 10, Figg. 23, 24, 25).

Habitat preferenziale: pietraie e pendii rocciosi, gli individui sono stati rilevati prevalentemente su roccia.

Siti di raccolta: una singola accessione è stata campionata su Monte Cammarata (Monti Sicani) (37°37'18.0"N,13°36'37.2"E), a una quota di circa 1450 m s.l.m.

Tabella 10. Dati morfometrici relativi a *Thymus* sp. Le misure sono espresse come valore medio (mm). Si riportano il tipo di indumento dei fusti fioriferi (primo internodio sotto l'infiorescenza), la densità e il colore delle ghiandole.

<i>Thymus</i> sp.	
MONTE CAMMARATA	
FOGLIE	
Lunghezza	Larghezza
6,61±0,36	1,94±0,1
BRATTEE	
Lunghezza	Larghezza
4,23±0,15	1,84±0,1
TUBI CALICINI	
Lunghezza	Larghezza
1,54±0,06	1,15±0,1
DENTI INFERIORI DEL CALICE	
Lunghezza	
2,51±0,06	
LUNGHEZZA TOT CALICE	
4,05±0,56	
FUSTO FIORIFERO	
Olotrico	
DENSITA' E COLORE GHIANDOLE	
Rare, di colore giallo chiaro	



Figura 23. Habitat di crescita di *Thymus* sp. presso Monte Cammarata (Monti Sicani).



Figura 24. *Thymus* sp. in fioritura.

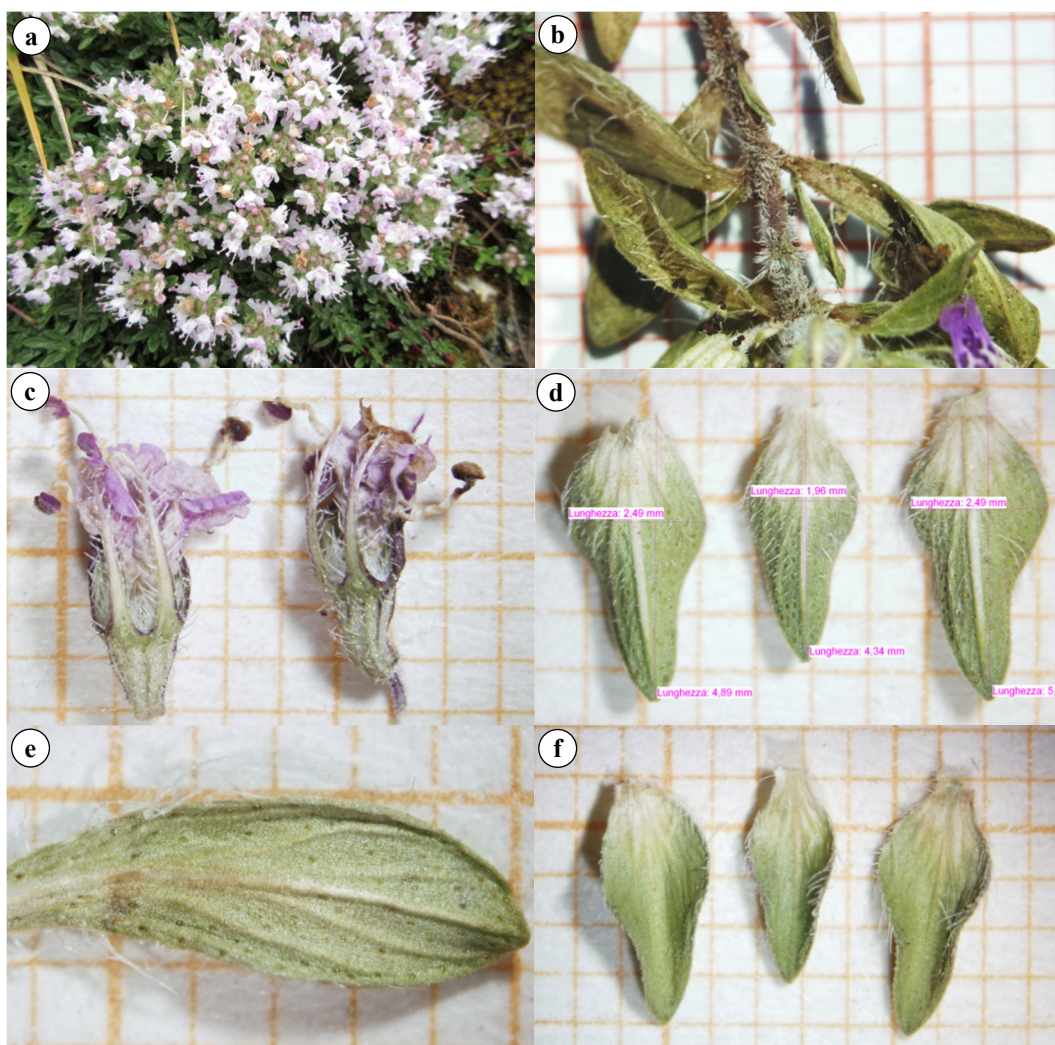


Figura 25. *Thymus* sp.: a) infiorescenze, b) pelosità fusto fiorifero, c) fiori, d) brattee (pag.inf.), e) foglia caulina, f) brattee (pag. sup.).

CAPITOLO 2

CHEMOTASSONOMIA DEL GENERE *THYMUS*

1 INTRODUZIONE

Tra gli organismi viventi, le piante costituiscono la principale sorgente di prodotti naturali, poiché capaci di sintetizzare un'enorme varietà di composti chimici biologicamente attivi, comunemente impiegati in ambito farmaceutico, cosmetico e medico. Tali composti, denominati metaboliti secondari, non sono direttamente implicati nelle funzioni di crescita e sviluppo ma sono indispensabili per la sopravvivenza della pianta (Hartmann, 1996), svolgono un importante ruolo ecologico nelle interazioni ecosistemiche, pianta-pianta, pianta-animale e pianta-ambiente (Hadacek, 2002), intervengono nei meccanismi di protezione e difesa contro parassiti ed erbivori (De Bouchberg *et al.*, 1976; Bryant *et al.*, 1991); di attrazione degli insetti impollinatori (Bergstrom, 1978; Beker *et al.*, 1989) e nei processi di adattamento alle condizioni climatiche (Seufert *et al.*, 1995).

I metaboliti secondari differiscono per sede di produzione e accumulo nelle diverse parti della pianta, per struttura chimica, origine biosintetica e funzione. Generalmente, hanno una distribuzione limitata ad alcuni gruppi tassonomici e per la loro specificità rappresentano un utile strumento di classificazione delle piante a supporto dei metodi tassonomici classici, basati sull'analisi dei caratteri morfologici e anatomici (Singh, 2016). Questo moderno approccio, basato sull'analisi e sullo studio dei profili metabolici e chimici per l'identificazione delle diverse entità tassonomiche, prende il nome di chemotassonomia. Tale disciplina, che ha avuto una recente espansione in relazione al progressivo miglioramento delle tecniche analitiche (Bhargava *et al.*, 2013) e all'ampliamento delle conoscenze biochimiche, costituisce un valido metodo in grado di fornire elementi utili alla discriminazione dei gruppi sistematici più problematici, laddove i soli metodi classici sono insufficienti.

Tra i metaboliti secondari, numerosi composti quali fenoli, alcaloidi, flavonoidi, terpenoidi e oli essenziali sono impiegati negli studi chemotassonomici (Smith, 1976).

I flavonoidi ad esempio, nel caso delle *Asteraceae*, possono essere utili in tassonomia (Bohm & Stuessy, 2001) per chiarire rapporti filogenetici a livello di tribù (Seeligmabb, 1994; Emerenciano *et al.*, 2007). Nell'ambito della stessa famiglia, l'analisi della composizione chimica degli oli essenziali e l'individuazione di caratteristici componenti o specifiche categorie di composti, quali i sesquiterpeni, sesquiterpeni lattonici e i monoterpeni; è stata utile per classificare e/o discriminare *taxa* nel genere *Anthemis* (Bruno *et al.*, 2002; Staneva *et al.*, 2008; Maggio *et al.*, 2014), *Helichrysum* (Maggio *et al.*, 2016), *Achillea* (Maffei *et al.*, 1989; Muselli *et al.*, 2007), *Chiliadenus* (Buhagiar *et al.* 2015) e *Chrysanthemum* (Sun *et al.*, 2015).

Nel genere *Stachys*, della famiglia delle *Lamiaceae*, così come nella famiglia delle *Fabaceae* i flavonoidi sono validi marcatori chemotassonomici (Harborne 1971; Tomás-Barberán & Wollenweber, 1990; Hegnauer & Hegnauer, 2001; Valant-Vetschera *et al.*, 2003; Skaltsa *et al.*, 2007).

All'interno della famiglia delle *Lamiaceae*, che include circa 220 generi, il profilo composizionale degli oli essenziali è stato frequentemente analizzato e adoperato per studi chemotassonomici di generi come: *Lavandula* (Bajalan & Pirbalouti, 2015), *Mentha* (Barzin *et al.*, 2014), *Micromeria* (Slavkovska *et al.*, 2005), *Origanum* (Skoula *et al.* 1999; Gulsoy, 2012), *Rosmarinus* (Elamrani *et al.*, 2000) e *Teucrium* (Perez *et al.*, 2000; Radulovic *et al.*, 2012). Nel genere *Salvia*, uno dei più studiati per la grande varietà di composti che caratterizzano le diverse specie (Wu *et al.*, 2012a), il contenuto in diterpeni o in sesquiterpeni lattonici, in particolare, è spesso utilizzato per differenziazioni a livello intraspecifico (Barbero & Maffei, 2016).

Nella famiglia delle *Rutaceae* gli oli essenziali sono stati utilizzati per discriminare specifiche cultivar (Gonzales *et al.*, 2001; Merle *et al.*, 2004), identificare ibridi all'interno del genere *Citrus* (Sawamura *et al.*, 2001; Tao *et al.*, 2008) o analizzare la variabilità a livello intraspecifico (Susandarini *et al.*, 2016; Fatta del Bosco *et al.*, 2017).

Pertanto, l'approccio chemotassonomico, basato sullo studio degli oli essenziali in particolare, costituisce un valido strumento per studiare la variabilità intraspecifica, differenziare le specie, evidenziare ibridi all'interno di popolazioni naturali (Maffei 1990).

Tra le *Lamiaceae*, anche il genere *Thymus* è stato studiato secondo il suddetto approccio (Salgueiro *et al.*, 1993; 2000; Tzakou & Constantinidis, 2005; Blanco *et al.*, 2010; Pitarokili *et al.*, 2014). All'interno del genere *Thymus* sono stati caratterizzati gli oli essenziali di 162 *taxa* e identificati, complessivamente, circa 360 composti volatili (Stahl-Biskup, 2002). Nella maggioranza di questi oli prevalgono i composti di natura terpenica (mono e sesquiterpeni) e, tra questi, il timolo e il carvacolo (monoterpeni fenolici) sono i più rappresentati. A questi ultimi è correlata la presenza di due monoterpeni idrocarburi, il *p*-cymene e il γ -terpinene, che costituiscono i loro precursori biosintetici (Thompson *et al.*, 2003). Negli oli essenziali di *Thymus* sono frequenti, altresì, composti quali il linalool, il borneol, il geraniol, l' α -terpineol e l'1,8-cineole (Stahl-Biskup, 2002).

L'elevato polimorfismo chimico che contraddistingue il genere *Thymus* è stato evidenziato, per la prima volta, in popolazioni di *T. vulgaris* del sud della Francia (Granger *et al.*, 1963; Granger & Passet, 1971; Passet, 1971; Vernet *et al.*, 1977; Gouyon *et al.*, 1986; Vernet *et al.*, 1986). All'interno di tali popolazioni sono stati individuati sei differenti chemotipi, sulla base della prevalenza di uno specifico componente. È stato sottolineato che i chemotipi fenolici

(carvacrolo o timolo) erano prevalenti in ambienti aridi e con temperature elevate e quelli non fenolici (geraniol, linalool, α -terpineol, thuyanol-4) in aree collinari (oltre i 400 m di altitudine), caratterizzate da un clima più umido e freddo e da una maggiore profondità del suolo (Passet, 1971; Granger & Passet, 1973; Thompson *et al.*, 1998).

Chemotipi differenti in relazione all'area geografica, alle condizioni pedoclimatiche e ai fattori ambientali, sono stati rilevati anche in 11 specie di *Thymus* distribuite tra il sud-est della Spagna e il centro-sud della Francia (Adzet *et al.*, 1977).

La variabilità composizionale riscontrata negli oli essenziali di *Thymus*, a livello intra- e interspecifico, è stata descritta in numerose specie e popolazioni (Stahl, 1984; Salgueiro *et al.*, 1997a; Corticchiato *et al.*, 1998; Blanquer *et al.*, 1998; Sáez, 1999; Thompson *et al.*, 2003; Trindade *et al.*, 2008; De Lisi *et al.*, 2011; Kameníková *et al.*, 2015) ed è oramai nota l'influenza, su tale variabilità, di fattori sia endogeni sia esogeni (Thompson, 2002; Pluhar *et al.*, 2007). In tal senso, sono molteplici gli studi che hanno messo in correlazione la composizione chimica degli oli essenziali con i parametri ambientali (Boira & Blanquer, 1998; Pirbalouti *et al.*, 2013), la distribuzione biogeografia (Llorens *et al.*, 2014), lo stadio di crescita della pianta (Touhami *et al.*, 2017), la fase fenologica (Blanco *et al.*, 2012), l'altitudine (Delazar *et al.*, 2011; Dizajeyekan *et al.*, 2016), la tipologia di suolo (Martonfi *et al.*, 1994; Vaičiulytė *et al.*, 2017) e la stagionalità (Schratz & Horster, 1970; Sharafzadeh *et al.*, 2011), al fine di valutarne l'influenza sul polimorfismo chimico (chemotipi e/o ecotipi). In un altro studio Jensen & Ehlers (2010) ad esempio, hanno indagato gli effetti diretti ed indiretti determinati, all'interno di comunità vegetali, dalla presenza di piante di *T. pulegioides*.

Nel presente studio, per le difficoltà di determinazione intrinseche al genere *Thymus*, si è tentato di apportare un contributo alla tassonomia classica utilizzando un approccio chemotassonomico. A tale scopo, sono stati caratterizzati in termini quali-quantitativi gli oli essenziali estratti da differenti *taxa* spontanei del genere *Thymus*. I campionamenti hanno riguardato popolazioni naturali distribuite nel territorio italiano, con particolare focus su quelle di Sicilia e Calabria. L'indagine è stata estesa anche a oli essenziali estratti da piante spontanee coltivate in vivaio (*T. spinulosus*; *T. richardii* subsp. *nitidus*).

Complessivamente, tra il 2016 e il 2017, sono state analizzate 35 accessioni appartenenti a 8 *taxa*: *T. longicaulis* subsp. *longicaulis*; *T. paronychioides*; *T. praecox* subsp. *parvulus*; *T. spinulosus*; *T. richardii* subsp. *nitidus*; *Thymus striatus* subsp. *striatus*; *Thymus vulgaris* subsp. *vulgaris*; *Thymus* sp.

Relativamente ad alcuni dei suddetti *taxa*, sono disponibili in letteratura degli studi riguardanti sia l'aspetto chimico sia l'attività biologica dei loro oli essenziali. Tuttavia, in

pochi casi è stato affrontato uno studio chemotassonomico (Bini Maleci *et al.*, 1999; Llorens *et al.*, 2014) esteso a un così cospicuo numero di *taxa* e popolazioni.

Nello specifico, in alcune ricerche sono stati indagati i metaboliti secondari di varietà/sottospecie di *T. longicaulis* (Baser *et al.*, 1992; 1993; Baser & Koyuncu, 1994), provenienti da diverse aree geografiche quali l'Italia (Bellomaria *et al.*, 1981; De Martino *et al.*, 2009), la Serbia (Grujic-Jovanovic *et al.*, 2009) e la Grecia (Chorianopoulos *et al.*, 2004), sotto il profilo chimico e delle loro proprietà antiossidanti e anti-infiammatorie (Galasso *et al.*, 2014).

Nel lavoro di De Feo *et al.* (2003) viene descritta la composizione chimica e l'attività biologica su batteri Gram+ e Gram- di oli essenziali di *T. spinulosus* estratti da popolazioni cresciute su differenti substrati, in località Rocca Busambra (Sicilia occidentale).

Su *T. richardii* i dati di letteratura riguardano il profilo chimico degli oli essenziali (Bader *et al.*, 2001) e la variabilità composizionale tra le diverse subspecie [*T. richardii* subsp. *ebusitanus* (Font Quer) Jalas, *T. richardii* subsp. *nitidus*, *T. richardii* Pers. subsp. *richardii*, *T. richardii* subsp. *vigoi* Riera, Güemes & Rosselló] anche in relazione ai fattori climatici, biogeografici ed edafici (Llorens *et al.*, 2014). In altri studi sono stati caratterizzati i composti volatili di *T. striatus* per differenziare subspecie e popolazioni del centro e sud Italia (Bini Maleci *et al.*, 1997; 1999). Relativamente a *T. praecox* sono disponibili studi sulla composizione chimica degli oli essenziali o sulla loro attività antiossidante per le sottospecie *T. praecox* subsp. *polytrichus* (Petrović *et al.*, 2015) e *T. praecox* subsp. *penyalarensis* (Blanco *et al.*, 2012).

Tuttavia, il *taxon* più studiato e descritto nella maggior parte dei lavori è *T. vulgaris*, per le molteplici proprietà biologiche espresse dai suoi oli essenziali (Piccaglia & Marotti, 1991; Maccioni *et al.*, 1992; Thompson *et al.*, 2003; Reddy *et al.*, 2014).

2. MATERIALI E METODI

2.1 Trattamento del materiale vegetale

Il materiale vegetale fresco di 35 accessioni appartenenti a differenti *taxa* del genere *Thymus* [*T. longicaulis* subsp. *longicaulis* (11); *T. paronychioides* (5); *T. praecox* subsp. *parvulus* (2); *T. spinulosus* (12); *T. richardii* subsp. *nitidus* (2); *T. striatus* subsp. *striatus* (1); *T. vulgaris* subsp. *vulgaris* (1); *Thymus* sp. (1)], raccolto nel corso del 2016/2017 (Tab.1) nella fase di fioritura delle piante, è stato opportunamente selezionato, privato delle parti legnose e di eventuali impurità, essiccato a temperatura ambiente e al riparo dalla luce, nei laboratori della Sez. di Biologia vegetale del Dipartimento di Scienze Biologiche, Geologiche e Ambientali dell'Università degli Studi di Catania.

Per tutte le accessioni si è proceduto alla separazione delle parti vegetative dalle fiorali (Fig. 1) e, nei casi di sufficiente quantità di materiale di entrambe le parti della pianta, alla idrodistillazione e analisi degli oli essenziali di ciascuna matrice per confrontarne la composizione (Tab. 2). Il materiale vegetale è stato prelevato random e da numerosi individui (≥ 50) per popolazione.



Figura 1. Fase di selezione del materiale vegetale per l'idrodistillazione: eliminazione delle parti legnose, separazione delle parti fiorali dalle vegetative.

Tabella 1. *Taxa* e accessioni del genere *Thymus* investigati. Per ciascun *taxon* sono riportate: data di raccolta, località e relativa provincia, area geografica, altitudine (m s. l. m.), sigla identificativa, coordinate geografiche del sito di raccolta.

Campionamenti 2016-2017								
<i>Taxa</i>	Data di raccolta	Località	Prov.	Area geografica	Altitudine (m s.l.m.)	Sigla accessione	Coordinate geografiche (WGS84)	
							N	E
<i>Thymus longicaulis</i> C. Presl subsp. longicaulis	10/06/2016	Monte Trefinaite	ME	Peloritani	1237	TL-3-FIN	37°58'18.6"	15°07'39.5"
<i>Thymus longicaulis</i> C. Presl subsp. longicaulis	11/05/2017	Pizzo Mualio	ME	Peloritani	1047	TL-MUAL	38°02'13.1"	15°17'45.5"
<i>Thymus longicaulis</i> C. Presl subsp. longicaulis	10/06/2016 24/05/2017	Pizzo Pinto	ME	Peloritani	1211-1303	TL-PINT	37°56'49.0"	15°11'02.3"
<i>Thymus longicaulis</i> C. Presl subsp. longicaulis	04/06/2016	Lago Lacina	VV	Serre Calabre	1067-1120	TL-LL	38°35'57"	16°24'20"
<i>Thymus longicaulis</i> C. Presl subsp. longicaulis	02/06/2016	Ponte Gioacchino	VV	Serre Calabre	971	TL-PG	38°28'59.0"	16°17'03.0"
<i>Thymus longicaulis</i> C. Presl subsp. longicaulis	26/05/2017	Cassari (Allaro)	VV	Serre Calabre	770	TL-ALLA	38°27'50.09"	16°18'43.08"
<i>Thymus longicaulis</i> C. Presl subsp. longicaulis	26/05/2017	Cassari	VV	Serre Calabre	1189	TL-CASS	38°25'58.0"	16°18'42.6"
<i>Thymus longicaulis</i> C. Presl subsp. longicaulis	06/06/2017	Villaggio Zomaro	RC	Aspromonte	968-979	TL-ZOMA	38°17'58.7"	16°06'45.4"
<i>Thymus longicaulis</i> C. Presl subsp. longicaulis	07/06/2017	Gambarie	RC	Aspromonte	1423	TL-GAMB	38°10'36.7"	15°50'50.5"
<i>Thymus longicaulis</i> C. Presl subsp. longicaulis	25/06/2017	SP 256- Monte Scuro (Fago del soldato)	CS	Sila	1597	TL-FAGO	39°20'22.0"	16°23'54.2"
<i>Thymus paronychioides</i> Čelak.	18/05/2016 16/05/2017	Portella del Vento (Rocca Busambra)	PA	Sicani	1106	TP-VENT	37°50'38.2"	13°26'22.0"
<i>Thymus paronychioides</i> Čelak.	18/05/2016 16/05/2017	Piano della Tramontana (Rocca Busambra)	PA	Sicani	1176	TP-TRAM	37°50'53.0"	13°25'44.1"
<i>Thymus paronychioides</i> Čelak.	09/06/2017	Monte Cammarata	AG	Sicani	1564	TP-CAMM TP-CAMM-INF	37°37'07.75"	13°36'28.1"
<i>T. praecox</i> Opiz subsp. parvulus (Lojac.) Bartolucci, Peruzzi & N.G.Passal.	26/05/2016 25/05/2017	Monte Scuderi	ME	Peloritani	1039-1143	T-PRAEX	38°04'00.0"	15°24'15.0"
<i>Thymus spinulosus</i> Ten.	27/05/2017	Cozzo S. Elia	CS	Pollino	547	TS-ELIA TS-EL-INF	39°48'01.9"	16°16'24.7"
<i>Thymus spinulosus</i> Ten.	27/05/2017	Timpone delle Fave	CS	Pollino	700	TS-FAVE TS-FV-INF	39°49'10.50"	16°17'21.10"
<i>Thymus spinulosus</i> Ten.	17/06/2016	Pizzo Leo	ME	Nebrodi	1234	TS-LEO	37°57'03.1"	14°57'49.0"
<i>Thymus spinulosus</i> Ten.	03/06/2017	Monte Lauro	SR/RG	Iblei	794	TS-LAUR	37°06'50.79"	14°49'12.18"
<i>Thymus spinulosus</i> Ten.	09/06/2017	Monte Cammarata	AG	Sicani	1192	TS-CAMM	37°37'17.5"	13°37'07.1"
<i>Thymus spinulosus</i> Ten.	22/06/2016 10/06/2017	Vivaio Pianta Faro	CT	Pendici Monte Etna	103	TS-FARO	37°41'47.76"	15°11'25.37"
<i>Thymus spinulosus</i> Ten.	15/06/2017	Pizzo S. Nicola	ME	Nebrodi	1204	TS-SNIC TS-SN-INF	37°58'19.2"	14°41'36.6"
<i>Thymus spinulosus</i> Ten.	17/06/2016 15/06/2017	Monte Castellazzo	ME	Nebrodi	1262	TS-CAST TS-CA-INF	37°58'57.3"	14°58'57.4"
<i>Thymus spinulosus</i> Ten.	21/06/2017	Monte delle Rose	AG/PA	Sicani	1430	TS-ROSE TS-RO-INF	37°39'10.21"	13°25'03.77"
<i>Thymus spinulosus</i> Ten.	28/06/2017	Serre Quacella	PA	Madonie	1385	TS-QUAC TS-QINF	37°51'43.2"	14°00'54.5"
<i>Thymus richardii</i> Pers. subsp. nitidus (Guss.) J alas	08/07/2017	Marettimo	TP	Isole Egadi	360-446	TR-MARE	37°57'41.49" 37°59'07.30"	12°03'56.90" 12°03'22.77"
<i>Thymus richardii</i> Pers. subsp. nitidus (Guss.) J alas	10/06/2017	Vivaio Pianta Faro	CT	Pendici Monte Etna	103	TR-FARO	37°41'47.76"	15°11'25.37"
<i>Thymus</i> sp.	09/06/2017	Monte Cammarata	AG	Sicani	1450	TSP-3	37°37'18.0"	13°36'37.2"
<i>Thymus striatus</i> Vahl subsp. striatus	24/06/2017	Piano Ruggio	PZ	Pollino	1500	TST-RUG	39°54'55.9"	16°07'50.0"
<i>Thymus vulgaris</i> L. subsp. vulgaris	20/05/2017	Monte Caprazoppa	SV	Prealpi Liguri	200	TV-LIGU	44°09'44.3"	8°19'04.6"

2.2 Estrazione e analisi degli oli essenziali

Dopo l'essiccazione il materiale vegetale (50-100g per accessione) è stato opportunamente triturato mediante un mulino e sottoposto a idrodistillazione per 3 h con apparato Clevenger (Fig. 2), come descritto dalla Farmacopea Europea (2008), fino a quando non si è verificato un aumento significativo del volume di olio raccolto. Il recupero dell'olio essenziale è stato di norma eseguito prelevando con una siringa la matrice oleosa stratificata sull'acqua (Fig. 2). Nei casi in cui le rese degli oli sono state molto basse, cioè al di sotto dello 0.1% (v/p), è stato aggiunto del solvente, di norma *n*-esano, prelevando con una siringa, come nel caso precedente, la soluzione di olio essenziale nel solvente.

Gli oli essenziali ottenuti sono stati disidratati/anidrificati in solfato di sodio (Na_2SO_4) e conservati in vials sigillate alla temperatura di -18°C . La resa ottenuta dall'idrodistillazione, sia delle parti vegetative sia fiorali, è stata espressa in termini percentuali come volume di olio essenziale ottenuto per grammi di materiale secco distillato (v/p).

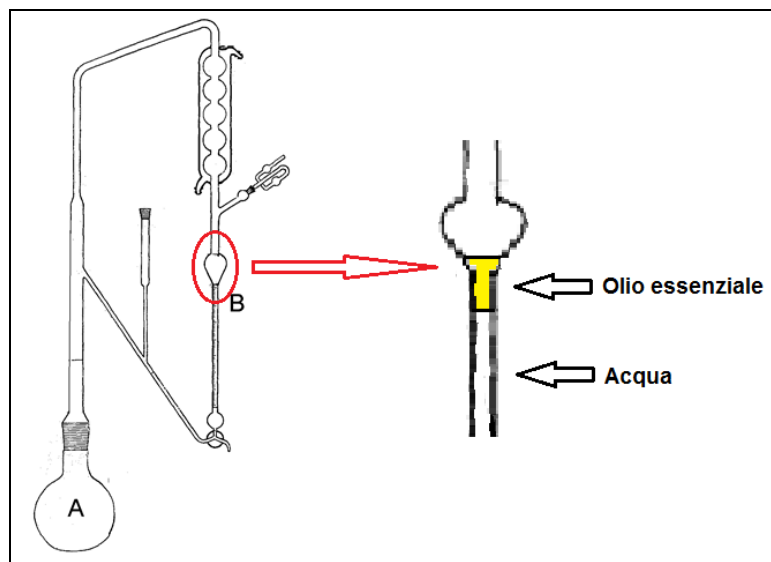


Figura 2. Idrodistillatore utilizzato per le estrazioni degli oli essenziali di *Thymus*. La matrice vegetale, opportunamente sminuzzata, è stata posta all'interno di un pallone (A) in acqua, portata ad ebollizione. L'olio essenziale, stratificato sull'acqua (B), è stato recuperato mediante un'apposita siringa.

L'analisi quali-quantitativa degli oli essenziali è stata effettuata utilizzando la gas cromatografia (GC) con colonna capillare abbinata a due tipologie di rivelatori: il detector a ionizzazione di fiamma (FID) e la spettrometria di massa (MS).

Le analisi GC-FID sono state realizzate con un gas cromatografo *Shimadzu* mod. *GC-17A* equipaggiato con detector a ionizzazione di fiamma (FID), colonna DB5MS capillare (15 m x 0.10 mm i.d. film thickness 0.15 μm). Le condizioni operative sono state le seguenti: le temperature dell'iniettore e del detector sono state fissate rispettivamente a 250 e 290°C ; la

temperatura del forno è stata mantenuta a 60°C per 1 min., poi aumentata da 60 a 280°C a 10°C/min. e mantenuta a 280°C per 1 min., l'elio (He) è stato usato come carrier gas (0.9 mL/min), la modalità di iniezione in split (1:200), il volume di iniezione 1 µL [4% (v/v) di olio in CH₂Cl₂], la velocità lineare in colonna è stata di 45 mL/L. La gestione dell'apparecchiatura è stata eseguita da un software Shimadzu: Class-VP Chromatography Data System versione 4.3. Le concentrazioni dei composti, espresse in percentuale relativa, sono state determinate dalle aree dei loro picchi nel profilo GC-FID (Fig. 3).

L'analisi GC/MS è stata realizzata con un gas cromatografo *Shimadzu* mod. *GCMS-QP505A* equipaggiato con la stessa colonna e nelle stesse condizioni operative descritte sopra per l'analisi GC-FID. Condizioni operative specifiche: voltaggio di ionizzazione di 70 eV, *electron multiplier energy* 900V, *ion-source temperature* 180°C. Gli spettri MS sono stati ottenuti impostando un range di massa (*m/z*) 40-400. La stessa soluzione di olio essenziale (1 µL) utilizzata per l'analisi GC-FID è stata iniettata in modalità split (1:96). La gestione dell'apparecchiatura è stata effettuata tramite software Shimadzu: GC/MS solution version 1.02.

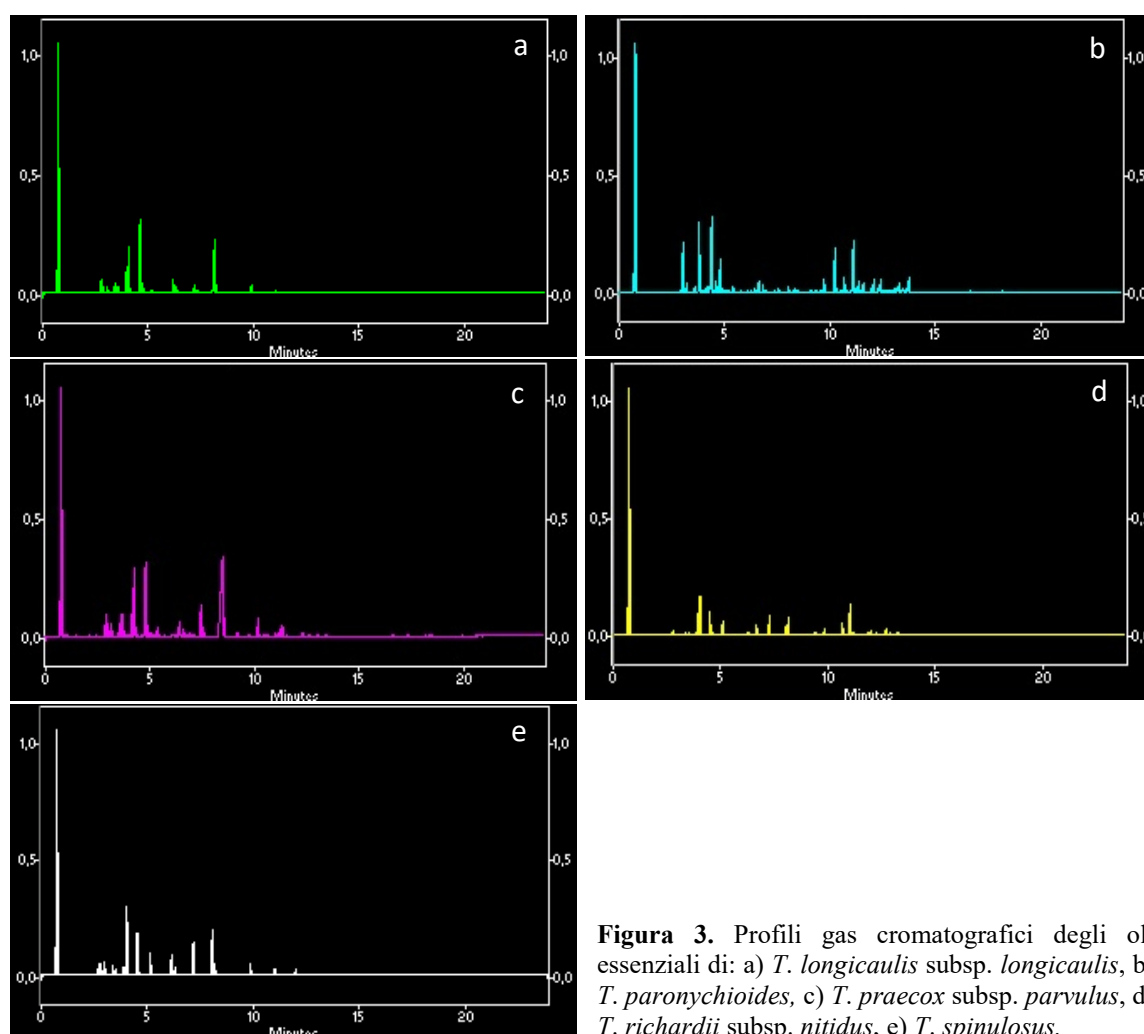


Figura 3. Profili gas cromatografici degli oli essenziali di: a) *T. longicaulis* subsp. *longicaulis*, b) *T. paronychioides*, c) *T. praecox* subsp. *parvulus*, d) *T. richardii* subsp. *nitidus*, e) *T. spinulosus*.

2.3 Identificazione dei componenti

L'identificazione dei singoli componenti è stata effettuata mediante una combinazione della misura dei loro indici di ritenzione (RI) calcolati utilizzando una miscela di *n*-alcani (C₈-C₂₆) iniettata nelle stesse condizioni utilizzate per l'analisi degli oli, mediante l'esame degli spettri di massa riportati in letteratura (Adams, 2007), e dal confronto di questi ultimi con quelli presenti nelle librerie in dotazione del GC-MS, quali la NIST 98. Inoltre, quando è stato possibile, tramite co-iniezione con componenti puri.

2.4 Analisi statistica

Per confrontare e mettere in evidenza eventuali similarità/dissimilarità tra gli oli essenziali delle differenti specie e/o accessioni si è fatto ricorso all'analisi cluster, mediante il metodo agglomerativo UPGMA (Unweighted pair group method using arithmetic averages), basato su distanze Euclidee. Per l'analisi statistica è stato adoperato il software R (R Core Team, 2017). I dati relativi alla composizione chimica degli oli essenziali di tutte le accessioni (estratti da: parti vegetative del 2016, parti vegetative del 2017, parti fiorali del 2017), previa standardizzazione e rimozione di tutte le variabili a concentrazioni inferiori o pari allo 0.04%, di quelle che non evidenziavano variabilità tra un'osservazione e l'altra e dei composti presenti in un solo campione, sono stati confrontati ed elaborati.

3. RISULTATI E DISCUSSIONI

3.1 Rese in olio essenziale

Dall'idrodistillazione delle parti vegetative e fiorali sono stati ottenuti oli con un intenso aroma ed una colorazione variabile dal giallo brillante al giallo chiaro (Fig. 4). In relazione alla specie, accessione e porzione di pianta distillata (parti vegetative o fiorali), sono state ottenute rese in olio essenziale differenti riportate in termini percentuali (v/p) nella Tabella 2. La più alta resa è stata osservata nella specie *T. vulgaris* subsp. *vulgaris* (3.4%) e la più bassa in *T. striatus* subsp. *striatus* (0.2%). Dalle parti vegetative di tutte le accessioni di *T. longicaulis* subsp. *longicaulis* e *T. spinulosus* è stato ottenuto, mediamente, lo stesso volume di olio (resa media pari all'1.5%) mentre dalle parti fiorali, in entrambe le specie, la resa è stata più alta. Nello specifico, è stata ottenuta una resa del 2.5% in *T. longicaulis* subsp. *longicaulis* (valore di una sola accessione) e del 2.1% in *T. spinulosus* (valore medio delle diverse accessioni). Nelle rimanenti specie l'ordine osservato è stato il seguente: *T. praecox* subsp. *parvulus* > *T. richardii* subsp. *nitidus* > *Thymus* sp. > *T. paronychioides*.

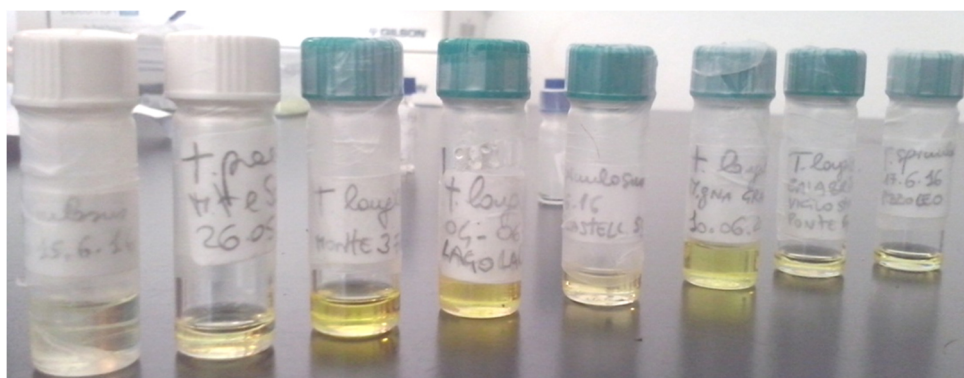


Figura 4. Oli essenziali di *Thymus* spp. ottenuti dall'idrodistillazione delle parti vegetative di accessioni raccolte nel 2016.

Confrontando le rese in olio essenziale delle accessioni campionate per due anni consecutivi (2016 e 2017), nelle medesime località, si evidenziano differenze rilevanti in *T. praecox* subsp. *parvulus* (T-PRAEX) e in *T. longicaulis* subsp. *longicaulis* (TL-PINT).

Tabella 2. *Taxa* e accessioni del genere *Thymus* investigati. Per ciascun *taxon* sono riportate: località di raccolta e relativa provincia, sigla identificativa del *taxon*, anno di raccolta, porzione di pianta idrodistillata (PV:vegetative; PF:fiorali), resa in olio essenziale espressa (in %) come volume/grammi di materiale secco (v/p).

Accessioni 2016-2017						
<i>Taxa</i>	Località	Prov.	Sigla accessione	Anno di raccolta	Porzione distillata	Resa Olio (v/p)
<i>Thymus longicaulis</i> C. Presl subsp. longicaulis	Monte Trefinaite	ME	TL-3-FIN	2016	PV	1.12%
<i>Thymus longicaulis</i> C. Presl subsp. longicaulis	Pizzo Mualio	ME	TL-MUAL	2017	PV	1.43%
<i>Thymus longicaulis</i> C. Presl subsp. longicaulis	Pizzo Pinto	ME	TL-PINT	2016	PV	1.47%
				2017		1.93%
<i>Thymus longicaulis</i> C. Presl subsp. longicaulis	Lago Lacina	VV	TL-LL	2016	PV	1.13%
<i>Thymus longicaulis</i> C. Presl subsp. longicaulis	Ponte Gioacchino	VV	TL-PG	2016	PV	1.35%
<i>Thymus longicaulis</i> C. Presl subsp. longicaulis	Cassari (Allaro)	VV	TL-ALLA	2017	PV	1.76%
<i>Thymus longicaulis</i> C. Presl subsp. longicaulis	Cassari	VV	TL-CASS	2017	PV	2.46%
<i>Thymus longicaulis</i> C. Presl subsp. longicaulis	Villaggio Zomaro	RC	TL-ZOMA	2017	PV	1.2%
<i>Thymus longicaulis</i> C. Presl subsp. longicaulis	Gambarie	RC	TL-GAMB	2017	PV	1.86%
<i>Thymus longicaulis</i> C. Presl subsp. longicaulis	SP 256-Monte Scuro (Fago del soldato)	CS	TL-FAGO	2017	PV PF	1.36%
<i>Thymus paronychioides</i> Čelak.	Portella del Vento (Rocca Busambra)	PA	TP-VENT	2016	PV	0.2%
				2017		0.17%
<i>Thymus paronychioides</i> Čelak.	Piano della Tramontana (Rocca Busambra)	PA	TP-TRAM	2016	PV	0.23%
				2017		0.29%
<i>Thymus paronychioides</i> Čelak.	Monte Cammarata	AG	TP-CAMM TP-CAMM-INF	2017	PV	0.43%
					PF	0.79%
<i>T. praecox</i> Opiz subsp. parvulus (Lojac.) Bartolucci, Peruzzi & N.G.Passal.	Monte Scuderi	ME	T-PRAEX	2016	PV	0.56%
				2017		1.15%
<i>Thymus spinulosus</i> Ten.	Cozzo S. Elia	CS	TS-ELIA TS-EL-INF	2017	PV	1.6%
					PF	1.6%
<i>Thymus spinulosus</i> Ten.	Timpone delle Fave	CS	TS-FAVE TS-FV-INF	2017	PV	1.77%
					PF	1.13%
<i>Thymus spinulosus</i> Ten.	Pizzo Leo	ME	TS-LEO	2016	PV	1.1%
<i>Thymus spinulosus</i> Ten.	Monte Lauro	SR/RG	TS-LAUR	2017	PV	1.77%
<i>Thymus spinulosus</i> Ten.	Monte Cammarata	AG	TS-CAMM	2017	PV	1.36%
<i>Thymus spinulosus</i> Ten.	Vivaio Pianta Faro	CT	TS-FARO	2016	PV	1.7%
				2017		1.67%
<i>Thymus spinulosus</i> Ten.	Pizzo S. Nicola	ME	TS-SNIC TS-SN-INF	2017	PV	1.09%
					PF	2.23%
<i>Thymus spinulosus</i> Ten.	Monte Castellazzo	ME	TS-CAST TS-CA-INF	2016/2017 2017	PV	1.2%
					PF	2.08%
<i>Thymus spinulosus</i> Ten.	Monte delle Rose	AG/PA	TS-ROSE TS-RO-INF	2017	PV	1.65%
					PF	3.08%
<i>Thymus spinulosus</i> Ten.	Serre Quacella	PA	TS-QUAC TS-QINF	2017	PV	1.7%
					PF	2.91%
<i>Thymus richardii</i> Pers. subsp. nitidus (Guss.) J alas	Marettimo	TP	TR-MARE	2017	PV	0.75%
<i>Thymus richardii</i> Pers. subsp. nitidus (Guss.) J alas	Vivaio Pianta Faro	CT	TR-FARO	2017	PV	0.42%
<i>Thymus</i> sp.	Monte Cammarata	AG	TSP-3	2017	PV	0.49%
<i>Thymus striatus</i> Vahl subsp. striatus	Piano Ruggio	PZ	TST-RUG	2017	PV	0.15%
<i>Thymus vulgaris</i> L. subsp. vulgaris	Monte Caprazoppa	SV	TV-LIGU	2017	PV	3.43%

3.2 Composizione chimica degli oli essenziali

Nelle Tabelle 3 e 4 è riportata la lista dettagliata dei costituenti chimici, in ordine di eluizione, degli oli essenziali delle specie e accessioni di *Thymus* allo studio (Tab. 1). Complessivamente, sono stati analizzati 43 oli essenziali e sono stati identificati 243 composti (accessioni 2016 e 2017) che, in relazione alla loro origine biosintetica, sono stati catalogati in sei differenti classi chimiche: monoterpeni idrocarburi (MH), monoterpeni ossigenati (MO), sesquiterpeni idrocarburi (SH), sesquiterpeni ossigenati (SO), diterpeni (DI) e altri composti non terpenici (OT) (Tab. 3 e Tab. 4). Nei diversi *taxa* esaminati, tra il 2016 e il 2017, i componenti individuati sono stati: 92 in *T. striatus* subsp. *striatus*; da 94 a 128 in *T. paronychioides*; 44-50 in *T. longicaulis* subsp. *longicaulis*; 59 (valore medio di 2 accessioni) in *T. praecox* subsp. *parvulus*; 48-63 in *T. spinulosus*; 53 in *T. vulgaris* subsp. *vulgaris*; 87 (valore medio di 2 accessioni) in *T. richardii* subsp. *nitidus*; 98 in TSP-3; ed è stato caratterizzato, in media, il 91-99% (v/v) della composizione totale.

In quasi tutti gli oli essenziali analizzati i monoterpeni (idrocarburi e ossigenati) costituiscono la classe predominante, in termini di abbondanza relativa (valore medio >49.6%), così come è stato rilevato in altri studi riguardanti varie specie di *Thymus* (Stahl-Biskup, 2002).

In generale, confrontando gli oli dei differenti *taxa* analizzati, il più basso contenuto in monoterpeni, rispetto alla composizione totale, è stato riscontrato in *T. paronychioides* (52.7-70.6%) e in *T. striatus* subsp. *striatus* (49.6%); il più alto in *T. vulgaris* subsp. *vulgaris* (concentrazione >90%).

La frazione ossigenata dei monoterpeni prevale, rispetto all'idrocarbura, in alcuni dei *taxa* studiati, quali: *T. praecox* subsp. *parvulus* (valore medio delle accessioni dei due anni 55.7%), *T. vulgaris* subsp. *vulgaris* (60.7%) e in tutte le accessioni di *T. spinulosus* (valore medio delle accessioni dei due anni 52.9%), eccetto che in un caso (accessione TS-FAVE del 2017), e in *T. striatus* subsp. *striatus* (38.3%). In *T. spinulosus* una più elevata concentrazione in monoterpeni ossigenati è stata riscontrata negli oli estratti dalle parti fiorali (62.2% vs 54.7%) rispetto a quelli delle corrispondenti parti vegetative (53% vs 46.2%).

La maggior parte delle accessioni di *T. longicaulis* subsp. *longicaulis* sono invece caratterizzate da una prevalenza della frazione idrocarbura dei monoterpeni (concentrazione >47.6%, <64.9%) rispetto all'ossigenata, eccetto che in pochi casi (accessioni TL-FAGO, TL-FAGO-INF, TL-PG e TL-3FIN).

I monoterpeni idrocarburi sono rappresentati da 6 composti predominanti: α -terpinene, *p*-cymene, limonene, γ -terpinene, α -pinene e il myrcene, con abbondanze relative alquanto differenti sia tra i diversi *taxa* sia tra accessioni del medesimo *taxon* (vedi cluster di seguito). Tra i monoterpeni ossigenati i componenti prevalenti sono 7: linalool, borneol, terpinen-4-ol,

timolo, carvacrolo e timol metil etere, caratterizzati da concentrazioni piuttosto diversificate. Differenze rilevanti, soprattutto in termini quantitativi, si osservano anche per tutti gli altri componenti minori.

I sesquiterpeni (ossigenati e idrocarburi) sono la classe numericamente più rappresentata (circa 90 componenti complessivamente) in 10 degli oli analizzati (TP-VENT, TP-TRAM; TP-CAMM, TP-CAMM-INF, TSP-3, TST-RUG, TR-MARE e TR-FARO), con una concentrazione media pari al 36.5%, e una prevalenza della frazione idrocarburica (21.9-30.3%) sull'ossigenata (4.8-24%). I componenti di questa classe più rappresentati, in termini di abbondanza relativa, sono: l'*E*-caryophyllene, il germacrene D, il β -bisabolene e l'*E*-nerolidol.

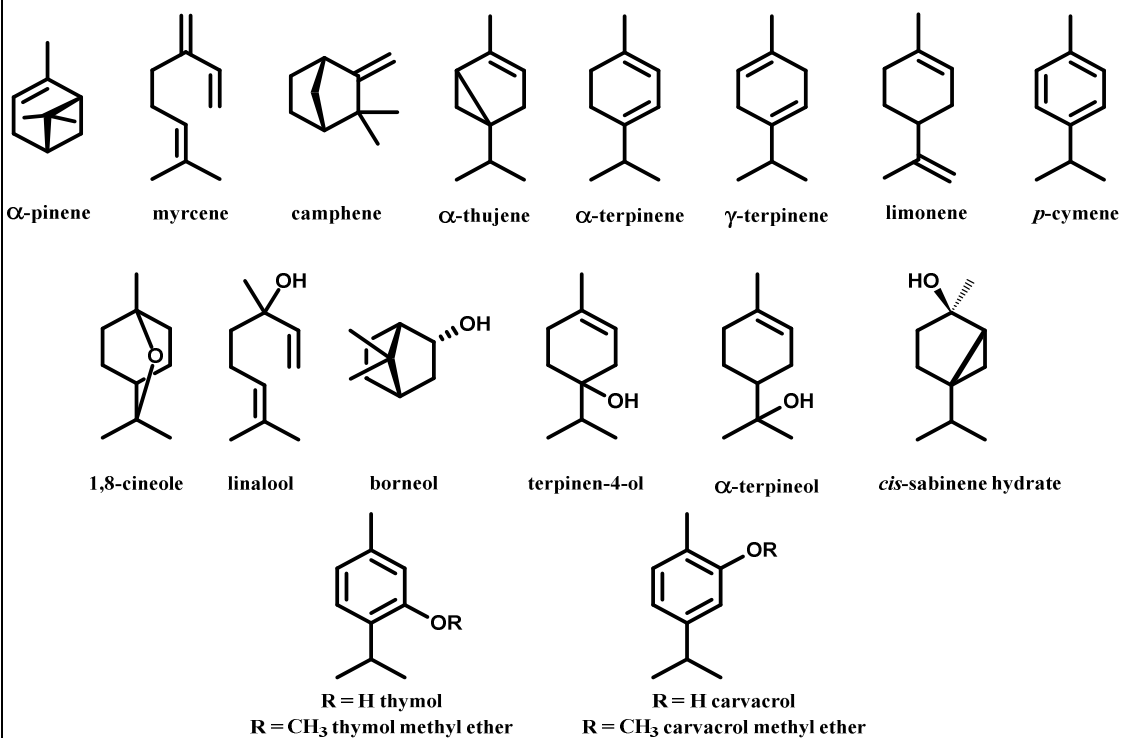
Nei restanti 33 oli essenziali caratterizzati (parti vegetative e fiorali), i sesquiterpeni non superano in media la soglia del 4.6%, rispetto alla composizione totale (valore medio intorno al 4% per la frazione idrocarburica, allo 0.6% l'ossigenata). Nello specifico, la più alta concentrazione di tali componenti è stata rilevata in TP-TRAM del 2016 (45%), la più bassa in TV-LIGU (1.9%) del 2017.

Per quanto riguarda i composti definiti come altri (OT), cioè non appartenenti alla categoria dei terpeni, sostanziali differenze si riscontrano tra i vari oli analizzati sia in termini qualitativi sia quantitativi. Tra i componenti della suddetta classe l'1-octen-3-ol e il 3-octanone hanno la più alta concentrazione (<2.9%), tutti gli altri composti non superano la soglia dell'1%.

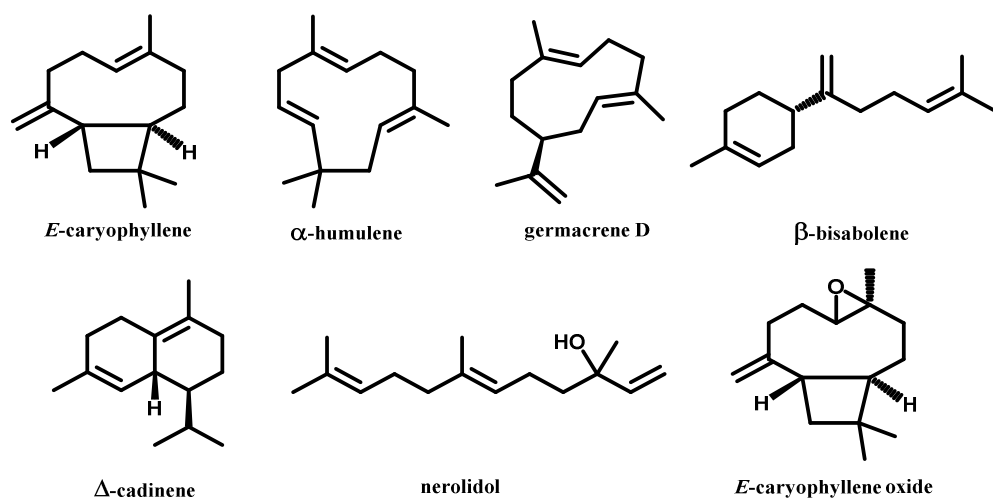
Infine, tra le diverse classi chimiche quella dei diterpeni (DI) è la meno rappresentata sia numericamente (2 composti in totale) sia quantitativamente (valore massimo dello 0.3%), rilevata in due oli del 2016 (TP-VENT e TP-TRAM) e in sei del 2017 (TST-RUG, TR-FARO, TR-MARE, TL-GAMB, TL-MUAL, TP-CAMM).

La Figura 5 riporta la struttura di alcuni componenti riscontrati negli oli di timo analizzati.

MONOTERPENI (IDROCARBURI ED OSSIGENATI)



SESQUITERPENI (IDROCARBURI ED OSSIGENATI)



ALTRI (COMPOSTI NON TERPENICI)

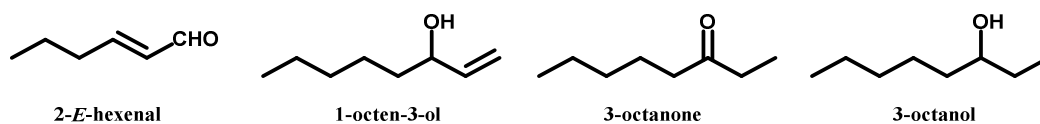


Figura 5. Esempi di composti chimici identificati negli oli essenziali dei *taxa* di *Thymus* analizzati, raggruppati per classi: monoterpene, sesquiterpene e composti non terpenici.

Tabella 3. Composizione chimica dettagliata degli oli essenziali estratti dalle accessioni campionate nel 2016. Il contenuto relativo è espresso come percentuale della composizione totale (v/v). RIEX: è l'indice di ritenzione sperimentale determinato in relazione al *t*R delle serie omologhe degli *n*-alcani (C8-C26) co-iniettati con gli oli essenziali analizzati, RIL: è l'indice di ritenzione riportato in letteratura, t: indica i composti presenti in tracce (<0,01%). Per ciascuna classe chimica sono riportati il numero di composti identificati e la percentuale relativa.

Composizione oli essenziali - accessioni 2016													
				TP-VENT	TP-TRAM	T-PRAEX	TL-LL	TL-PG	TL-3-FIN	TL-PINT	TS-LEO	TS-CAST	TS-FARO
Classe (MH) /Composti				%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
Monoterpeni idrocarburi (20)				44,86	46,58	36,9	54,13	45,89	38,87	64,92	37,9	42,49	39,73
#	RIEX	RIL	# componenti	17	17	16	16	14	13	16	10	15	14
4	929	927	Tricyclene	0,03	0,02	0,04	0,03			0,05		0,07	0,03
5	933	930	α -Thujene	0,30	0,15	1,69	1,29	1,41	0,21	1,93	0,84	1,98	2,68
6	942	939	α -Pinene	5,65	5,52	0,90	0,71	0,52	0,38	1,10	0,05	1,57	1,18
7	956	954	Camphene	0,99	0,85	1,03	1,03	0,36	0,42	1,49	0,77	1,99	0,92
8	958	960	Thuja-2,4(10)-diene			0,03	0,03			0,04		0,06	0,03
9	979	975	Sabinene	0,28	0,38	0,20	0,21	0,16	0,10	0,32	0,21	0,35	0,32
10	979	983	β -Pinene	1,27	0,35								
13	998	991	Myrcene	15,64	12,52	0,87	0,70	0,84	0,38	0,85	0,62	1,05	1,41
16	1009	1003	α -Phellandrene	0,07	0,09	0,21	0,22	0,25	0,12	0,27			0,12
17	1014	1004	<i>p</i> -Mentha-1(7)8 diene	t	t						0,06	0,08	
18	1016	1011	Δ -3-Carene	0,01	0,01	0,07	0,07	0,07	0,04	0,08			0,09
19	1023	1017	α -Terpinene	0,72	0,61	2,68	3,33	3,66	1,76	4,04	1,57	2,22	3,38
20	1032	1025	<i>p</i> -Cymene	1,07	0,63	12,23	21,95	10,98	16,58	26,09	24,94	20,82	14,38
21	1040	1029	Limonene	13,55	19,59	0,38	0,51	0,50	1,10	0,57	0,76	0,47	0,82
23	1042	1037	β -Z-Ocimene			0,04	0,06	0,02	0,02				
25	1054	1050	β -E-Ocimene	0,34	1,01	0,05	0,04	0,04		0,04		0,04	
26	1069	1060	γ -Terpinene	4,68	4,58	16,36	23,78	26,99	17,27	27,70	8,11	11,59	14,22
29	1087	1072	3,8- <i>p</i> -Menthadiene							0,03			
31	1093	1089	Terpinolene	0,25	0,27	0,15	0,19	0,11	0,48	0,32		0,21	0,14
36	1117	1110	1,3,8- <i>p</i> -Menthatriene	0,02	0,02							0,01	
Classe (MO) /Composti				%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
Monoterpeni ossigenati (49)				9,33	6,14	51,82	36,85	47,25	50,68	28,27	49,96	48,16	52,99
#	RIEX	RIL	# componenti	31	32	19	15	16	17	13	18	20	17
22	1038	1031	1,8-Cineole	0,03	0,07	0,51	0,15	0,04	0,88	0,18	0,81	0,83	0,1
27	1077	1070	<i>cis</i> -Sabinene hydrate	0,51	0,34	0,89	1,46	1,44	3,03	2,6	1,47	0,74	1,35
32	1094	1086	<i>trans</i> -Linalool oxide									0,01	0,03
33	1105	1097	Linalool	1,36	0,61	0,82	0,55	0,19	0,92	0,65	6,04	5,23	5,91
34	1108	1098	<i>trans</i> -Sabinene hydrate				0,05	0,03		0,03			0,05
37	1130	1122	<i>cis-p</i> -Menth-2-en-1-ol	0,12	0,09	0,05	0,05	0,02	0,15	0,09	0,05	0,04	0,02
38	1134	1126	α -Campholenal	0,02	0,03							0,01	
39	1145	1136	<i>cis</i> -Limonene oxide	0,04	0,05								
40	1146	1138	<i>trans-p</i> -Menth-2-en-1-ol	0,06	0,05								
41	1147	1139	<i>trans</i> -Pinocarveol			0,03					0,13		
42	1147	1141	<i>trans</i> -Limonene oxide	t	t								
43	1148	1142	<i>trans</i> -Sabinol									0,03	
44	1149	1143	<i>cis</i> -Sabinol									0,05	
45	1152	1146	Camphor	0,39	0,16	0,17			0,03		0,07	0,02	
46	1159	1148	<i>trans-p</i> -Necrodol	0,03	0,03								
47	1179	1160	Isoborneol			0,22							0,02
48	1161	1150	2-(1Z)-Propenyl-phenol	0,01	0,01								
49	1163	1159	Sabina ketone								0,01		
50	1164	1159	β -Pinene-oxide	0,16	0,12								
52	1174	1169	Borneol	0,51	0,49	2,09	3,52	1,11	6,36	3,98	3,67	4,71	1,45
53	1186	1177	Terpinen-4-ol	1,74	1,33	0,87	1,11	0,61	2,69	1,8	1,1	0,98	0,78
54	1192	1183	<i>p</i> -Cymen-8-ol	0,01	0,01	0,02	0,13		0,11	0,09	0,29	0,05	
55	1194	1189	<i>trans-p</i> -Mentha-1(7)8-dien-2-ol	0,01	0,01								
56	1197	1189	α -Terpineol	0,4	0,77	0,28	0,04	0,03	0,15	0,19	0,21	0,16	0,05
58	1197	1193	<i>cis</i> -Dihydrocarvone			0,03			0,18				
59	1210	1201	<i>trans</i> -Dihydrocarvone			0,01	0,04	0,06	0,07				0,15
61	1214	1208	<i>trans</i> -Piperidol	0,07	0,05								
61	1217	1217	<i>trans</i> -Carveol									0,01	0,01
62	1234	1229	<i>cis</i> -Carveol	0,01	0,03								
63	1232	1231	<i>cis-p</i> -Mentha-1(7)8-dien-2-ol	0,01	0,02							0,01	
64	1235	1229	Nerol	0,03	0,13								
65	1240	1235	Thymol methyl ether	0,01	0,03	5,16	4,82	3,59	2,08	1,69	9,99	8,6	4,79
66	1248	1238	Neral	0,24	0,31								
67	1250	1245	Carvacrol methyl ether	t		0,71	0,15	0,04	1,05	0,66	0,13	0,01	0,04
69	1251	1243	Carvone	0,01	0,02								0,02
70	1263	1252	Thymoquinone					0,01			0,13		
71	1263	1253	Geraniol		0,02								
74	1263	1265	<i>cis</i> -Chrysantenyl acetate									0,05	
75	1276	1267	Geranial	0,41	0,52						0,12		
77	1290	1290	<i>p</i> -Cymen-7-ol						0,1		0,11		
78	1291	1289	Bornyl acetate	0,07	0,06								
79	1296	1291	Thymol	0,07	0,39	37,95	23,58	38,14	31,42	15,68	23,48	24,7	36,13
80	1306	1299	Carvacrol	0,03	0,1	1,67	1,14	1,78	1,4	0,64	2,16	1,93	2,11
85	1355	1342	<i>trans</i> -Carvyl acetate	2,93	0,24								
85	1360	1352	Thymol acetate			0,34	0,05	0,13	0,08				
88	1369	1362	Neryl acetate	0,06	0,07								
89	1377	1368	<i>cis</i> -Carvyl acetate		0,01								
90	1377	1373	Carvacrol acetate			0,02							
123	1562	1555	Thymohydroquinone					0,02					

				TP-VENT	TP-TRAM	T-PRAEX	TL-LL	TL-PG	TL-3-FIN	TL-PINT	TS-LEO	TS-CAST	TS-FARO
Classe (SE) /Composti				%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
Sequiterpeni (65)				42,12	45,09	5,10	3,55	3,16	4,60	2,62	6,46	4,74	4,05
#	RIEX	RI L	# componenti	56	56	18	7	11	11	8	13	14	11
86	1361	1351	α -Cubebene	0,01	0,01								
91	1381	1375	α -Ylangene	0,07	0,02							0,04	
92	1384	1377	α -Copaene	0,11	0,13								
83	1385	1388	Δ -elemene	0,01	0,01								
93	1394	1388	β -Bourbonene	1,17	1,57	0,02			0,03		0,05	0,05	0,01
94	1398	1388	α -Isocomene			0,03					0,1	0,01	
95	1399	1391	β -Elemene	0,21	0,3								
97	1419	1409	Z-Caryophyllene	0,01	0,06							0,01	
98	1420	1409	α -Gurujene	0,02	0,02								
99	1434	1419	E-Caryophyllene	5,82	10,5	2,14	2,25	1,83	2,89	1,58	2,54	2,06	1,86
100	1440	1432	β -Copaene									0,05	0,02
101	1442	1434	trans- α -Bergamotene						0,02				0,01
102	1444	1434	β -Gurujene	0,28	0,33	0,04							
103	1455	1441	Aromadendrene	0,03	0,04								
104	1463	1443	β -Z-Farnesene	0,03	0,04	0,04	0,04	0,04					
105	1464	1450	cis-Muurolo-3,5-diene	0,17	0,15								
106	1467	1456	β -E-Farnesene	2,28	3,09								
107	1472	1455	α -Humulene	0,6	0,3	0,08	0,2	0,12	0,29	0,13	0,08	0,08	0,08
108	1473	1460	Alloaromadendrene	0,07	0,11								
109	1474	1466	9-epi-E-Caryophyllene			0,02							
110	1497	1480	γ -Muurolole	t	0,01	0,02		0,02					
111	1500	1485	Germacrene D	10,35	14,9	0,31	0,22	0,07	0,16	0,12	0,39	0,27	0,28
113	1506	1494	epi-Cubebol	0,01	0,04								
115	1508	1500	Bicyclogermacrene	0,92	0,5	0,67	0,07	0,3	0,01	0,22			
115	1517	1506	β -Bisabolene	0,38	1,33	1	0,48	0,49	0,66	0,35	1,64	1,25	1,52
116	1526	1509	Germacrene A		t								
117	1526	1514	γ -Cadinene	1	0,13	0,01							0,02
118	1534	1523	Δ -Cadinene	1,39	1,19				0,01				0,02
119	1530	1523	β -Sesquiphellandrene			0,06		0,05	0,03		0,04	0,03	0,05
120	1539	1535	10-epi-Cubebol	0,03	0,06								
121	1549	1535	trans-Cadina-1,4-diene	0,03	0,01								
122	1554	1539	α -Cadinene	0,32	0,08								
124	1562	1550	Elemol	1,34	0,3								
125	1566	1554	cis-Cadinene ether	0,03	0,05								
126	1576	1563	E-Nerolidol	3,91	1,68								
127	1580	1578	Spathulenol	0,04	0,06	0,26		0,08	0,03	0,06			
128	1598	1583	Caryophyllene oxide	1,14	1,57	0,35	0,3		0,46	0,13	1,32	0,75	0,21
129	1590	1585	Globulol	1,04	0,42	0,01		0,15		0,03	0,03		
130	1593	1585	Copaen-4- α -ol	0,12	0,06								
131	1606	1595	Salvia-4(14)-en-1-one	0,16	0,13								
132	1617	1601	Guaiol	0,18	0,22								
133	1622	1608	β -Oplepenone	0,05	0,23								
134	1614	1608	β -Atlantol			0,03					0,09	0,05	
141	1628	1629	1,10-di-epi-Cubebol	0,28	0,01								
137	1646	1632	γ -Eudesmol		0,03								
138	1642	1636	cis-Cadin-4-en-7-ol	0,13	0,06								
139	1648	1640	Caryophylla-4(12)18(13)-dien-5- α -ol	0,01	0,13						0,09	0,05	
140	1652	1640	Caryophylla-4(12)18(13)-dien-5- β -ol	t	0,22								
141	1649	1641	epoxy-Alloaromadendrene					0,02			0,03		
142	1657	1640	epi- α -Cadinol	t	t								
143	1657	1642	epi- α -Muurolol	3,04	0,35								
144	1661	1646	α -Muurolol	0,08	0,14								
145	1667	1654	α -Eudesmol	0,13	0,02								
146	1671	1654	α -Cadinol	1,96	0,93								
147	1673	1669	14-hydroxy-9-epi-Caryophyllene	t	0,02	0,03					0,06	0,03	
148	1677	1660	neo-Intermedol	0,02									
149	1681	1685	neo-5-Cedranol	0,4	0,36								
150	1686	1686	Germacre-4(15)5,10(14)-trien-1- α -ol	0,21	0,17								
151	1697	1686	α -Bisabolol	0,12	0,24								
152	1704	1688	Eudesma-4(15)-7-dien-1- β -ol	0,51	0,48								
153	1710	1700	Eudesma-7(11)-en-4-ol	1,81	2,24								
154	1718	1700	Amorpha-4,9 dien-2-ol	0,06	0,05								
155	1743	1743	Cedr-8-(15)en-9- α -ol-acetate	0,02	0,04								
156	1755	1741	Mint sulfide	0,01	0,02								
157	1770	1780	14-hydroxy- α -Muurolole	0,02	0,01								

				TP-VENT	TP-TRAM	T-PRAEX	TL-LL	TL-PG	TL-3-FIN	TL-PINT	TS-LEO	TS-CAST	TS-FARO
Classe (DI) /Composti				%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
Diterpeni (2)				0,26	0,15								
#	RIEX	RI L	# componenti	2	1								
160	1968	1960	(Z,Z)-Geranyl linalool	0,23	0,15								
161	2035	2026	(E,E)-Geranyl linalool	0,03									
Classe (OT) /Composti				%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
Altri (28)				1,87	1,19	5,26	5,31	3,46	5,10	4,16	3,70	3,25	2,52
#	RIEX	RI L	# componenti	22	19	9	6	6	7	7	7	13	8
1	825	828	Methyl pentanoate			0,06			0,03	0,03		0,05	0,09
2	860	855	2E-Hexenal	0,03	t	0,07	0,03	0,02		0,03		0,02	
3	907	902	Heptanal	0,01	t								
11	983	979	1-Octen-3-ol	0,35	0,17	2,28	2,64	2,14	2,76	2,36	2,35	2,05	1,86
12	991	984	3-Octanone	0,03	0,04	2,21	2,09	0,95	1,93	1,38	0,25	0,22	0,27
14	1000	991	3-Octanol	0,04	0,05	0,49	0,48	0,18	0,25	0,22	0,16	0,16	0,11
15	1007	999	Octanal	0,12	0,09						0,5	0,42	0,09
23	1044	1042	Benzene acetaldehyde	t	t	0,02			0,03			0,01	0,01
28	1077	1068	n-Octanol								0,19	0,09	0,06
35	1108	1101	Nonanal	0,26	0,26	0,07			0,08				
51	1169	1162	2E-Nonenal	0,02	0,02								
57	1199	1192	Methyl salicilate	0,02	0,03								
60	1209	1202	Decanal	0,24	0,23		0,03				0,23	0,11	
68	1254	1242	Cumin aldehyde			0,03					0,03		0,03
72	1250	1253	Z-Anethole									0,07	
73	1267	1264	2E-Decenal	0,03	0,03								
76	1279	1270	n-Decanol									0,02	
81	1312	1307	Undecanal	0,03	0,02								
82	1319	1309	p-Vinylguaioi	0,02	0,02								
87	1365	1359	Eugenol	0,05	0,06	0,02	0,04	0,04	0,02	0,04		0,01	
97	1407	1409	Dodecanal	0,02	0,05								
112	1497	1489	Butylated hydroxy anisole							0,12		0,04	
135	1635	1621	Dillapiole	0,5	0,11			0,13					
158	1837	1800	Octadecane	0,06	0,02								
159	1875	1900	Nonadecane	t	0,01								
162	2138	2100	Heicosane	0,02									
163	2253	2200	Docosane	0,01									
164	2312	2300	Tricosane	0,03									
				%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
Totale componenti				98,44	99,15	99,08	99,84	99,76	99,25	99,97	98,02	98,64	99,29
# Componenti (164)				128	125	62	44	47	48	44	48	62	50

Tabella 4. Composizione chimica dettagliata degli oli essenziali estratti dalle accessioni campionate nel 2017. Il contenuto relativo è espresso come percentuale della composizione totale (v/v). RIEX: è l'indice di ritenzione sperimentale determinato in relazione al *t_R* delle serie omologhe degli *n*-alcani (C8-C26) co-iniettati con gli oli essenziali analizzati. RIL: è l'indice di ritenzione riportato in letteratura, t: indica i composti presenti in tracce (< 0,01%). Per ciascuna classe chimica sono riportati il numero di composti identificati e la percentuale relativa.

Composizione oli essenziali - accessioni 2017																																				
			TL-GAMB	TL-MUAL	TL-PINT	TL-FAGO	TL-FG-INF	TL-ALLA	TL-CASS	TL-ZOMA	T-PRAEX	TP-TRAM	TP-VENT	TST-RUG	TP-CAMM	TP-CAMM-INF	TSP-3	TS-CAMM	TS-LAUR	TS-ROSE	TS-RO-INF	TS-FARO	TS-QUAC	TS-QINF	TS-CAST	TS-CA-INF	TS-SNIC	TS-SN-INF	TS-ELIA	TS-EL-INF	TS-FV-INF	TS-FAVE	TR-FARO	TR-MARE	TV-LIGU	
Classe (MH) / Composti			%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	
Monoterpeni idrocarburi (20)			48,68	47,56	48,58	32,76	27,83	49,95	48,23	52,71	30,65	42,72	57,27	11,27	37,62	34,34	23,47	43,27	38,72	39,01	32,26	33,55	40,99	32,58	42,75	35,59	44,71	38,36	41,03	32,45	38,96	48,67	38,27	43,10	34,81	
#	RI EX	RIL # componenti	15	16	16	16	15	16	15	16	15	15	15	14	15	13	16	16	15	15	15	15	17	17	17	16	16	16	16	17	15	16	17	17	16	
4	913	927	Tricyclene	0,06	0,04	0,04	0,06	0,04	0,06	0,05	0,07	0,03	0,02	0,04	0,05	0,04	0,02	0,03	0,08	0,06	0,05	0,03	0,06	0,05	0,03	0,07	0,03	0,05	1,81	0,04	0,02		0,07	t	t	0,06
5	915	930	α-Thujene	1,74	1,82	1,82	1,45	1,52	1,86	1,78	1,86	1,39	0,24	0,46	0,29	0,37	0,34	0,19	1,88	1,69	1,73	1,66	1,92	2,01	1,67	1,50	1,37	1,83	0,87	1,52	1,51	1,31	1,58	0,62	0,61	1,18
6	922	939	α-Pinene	1,03	0,89	0,89	1,61	1,22	1,05	0,94	1,23	0,75	4,95	9,34	0,80	4,51	5,02	1,85	1,54	1,43	1,27	0,77	1,28	1,27	0,76	1,47	0,87	1,19	0,03	1,09	0,70	0,58	1,34	1,07	1,27	1,11
7	934	960	Thuja-2,4(10)-diene	0,02	0,02	0,02	0,02		0,02		0,05	0,03						0,06		0,04	0,02	0,03	0,04	0,02	0,09	0,04	0,11	0,71	0,06	0,02	0,02	0,06	t	0,03	0,03	
8	938	954	Camphene	1,44	1,03	0,95	1,53	0,91	1,37	1,21	1,72	0,90	0,76	1,30	1,50	1,22	0,75	0,92	1,93	1,62	1,28	0,63	1,42	1,34	0,68	1,97	0,91	1,25	0,15	1,14	0,41	0,41	1,64	0,07	0,11	1,48
9	963	975	Sabinene	0,26	0,22	0,22	0,82	0,59	0,17	0,14	0,27	0,16	0,43	0,38	0,20	0,42	0,42	0,32	0,19	0,32	0,25	0,09	0,25	0,31	0,20	0,22	0,11	0,21	0,22	0,15	0,05	0,11	0,27	0,11	0,11	0,05
10	967	979	β-Pinene			0,16	0,90	0,74					0,96	0,55	0,17	0,46	0,71	0,39																		
13	980	991	Myrcene	0,75	0,95	0,94	1,29	1,40	0,88	0,91	0,85	0,82	14,91	21,20	1,34	10,19	9,31	9,33	0,87	1,27	1,00	0,99	1,08	1,11	1,00	0,87	0,91	0,84	1,05	1,05	1,29	1,18	1,12	0,75	0,83	1,31
17	994	1002	α-Phellandrene	0,24	0,26	0,26	0,18	0,22	0,26	0,26	0,24	0,19	0,08	0,26		0,10	0,13	0,03	0,13	0,19	0,15	0,25	0,15	0,17	0,20	0,13	0,18	0,13	0,31	0,19	0,24	0,24	0,22	0,11	0,10	0,16
19	1000	1004	p-Mentha-1(7)8 diene								0,06																									
20	1000	1011	Δ-3-Carene	0,07	0,07	0,07	0,06	0,06	0,08	0,07	0,07							0,07	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07	0,06	0,06	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,04	0,03	0,07
21	1007	1017	α-Terpinene	3,45	3,81	4,00	2,04	2,33	3,94	3,96	3,78	2,63	0,67	1,48	0,43	1,08	0,99	0,59	2,10	3,05	2,11	2,65	2,51	2,70	2,86	1,77	2,49	1,91	3,46	1,96	2,69	3,00	2,33	0,76	0,76	1,48
22	1018	1025	p-Cymene	15,66	10,83	10,12	7,88	5,01	13,79	10,77	17,61	8,77	t	1,02	1,51	1,44		0,49	22,30	12,07	16,74	10,73	12,61	15,29	10,07	22,44	12,67	26,23	11,31	18,19	8,72	10,00	19,78	14,71	17,50	15,75
23	1021	1029	Limonene	0,59	0,53	0,56	0,49	0,46	0,60	0,56	0,69	0,45	15,89	14,11	0,59	10,25	10,66	5,39	2,08	1,08	1,78	0,67	1,22	1,10	0,58	1,45	0,56	0,93	0,65	1,60	0,68	0,60	1,77	13,08	14,42	1,35
24	1027	1029	β-Phellandrene					0,09																												
26	1029	1037	β-Z-Ocimene	0,02	0,04	0,05		0,05	0,02	0,02	0,04			0,07	0,13	1,04	0,05	0,03	0,05	0,03	0,04	0,05	0,05	0,05	0,03	0,05	0,03	0,05	0,05	0,04	0,06	0,06		t	0,04	0,04
28	1041	1050	β-E-Ocimene		0,05		0,21	0,41		0,05	0,01		0,43	0,24	0,35	1,17	0,35																0,02			
29	1056	1060	γ-Terpinene	23,15	26,84	28,28	14,02	12,77	25,53	27,36	23,81	14,29	3,15	6,43	3,87	5,88	4,68	3,27	9,86	15,49	12,32	13,53	10,77	15,23	14,19	10,33	15,18	9,69	17,49	13,75	15,82	21,23	18,23	6,86	7,08	10,57
35	1081	1089	Terpinolene	0,21	0,17	0,21	0,20	0,17	0,21	0,17	0,42	0,14	0,23	0,47	0,11	0,34	0,27	0,25	0,14	0,23	0,19	0,14	0,14	0,24	0,16	0,26	0,17	0,24	0,18	0,16	0,16	0,16	0,20	0,10	0,19	0,16
38	1103	1110	1,3,8-p-Menthatriene									t	t				0,03	0,03	0,09				0,02	0,04	0,09					0,02			t	t		

			TL-GAMB	TL-MUAL	TL-PINT	TL-FAGO	TL-FG-INF	TL-ALLA	TL-CASS	TL-ZOMA	T-PRAEX	TP-TRAM	TP-AVENT	TST-RUG	TP-CAMM	TP-CAMM-INF	TSP-3	TS-CAMM	TS-LAUR	TS-ROSE	TS-RO-INF	TS-FARO	TS-QUAC	TS-QINF	TS-CAST	TS-CA-INF	TSSNIC	TS-SN-INF	TS-ELIA	TS-EL-INF	TS-FV-INF	TS-FAVE	TR-FARO	TR-MARE	TV-LIGU	
Classe (MO) / Composti			%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	
Monoterpeni ossigenati (61)			41,98	44,95	42,75	56,04	63,62	42,19	43,37	40,21	59,66	11,41	13,29	38,30	24,46	25,29	36,63	47,25	53,55	51,71	61,45	56,36	50,37	59,64	48,33	58,02	46,16	55,24	51,47	62,20	54,70	43,91	25,19	25,50	60,72	
#	RI EX	RI L	# componenti	15	14	16	16	17	17	14	16	18	27	28	22	30	30	26	22	21	19	19	16	21	18	20	20	23	20	19	17	16	23	31	33	22
25	1024	1031	1,8-Cineole	0,15	0,07	0,12	8,47	7,10	0,02	0,02	0,38	0,52	t	1,22	0,40	1,78	0,07	1,33	0,02	0,64	0,10	0,07	0,06	0,11	0,06	1,10	0,82	0,72	0,53	1,01	0,69	0,85	1,65	0,12	t	1,57
30	1062	1070	cis-Sabinene hydrate	1,55	0,87	1,14	0,74	0,56	0,26	0,64	0,33	0,53	1,27	0,38	0,04	1,38	1,86	0,97	1,04	1,69	1,07	0,38	1,28	1,32	0,26	0,21	0,28	0,73	0,41	0,53	0,26	0,17	0,52	0,59	0,50	1,16
32	1066	1072	cis-Linalool oxide															0,03	0,13		0,16	0,02		0,27	0,08	0,10	0,10	0,14	0,03	0,05		0,04	t	t	0,02	
33	1067	1086	trans-Linalool oxide																							0,04										
36	1092	1097	Linalool	0,40	0,31	0,48	4,62	2,28	0,38	0,32	0,38	0,83	0,90	3,20	0,86	2,23	1,92	1,00	8,95	7,65	7,57	4,99	6,81	5,95	4,28	5,05	3,95	5,95	4,43	7,25	3,79	3,92	8,12	4,10	4,63	1,01
41	1115	1098	trans-Sabinene hydrate																								t	0,06		0,85	0,03	0,03				0,08
42	1117	1122	cis-p-Menth-2-en-1-ol	0,06	0,04	0,06	0,05	0,02	0,07	0,04	0,12	0,04	0,12	0,22		0,16	0,13	0,09		0,02		0,03		0,11	0,04	0,08	0,04	0,08	0,04	0,06	0,03	0,02	0,05	0,14	0,07	
43	1117	1122	cis-p-Mentha-2,8-dien-1-ol																								t						0,08	t	t	0,05
44	1126	1126	α-Campholenal										t	0,02																			t	t	0,02	
45	1131	1142	trans-Pinocarveol				0,04	0,24				0,03														0,09	0,04	0,08	0,04	0,05	0,04		0,45	0,06	0,06	0,09
46	1133	1136	cis-Limonene oxide													0,04	0,02																0,08	0,28	0,28	
47	1134	1146	Camphor	t			0,76	0,18	0,04		0,03	0,16	0,26	0,36	0,48	0,63	0,35	1,00	0,05	0,03	0,03			0,02		0,02		0,03		0,31	0,06	0,11	0,15	0,07	0,08	0,05
48	1137	1142	trans-Sabinol																																	
49	1138	1138	trans-p-Menth-2-en-1-ol	0,04	0,03	0,04		0,02	0,05	0,02	0,10	0,22	0,07	0,12		0,07	0,06	0,04	0,03	0,05					0,05				0,04		0,04	0,14	t			
50	1144	1138	trans-p-Necrodol										0,03	0,03		0,03																				
52	1149	1164	cis-Chrysanthanol						0,02																											
53	1154	1159	β-Pinene-oxide										0,14	0,22		0,02	0,05	0,06						0,03		0,02									0,04	
54	1162	1160	Isoborneol												0,02			0,10	0,02									0,10				0,07				
55	1165	1169	Borneol	3,99	2,72	2,91	3,04	2,11	3,75	3,18	5,53	2,59	0,41	0,66	1,14	0,80	0,58	0,21	2,90	4,69	1,47	1,03	1,79	3,02	1,64	5,38	3,57	2,77	2,09	2,87	1,13	1,43	3,92	0,22	0,24	3,93
58	1174	1177	Terpinen-4-ol	1,19	0,98	1,48	1,03	0,58	1,64	0,89	2,88	1,08	1,69	3,98	0,33	2,47	1,83	0,03	0,94	1,63	1,44	0,95	1,25	1,78	1,10	1,34	1,17	1,35	1,13	1,09	0,91	1,13	1,46	0,66	1,08	1,20
60	1182	1183	iso-Menthol										0,02																							
62	1183	1189	trans-p-Mentha-1(7),8-dien-2-ol																															t	0,03	
63	1187	1187	neois-Menthol									0,16																								
64	1191	1189	α-Terpineol	0,02	0,04	0,05	0,75	0,51	0,08	0,06	0,25	0,33	0,98	0,50	1,23	0,54	0,40	1,48	0,08	0,16	0,16	0,09	0,17	0,19	0,09	0,15	0,15	0,15	0,11	0,22	0,13	0,13	0,19	0,13	0,21	0,18
65	1193	1183	p-Cymen-8-ol	0,03	0,04	0,02		0,27			0,10				0,03			0,11	0,21	0,09	0,09	0,12	0,04	0,05	0,10	0,10	0,20	0,04	0,21	0,06	0,17	0,06	0,17	0,04	0,11	0,13
66	1194	1195	cis-Piperidol										0,03	0,04		0,03	0,03	0,51															0,06	0,05		
68	1197	1192	cis-Dihydrocarvone			0,02	0,03	0,05	0,02	0,06		0,09							0,16			0,03		0,04	0,10						0,05			0,33	0,24	0,12
70	1209	1219	β-Cyclocitral												0,02																					
71	1211	1198	Shizofuran*																								0,13	0,12								
72	1216	1208	trans-Piperidol			0,02	0,03		0,02				0,06	0,11		0,10	0,02	0,12		0,03	0,03	0,04											t	0,02	0,02	
73	1216	1201	trans-Dihydrocarvone								0,06							0,03	0,03	0,04					0,16	0,02	0,03	0,03	0,04				2,40	1,30	0,07	
74	1216	1216	trans-Carveol											0,06																			0,34	0,32	0,03	
75	1220	1214	iso-Dihydrocarveol*										0,25	t		0,15	0,34	0,84														0,08	t			
76	1227	1228	neois-Dihydrocarveol*										0,56	0,19		0,64	0,27	2,59																		
77	1230	1229	cis-Carveol							0,01																										
78	1230	1230	Nerol												0,76	0,17																			0,02	
79	1233	1235	Thymol methyl ether	3,32	2,20	1,18	2,75	2,03	3,01	3,42	2,61	5,20			0,96	0,49	1,68		9,99	5,06	9,84	6,58	6,32	5,16	5,51	9,51	7,05	9,90	7,11	1,27	0,64	0,58	1,23	0,07	0,22	
80	1236	1231	cis-p-Mentha-1(7)8-dien-2-ol										t	0,02			0,01																		0,04	
81	1239	1238	Neral										0,25	0,33	0,22	0,38	0,57	0,35	0,02			0,05	0,03	0,06						0,03						
82	1242	1245	Carvacrol methyl ether	0,03	0,36	0,42	0,36	0,43	0,02	0,02		0,92			t	t			0,10	0,04	0,12	0,14	0,06	0,05	0,05	0,11	0,06	0,12	0,07	1,08	1,09	0,91	0,80	6,68	8,19	
83	1253	1257	Linalool acetate										0,05		2,47																			0,46		
84	1255	1243	Carvone										0,02														0,14	0,11		0,03			t	0,05		
85	1255	1253	Geraniol																								0,03	0,02	0,02				0,02			0,12
87	1262	1253	Thymoquinone																																	
88	1269	1267	Geraniol										0,37	0,40	0,24	0,58	0,85	0,42	0,26	0,17	0,04	0,04	0,22	0,13	0,16		0,02	0,05				0,07	t	t		
89	1262	1242	Cumin aldehyde																	0,02	0,04		0,03	0,02	0,03	0,03	0,02	0,05				0,06				
90	1274	1271	Perilla aldehyde																															t	0,09	
93	1284	1289	Bornyl acetate										0,04	0,03	0,22	0,06	0,02	0,05																		
94	1285	1291	p-Cymen-7-ol																																	
95	1294	1289	Limonen-10-ol																																	

			TL-GAMB	TL-MUAL	TL-PINT	TL-FAGO	TL-FG-INF	TL-ALLA	TL-CASS	TL-ZOMA	T-PRAEX	TP-TRAM	TP-VENT	TST-RUG	TP-CAMM	TP-CAMM-INF	TSP-3	TS-CAMM	TS-LAUR	TS-ROSE	TS-RO-INF	TS-FARO	TS-QUAC	TS-QINF	TS-CAST	TS-CA-INF	TS-SNIC	TS-SN-INF	TS-ELIA	TS-EL-INF	TS-FV-INF	TS-FAVE	TR-FARO	TR-MARE	TV-LIGU	
#	Classe (SE) /Composti			%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	
Sesquiterpeni idrocarburi (37)				4,08	3,44	2,80	5,35	5,21	3,64	3,43	2,67	3,93	30,30	20,67	15,23	25,99	27,20	24,00	5,17	4,13	5,56	4,61	5,83	4,98	5,91	3,87	4,27	4,16	4,82	3,33	3,28	4,45	3,86	25,85	21,88	1,31
	RI EX	RI L	# componenti	7	6	6	7	7	5	8	7	11	19	18	16	24	20	24	9	9	8	11	8	8	9	8	9	9	10	8	10	7	9	17	18	8
109	1380	1376	α -Copaene										0,12	0,09		0,10		0,06				0,03	0,06										0,05	0,06		
111	1395	1388	β -Bourbonene									0,02	1,32	0,90	0,20	1,00	0,54	0,58	0,05	0,06	0,05	0,02		0,03	0,02	0,05	0,03	0,05	0,03	0,04		0,02	0,56	0,69		
112	1395	1390	β -Elemene										0,44	0,19		0,27	0,38	0,21															0,33	0,13		
114	1404	1405	Italicene*													0,11	0,03	0,39																		
116	1414	1409	Z-Caryophyllene												0,09		0,03	0,04										0,02				0,02	t	t		
117	1420	1411	α -Cedrene*													0,04																				
118	1422	1434	trans- α -Bergamotene				0,02									0,04		0,03						0,02										0,17	0,12	
119	1426	1419	E-Caryophyllene	2,79	2,24	1,73	2,34	2,54	2,52	2,42	1,50	1,78	8,33	6,39	8,01	8,43	9,72	10,43	2,87	2,46	2,97	3,31	3,20	2,64	4,08	2,26	3,13	2,39	3,54	2,75	2,70	3,88	3,33	1,99	1,70	1,01
120	1435	1432	β -Copaene							0,01	0,01	0,03	0,28	0,23	0,16	0,26	0,15	0,22	0,06	0,04	0,04	0,03	0,05	0,04	0,03	0,02		0,02	0,03	0,03	0,02	0,02	0,02	0,16	0,04	
121	1438	1433	β -Gurujene												0,06																					
122	1441	1441	Aromadendrene										0,03	0,03	0,02		0,06																			
124	1446	1440	α -Guaiane									0,04																								
125	1446	1443	β -Z-Farnesene					0,03					0,03	0,03	1,43	0,02	1,13	0,03															0,07	0,05		
127	1452	1450	cis-Muurolo-3,5-diene										0,11	0,13				0,06																		
128	1453	1453	trans-Muurolo-4(14),5-diene													0,11																				
129	1459	1456	β -E-Farnesene										1,17	1,64		2,63	0,68	2,20															0,11	0,11		
130	1460	1455	α -Humulene	0,27	0,24	0,18	0,11	0,20	0,25	0,24	0,16	0,14			0,05				0,11	0,10	0,12	0,12	0,14	0,12	0,16	0,08	0,11	0,09	0,12	0,11	0,10	0,14	0,12	0,20	0,20	0,03
131	1468	1460	Alloaromadendrene	0,02									0,18	0,30	0,06	0,52	0,41	0,60															0,42	0,42		
132	1473	1466	cis-Muurolo-4(14),5-diene															0,03																		
133	1474	1463	cis-Cadima-1(6),4-diene												0,11												0,05									
134	1477	1466	9- <i>epi</i> -E-Caryophyllene										0,09	0,07		0,07	0,04											0,27								
135	1482	1480	γ -Muurolole							0,02		0,03	0,02	0,06		0,10	0,03	0,11	0,03	0,02		0,05			0,02		0,27		0,04	0,04	0,07	0,04		0,07	0,09	0,01
136	1487	1481	Germacrene D	0,22	0,08	0,13	0,07	0,10	0,23	0,25	0,17	0,27	14,58	8,17	2,76	8,89	11,28	5,51	0,38	0,57	0,40	0,26	0,51	0,26	0,48	0,22	0,04	0,18	0,30	0,26	0,13	0,28	0,25	3,76	2,96	0,02
139	1500	1490	β -Selinene																																	
141	1503	1495	γ -Amorphene													0,06		0,02					0,03												0,02	
142	1504	1500	trans-Muurolo-4(14),5-diene													0,07		0,16																		
143	1504	1500	Bicyclogermacrene	0,35	0,19	0,23	0,26	0,13			0,06	0,50	0,62	0,65	0,98	0,13	0,36	0,08															0,04			0,11
144	1508	1500	α -Muurolole													0,21	0,16	0,23																		
145	1513	1506	β -Bisabolene	0,39	0,65	0,50	2,49	2,16	0,60	0,38	0,75	1,02	1,11	0,29	0,87	0,83		0,54	1,57	0,79	1,90	0,66	1,78	1,82	1,05	1,18	0,52	1,36	0,63	0,03	0,03		16,39	13,47	0,08	
146	1518	1512	δ -Amorphene														0,40																			
148	1521	1514	γ -Cadinene						0,02			0,03	0,23	0,51	0,07	0,33	0,25	0,38	0,02	0,02		0,04	0,02		0,02		0,04		0,03		0,05	0,02	0,05	0,67	0,76	0,01
150	1530	1522	β -Sesquiphellandrene	0,05	0,04	0,03	0,06	0,07			0,03		0,10			0,04						0,05		0,05		0,02		0,01								
151	1532	1523	Δ -Cadinene						0,04	0,09		0,08	1,42	0,98	0,34	1,73	1,47	2,02	0,07	0,06		0,09	0,08		0,06	0,04	0,08	0,05	0,07	0,08	0,13	0,07	0,02	0,75	0,86	0,03
153	1540	1535	trans-Cadima-1,4-diene												0,04	t	0,14*	0,04																		
154	1547	1533	γ -Cuprenene										0,13	0,02																						
155	1548	1538	α -Cadinene													0,04	0,09	0,03																		
156	1549	1531	γ -iso-E-Bisabolene*																	0,04																

			TL-GAMB	TL-MUAL	TL-PINT	TL-FAGO	TL-FG-INF	TL-ALLA	TL-CASS	TL-ZOMA	T-PRAEX	TP-TRAM	TP-VENT	TST-RUG	TP-CAMM	TP-CAMM-INF	TSP-3	TS-CAMM	TS-LAUR	TS-ROSE	TS-RO-INF	TS-FARO	TS-QUAC	TS-QINF	TS-CAST	TS-CA-INF	TS-SNIC	TS-SN-INF	TS-ELIA	TS-EL-INF	TS-FV-INF	TS-FAVE	TR-FARO	TR-MARE	TV-LIGU	
#	Classe (SO) /Composti		%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%		
	Sesquiterpeni ossigenati (53)		0,40	0,27	0,19	0,33	0,14	0,20	0,19	0,31	0,40	11,35	4,78	24,04	9,41	10,66	13,38	1,37	0,69	0,90	0,27	0,95	0,69	0,41	1,27	0,42	1,60	0,36	1,13	0,23	0,21	0,69	6,89	6,02	0,55	
	RI EX	RIL # componenti	4	2	2	4	2	1	1	3	2	26	22	22	23	26	21	6	5	5	2	5	3	3	5	3	8	2	6	1	1	4	15	15	3	
140	1502	1494 epi-Cubebol										0,08																								
147	1521	1516 Sesquicineole																					0,02													
149	1523	1520 endo-Bourbonanol																																		
152	1535	1533 1-10- <i>epi</i> -Cubebol										0,11	0,04		t		0,11	0,20																		
157	1550	1550 Elemol										0,79	0,23	0,36		0,22																				
158	1550	1548 Hedycaryl												0,04	0,07																					
159	1553	1563 <i>E</i> -Nerolidol										0,46	1,10	16,57	2,25	1,73	4,54																			
161	1565	1575 Germacrene D-4-ol										0,54	0,35	0,19	1,14	1,87	1,62															0,65	0,41			
162	1568	1578 Spathulenol	0,09	0,04	0,05	0,05	0,04			0,02	0,17	0,12	0,05	0,50													0,02				0,01			0,16		
163	1573	1583 Caryophyllene oxide	0,26	0,22	0,14	0,23	0,11	0,20	0,19	0,27	0,23	0,94	0,40	2,32	0,85	0,56	0,86	1,05	0,55	0,75	0,25	0,83	0,64	0,37	1,07	0,37	1,29	0,33	0,86	0,23	0,21	0,62	1,04	0,72	0,38	
164	1596	1608 Humulene epoxide II																											0,04							
165	1599	1592 Viridiflorol											0,05		0,12		0,15																			
166	1606	1594 Salvial-4(14)-en-1-one*										0,10	0,04	0,03		0,12	0,12			0,02																
167	1617	1602 Ledol										0,18	0,06		0,12	0,10	0,12																			
168	1621	1608 β -Oplopenone*										0,02	0,03	0,19	0,06	0,04	0,09																			
169	1622	1590 Copaen-4- α -ol																	0,03																	
170	1623	1608 β -Atlantol														0,06	0,04	0,06				0,05					0,02						0,79	0,58		
171	1623	1641 epoxy-Alloaromadendrene																0,07		0,04					0,07	0,02										
172	1623	1640 Caryophylla-4(12)18(13)-dien-5- α -ol				0,03				0,02				0,17	0,05	t	0,06	0,03	0,04	0,03		0,06	0,03	0,02	0,03	0,02	0,03		0,05		0,01			0,01		
173	1624	1640 Caryophylla-4(12)18(13)-dien-5- β -ol												0,47	0,12	t	0,18	0,07							0,07		0,08					0,04				
174	1625	1619 1-10- <i>di-epi</i> -Cubebol										0,02	0,10		0,02	0,04	0,04																0,45	0,38		
175	1628	1619 Junenol*										0,08	t			0,04	0,02																			
176	1632	1627 1- <i>epi</i> -Cubebol														0,10																				
177	1636	1634 cis-Cadin-4-en-7-ol														0,08		0,10																0,05	0,07	
179	1640	1632 γ -Eudesmol										0,21	0,04	0,02																						
180	1648	1640 14-hydroxy-9- <i>epi</i> -Caryophyllene	0,03			0,02								0,34								0,02					0,04		0,06							
181	1650	1644 Selina-3,11-dien-6- α -ol												0,04																						
182	1652	1640 <i>epi</i> - α -Cadinol										0,10	0,05																					2,22	2,30	
183	1653	1659 Selin-11-en-4- α -ol												0,10																						
185	1658	1642 <i>epi</i> - α -Muurolol										0,62	0,76	0,08	0,97	1,40	1,38																			
186	1661	1646 Cubebol										0,11	0,03	0,15	0,20	0,22	0,25																			
187	1664	1650 β -Eudesmol										0,16	0,02																							
188	1673	1654 α -Cadinol										1,33	0,28	0,56	1,72	2,68	2,52																0,73	0,66		
189	1677	1669 β -Atlantone																															0,07	0,06		
190	1680	1669 Guaia-3,10(14)-dien-11-ol															0,18																			
191	1681	1667 14-hydroxy- <i>Z</i> -Caryophyllene													0,32															0,07						
192	1682	1669 14-hydroxy-9- <i>epi</i> -Caryophyllene													0,14		0,15																	0,05	0,05	
194	1684	1684 2 <i>Z</i> ,6 <i>Z</i> -Farnesal										0,39	0,10																							
196	1690	1686 Germacre-4(15)5,10(14)-trien-1- α -ol	0,02									0,33	0,19	0,04	0,60	0,68	0,46	0,09		0,03		0,02		0,02			0,10	0,03								
197	1691	1684 α - <i>epi</i> -Bisabolol										0,22	0,11																							
198	1695	1688 Eudesma-4(15)-7-dien-1- β -ol										0,04		0,59					0,05				t		0,03		0,02						0,45	0,47		
199	1695	1685 α -Bisabolol													0,14	0,08	0,40												0,06				0,06	0,08		
200	1696	1689 Shyobunol										4,34	0,75	1,10	0,08	0,17																				
201	1698	1698 2 <i>Z</i> ,6 <i>Z</i> -Farnesol												0,10		0,06																	0,17	0,13		
203	1726	1713 2 <i>E</i> ,6 <i>Z</i> -Farnesal													0,16	0,23	0,04																			
204	1754	1741 2 <i>E</i> ,6 <i>E</i> -Farnesal													0,04	0,06																				
205	1773	1743 Cedr-8-(15)en-9- α -ol-acetate														0,04																				
206	1787	1761 cis-Lanceol																																0,04	0,03	
207	1787	1776 14- α -hydroxy-Muurolene										0,03				0,02																	0,07	0,05		
208	1790	1778 γ -E																																		

			TL-GAMB	TL-MUAL	TL-PINT	TL-FAGO	TL-FG-INF	TL-ALLA	TL-CASS	TL-ZOMA	T-PRAEX	TP-TRAM	TP-VENT	TST-RUG	TP-CAMM	TP-CAMM-INF	TSP-3	TS-CAMM	TS-LAUR	TS-ROSE	TS-RO-INF	TS-FARO	TS-QUAC	TS-QINF	TS-CAST	TS-CA-INF	TS-SNIC	TS-SN-INF	TS-ELIA	TS-EL-INF	TS-FV-INF	TS-FAVE	TR-FARO	TR-MARE	TV-LIGU			
#	Classe (DI) /Composti			%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%			
Diterpeni (2)				0,02	0,04										0,30	0,03																		0,11	0,09			
RI EX	RI L	# componenti	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0			
213	1977	1960	Z,Z-Geranyl linalool			0,02	0,04								0,30																		0,11	0,09				
214	2039	2026	E,E-Geranyl linalool													0,03																						
Classe (OT) /Composti				%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%			
Altri (35)				4,53	3,51	2,56	4,83	2,99	3,77	3,88	3,75	4,92	1,31	3,20	1,97	1,88	0,22	1,57	2,12	2,54	2,34	1,00	2,82	2,58	1,13	2,91	1,22	2,71	0,94	2,01	1,12	1,20	2,44	0,71	0,73	1,97		
RI EX	RI L	# componenti	7	7	6	7	6	7	7	7	10	12	15	17	13	5	11	9	8	6	6	7	8	6	8	7	7	5	4	4	4	5	4	5	4			
1	822	828	Methyl pentanoate					0,03	0,02									0,05					0,07	0,04	0,04	0,02	0,03	0,03										
2	833	855	2E-Hexenal			0,03	0,06	0,04	0,05	0,02	0,03	0,02	0,06	0,10	0,03	0,11	0,08	0,06		0,02		0,03	0,03	0,02			0,02			0,03	0,02	0,03	0,04	t	0,03			
3	910	908	Heptanal														0,06	0,02																				
11	969	979	1-Octen-3-ol			2,14	2,16	1,54	1,22	0,67	2,05	2,26	2,37	2,41	0,20	1,57	0,20	0,59		0,68	1,17	1,38	1,51	0,77	1,76	1,64	0,87	1,87	0,98	1,98	0,76	1,83	1,04	1,11	2,15	0,49	0,59	1,53
12	975	984	3-Octanone			2,03	1,01	0,79	2,88	1,81	1,37	1,29	1,07	1,71	t	0,14	0,08	0,09		0,09	0,23	0,28	0,22	0,04	0,37	0,20	0,07	0,24	0,06	0,16	0,03	0,09	0,03	0,03	0,12	t	0,04	0,06
14	988	998	trans-2-pentenyl-Furan*													0,07																						
15	991	999	Octanal											0,17	0,13	0,07	0,15	0,06	0,10	0,08	0,23	0,10		0,16	0,21	0,08	0,17	0,07	0,18	0,04								
16	992	1000	3-Octanol			0,21	0,19	0,13	0,56	0,44	0,21	0,21	0,16	0,45			0,11	0,13		0,10	0,26	0,16	0,27	0,07	0,20	0,09	0,05	0,15	0,06	0,12	0,08	0,06	0,03	0,03	0,08	0,05	0,05	0,07
18	998	1007	2E,4E-Heptadienal													0,20																						
27	1041	1042	Benzene acetaldhyde			0,04	0,02		0,05	0,02			0,05	0,05	t	0,03	0,04																0,04	0,06	t			
31	1065	1068	n-Octanol												0,04	0,08		0,05			0,31		0,05	0,20			0,18											
34	1076		3-Nonanone						0,05	0,03					0,04																							
37	1096	1100	Nonanal			0,05	0,04	0,03			0,06	0,06	0,03	0,09	0,26	0,60	0,42	0,39		0,28																		
39	1103	1112	1-Octen-3-ylacetate												0,02																							
40	1111	1123	3-Octanol acetate													0,06																						
51	1147	1150	2-(1Z)-Propenyl phenol											0,05	0,02		0,09	0,02	0,03																			
56	1169	1169	Nonanol											0,02	0,03		0,03					0,04																
57	1169	1168	6Z-Nonenol													0,05																						
59	1181	1186	3Z-Hexenyl butanoate																															0,10				
61	1183	1192	Methyl salicilate													0,02	t	t	t																			
67	1194	1196	4E-Decenal																0,05																			
69	1198	1202	Decanal											0,18	0,25	0,40	0,19	0,09	0,17	0,12	0,12			0,12		0,10												
86	1256	1263	2E-Decenal											t	t	0,09	t																					
91	1285	1282	p-Ethyl acetophenone									0,04																										
92	1284	1270	n-Decanol													t				0,14		0,19				0,16												
98	1306	1313	Hexenyl tiglate													0,03			0,03																			
102	1315	1313	Nonanyl acetate																																			
105	1359	1359	Eugenol			0,04	0,04	0,03	0,03		0,02	0,02	0,02	0,02		0,06	t	0,02	0,03		0,03	0,03											t	0,03				
113	1400	1392	E-Jasmone											0,06	t				0,03						0,02		0,02											
115	1411	1408	Dodecanal											0,03																								
126	1448		o-Methoxy α,α-dimethylbenzyl alcohol																			0,11	0,24				0,20								0,31			
137	1496	1489	Butylated hydroxy anisole									0,02																										
138	1496		3-(1,1-dimethylethyl)-4-methoxy-phenol																		0,04							0,05										
160	1556	1566	3Z-Hexenyl benzoate													0,03																						
212	1892	1875	Hexadecanol										0,25	0,02		0,03	0,03	0,03																				
				%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%			
Totale componenti (208)				99,68	99,76	96,88	99,30	99,79	99,74	99,09	99,65	99,56	97,09	99,20	91,11	99,39	97,70	99,04	99,18	99,63	99,52	99,58	99,51	99,61	99,67	99,13	99,51	99,34	99,73	98,96	99,27	99,53	99,57	97,01	97,32	99,35		
# componenti				49	46	46	50	47	46	45	49	56	99	98	92	106	94	98	62	58	53	53	51	57	53	58	55	63	53	53	49	43	57	85	89	53		

3.2.1 Oli essenziali parti vegetative (accessioni 2016)

Per discriminare gli oli essenziali estratti dalle diverse specie ed accessioni campionate nel 2016, in diverse aree geografiche, è stata applicata l'analisi cluster sul complesso dei composti chimici identificati. Dal dendrogramma ottenuto (Fig. 6) si osserva che le 10 accessioni si distribuiscono in due raggruppamenti principali: il Gruppo 1, con 2 accessioni di *T. paronychioides* (TP-VENT, TP-TRAM) e il Gruppo 2 che ne comprende complessivamente 8 (4 di *T. longicaulis* subsp. *longicaulis*: TL-PG, TL-3FIN, TL-LL, TL-PINT; 3 di *T. spinulosus*: TS-FARO, TS-LEO, TS-CAST; 1 di *T. praecox* subsp. *parvulus*: T-PRAEX). Analizzando il grafico, si rileva che il Gruppo 2 può essere ulteriormente suddiviso in due sottogruppi: 2a e 2b, comprendenti ciascuno 4 oli.

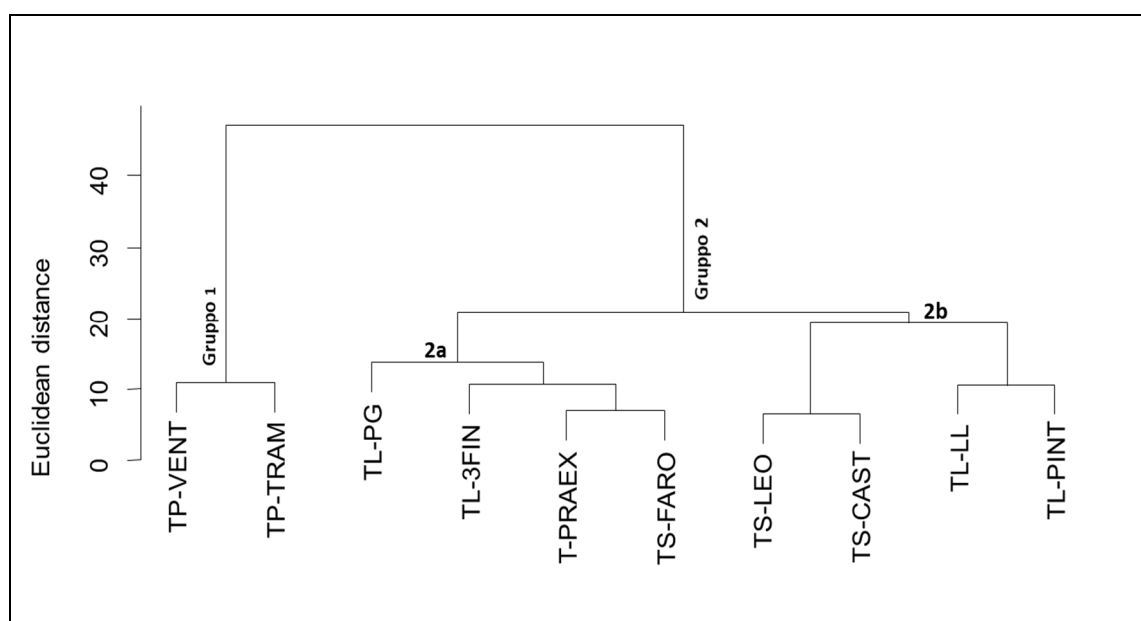


Figura 6. Dendrogramma ottenuto dall'analisi cluster in funzione della composizione chimica degli oli essenziali estratti dalle parti vegetative di: *T. longicaulis* subsp. *longicaulis* (TL-PINT, TL-LL, TL-3FIN, TL-PG), *T. paronychioides* (TP-TRAM, TP-VENT), *T. spinulosus* (TS-CAST, TS-LEO, TS-FARO), *T. praecox* subsp. *parvulus* (TP-PRAEX). Campionamento 2016.

Esaminando in dettaglio il profilo chimico degli oli essenziali emerge che gli oli del Gruppo 1 sono caratterizzati da una composizione nettamente dissimile sia in termini qualitativi sia quantitativi, rispetto a quelli del Gruppo 2. Il principale elemento discriminante è rappresentato dalla classe dei sesquiterpeni, idrocarburi e ossigenati (Fig. 7), che maggiormente caratterizzano gli oli del Gruppo 1 (42-45% della composizione totale), rispetto a quelli del Gruppo 2 (valore medio 4.3%). Tra i sesquiterpeni idrocarburi, i componenti più rilevanti nel Gruppo 1, in termini di abbondanza relativa, sono il germacrene D (valore medio 12.6%), l'*E*-caryophyllene (valore medio 8.1%), il β -*E*-farnesene (valore medio 2.7%) e il β -bourbonene (valore medio 1.4%); tra gli ossigenati l'eudesma-7(11)-en-4-

ol (valore medio 2%), l'*E*-nerolidol (valore medio 2.8%) e l'*epi*- α -muurolol, quest'ultimo ha una concentrazione più alta in TP-VENT (3%) rispetto a TP-TRAM (0.3%).

I sesquiterpeni idrocarburi, negli oli del Gruppo 2, sono poco rappresentati e le relative concentrazioni sono in media molto basse: dallo 0.1% (TLON-PG) allo 0.3% (T-PRAEX) il germacrene D; dall'1.6% (TL-PINT) a un massimo del 2.9% (TL-3FIN) l'*E*-caryophyllene. Tra gli ossigenati il più alto contenuto si riscontra per il caryophyllene oxide (valore medio 0.5%).

Altre dissimilarità tra i due gruppi, in termini quali-quantitativi, riguardano i monoterpeni (idrocarburi e ossigenati) (Fig. 7), che costituiscono la classe più abbondante negli oli del Gruppo 2 (valore medio 90.8%) rispetto a quelli del Gruppo 1 (valore medio 53.4%). Tra gli idrocarburi, caratterizzati dalla stessa concentrazione media in entrambi i gruppi (45% della composizione totale), i componenti principali sono il myrcene (valore medio 14%), il limonene (valore medio 16.6%) e l' α -pinene (valore medio 5.6%), nel Gruppo 1; il *p*-cymene (valore medio 18.5%), l' α -terpinene (valore medio 2.8%) e il γ -terpinene (valore medio 18.2%), negli oli del Gruppo 2.

I monoterpeni ossigenati sono più abbondanti negli oli del Gruppo 2 (concentrazione media 45.7%) mentre non superano il valore medio del 7.7% in quelli del Gruppo 1. Tra questi i principali, presenti a basse concentrazioni, sono: il terpinen-4-ol (valore medio 1.5%), il linalool (valore medio 1%) e il *trans*-carvyl acetate (valore medio 1.6%), nel Gruppo 1; il timolo (valore medio 28.9%), il carvacrolo (valore medio 1.6%), il borneol (valore medio 3.4%) e il timol metil etere (valore medio 5%), nel Gruppo 2. La specificità che contraddistingue gli oli del Gruppo 1, discriminandoli da quelli del Gruppo 2, è la concentrazione considerevolmente bassa (valore medio 0.2%) in timolo. Altre dissimilarità si riscontrano nella classe di composti non terpenici (OT) (Fig. 7), più abbondanti nel Gruppo 2 (valore medio 4%) piuttosto che nel Gruppo 1 (valore medio 1.5%). All'interno del Gruppo 2, infine, le differenze tra i sottogruppi 2a e 2b sono correlate a due composti principali: il *p*-cymene, a più bassa concentrazione (valore medio 13.5%) negli oli del sottogruppo 2a (TL-PG, TL-3FIN, T-PRAEX, TS-FARO), più alta (valore medio 23.5%) in quelli del 2b (TS-LEO, TS-CAST, TL-LL, TL-PINT); il timolo, più abbondante negli oli del sottogruppo 2a (valore medio 35.9%) rispetto a quelli del 2b (valore medio 21.9%).

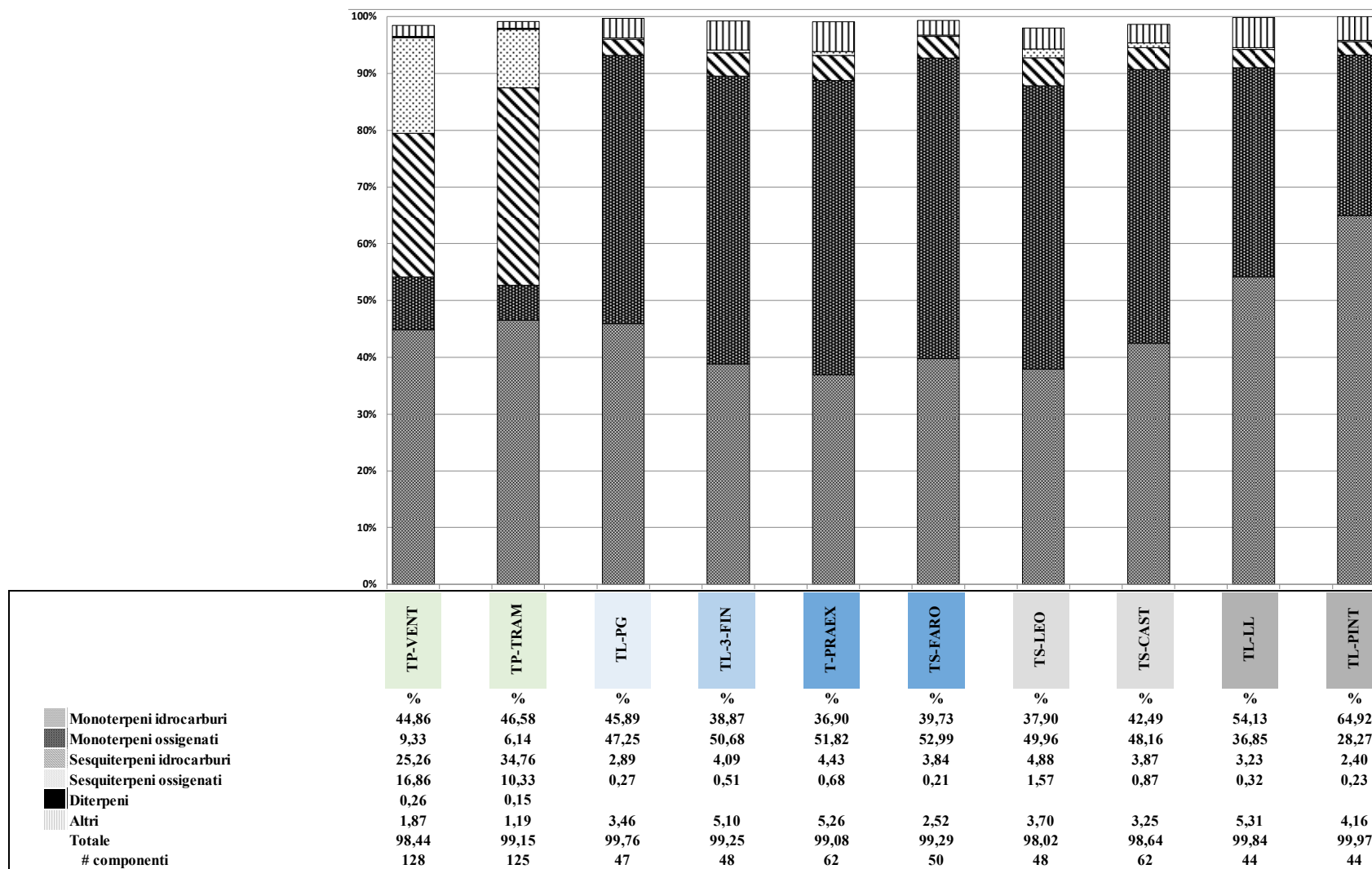


Figura 7. Percentuale relativa di ciascuna classe chimica rappresentata negli oli essenziali estratti dalle parti vegetative di: *T. longicaulis* subsp. *longicaulis* (TL-PINT, TL-LL, TL-3FIN, TL-PG), *T. paronychioides* (TP-TRAM e TP-VENT), *T. spinulosus* (TS-CAST, TS-LEO e TS-FARO), *T. praecox* subsp. *parvulus* (TP-PRAEX). Campionamento 2016. Gradazioni di colore simili (etichette asse delle ascisse) indicano affinità composizionali tra i diversi oli (Fig. 6).

3.2.2 Oli essenziali parti vegetative (accessioni 2017)

Per determinare la relazione tra le diverse specie e accessioni di *Thymus* collezionate nel 2017, le composizioni percentuali degli oli essenziali estratti dalle parti vegetative sono state sottoposte ad analisi cluster. L'analisi ha permesso di differenziare due gruppi principali: Gruppo 1 e 2 (Fig.8). Il Gruppo 1 include 2 sottogruppi (1a e 1b) e 18 accessioni; il Gruppo 2 è costituito da 7 accessioni.

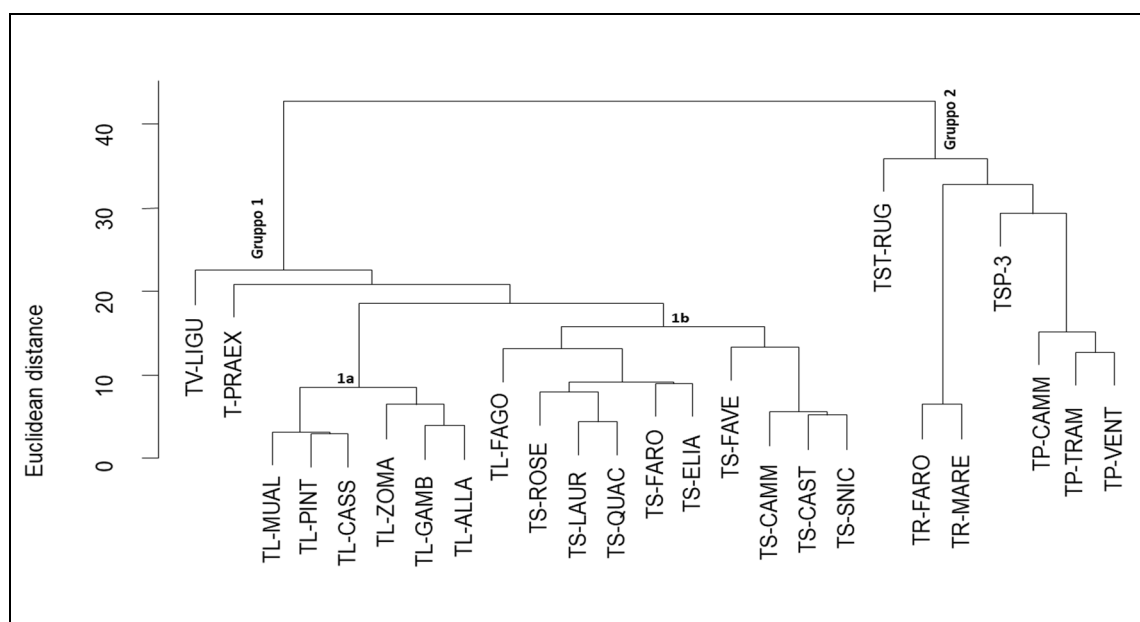


Figura 8. Dendrogramma ottenuto dall'analisi cluster in funzione della composizione chimica degli oli essenziali estratti dalle parti vegetative di: *T. longicaulis* subsp. *longicaulis* (TL-MUAL, TL-PINT, TL-CASS, TL-ZOMA, TL-GAMB, TL-ALLA, TL-FAGO); *T. paronychioides* (TP-VENT, TP-TRAM, TP-CAMM); *T. praecox* subsp. *parvulus* (T-PRAEX); *T. richardii* subsp. *nitidus* (TR-FARO e TR-MARE); *T. spinulosus* (TS-ROSE, TS-LAUR, TS-QUAC, TS-FARO, TS-ELIA, TS-FAVE, TS-CAMM, TS-CAST, TS-SNIC); *T. striatus* subsp. *striatus* (TST-RUG), *T. vulgaris* subsp. *vulgaris* (TV-LIGU), *Thymus* sp. (TSP-3). Campionamento 2017.

La differenziazione dei due gruppi (Gruppo 1 e 2) è attribuibile ai sesquiterpeni (idrocarburi e ossigenati) (Fig. 9) che caratterizzano, con una più alta concentrazione, gli oli essenziali del Gruppo 2 (25.4- 41.7%), rispetto a quelli del Gruppo 1 in cui il valore più alto, pari al 6.8%, si rileva solo in una accessione (TS-FARO). In particolare, i sesquiterpeni idrocarburi hanno un valore medio del 23.4% (rispetto al totale della composizione) nei 7 oli del Gruppo 2, del 4% (valore medio rispetto al totale della composizione) in quelli del Gruppo 1. I sesquiterpeni ossigenati, invece, hanno una concentrazione media del 10.8% nel Gruppo 2, che non supera lo 0.7% (valore medio) negli oli del Gruppo 1.

Negli oli del Gruppo 2 i sesquiterpeni idrocarburi più rappresentati, in termini quantitativi, sono: l'*E*-caryophyllene (valore medio 6.5%) e il germacrene D (valore medio 6.7%). Tali composti, negli oli del Gruppo 1 non superano, invece, il 2.4% e lo 0.25%, rispettivamente.

Caratteristica esclusiva degli oli di entrambe le accessioni di *T. richardii* subsp. *nitidus* (TR-MARE e TR-FARO) è l'elevato contenuto in β -bisabolene (valore medio 14.9%), composto che negli altri oli dello stesso gruppo non supera in media il valore di 0.7%.

Tra i sesquiterpeni ossigenati prevalgono, nel Gruppo 2, il caryophyllene oxide (valore medio 1%) e l' α -cadinol (valore medio 1.1%). Negli oli del Gruppo 1, invece, il caryophyllene oxide ha una concentrazione media dello 0.5% e l' α -cadinol non è affatto rappresentato. Dall'analisi della composizione chimica delle diverse accessioni del Gruppo 2 si evidenzia, inoltre, un'elevata concentrazione in *E*-nerolidol (16.6%) nell'olio essenziale di *T. striatus* subsp. *striatus* (TST-RUG).

Differenze rilevanti tra i due Gruppi si individuano anche nel contenuto in monoterpeni, idrocarburi e ossigenati (Fig. 9), più elevato nel Gruppo 1 (valore medio 91.5%) rispetto al 2 (valore medio 61.2%). I monoterpeni ossigenati prevalgono negli oli del Gruppo 1 (valore medio 48.9%) rispetto agli idrocarburi (valore medio 42.6%), contrariamente a quelli del Gruppo 2 in cui i monoterpeni idrocarburi (valore medio 36.2%) predominano sugli ossigenati (valore medio 25%).

Tra i monoterpeni idrocarburi i composti principali, in tutti gli oli del Gruppo 1, sono il *p*-cymene (valore medio 15.4%) e il γ -terpinene (valore medio 17.2%), seguono l' α -thujene (valore medio 1.7%) e il camphene (valore medio 1.4%). In quelli del Gruppo 2 i componenti più abbondanti sono: l' α -pinene (valore medio 3.4%), il limonene (valore medio 10.5%) e il γ -terpinene (valore medio 5.2%).

Per quanto riguarda la frazione ossigenata dei monoterpeni il timolo è il composto prevalente (valore medio 30%) in tutti gli oli del Gruppo 1, seguono il borneol (valore medio 3.4%) e il timol metil etere (2.2-10%). In quelli del Gruppo 2, il timolo ha, invece, una concentrazione piuttosto bassa; il valore più alto, pari a 6.4%, è stato riscontrato in TST-RUG, il più basso in TP-VENT (0.02%). Tra i monoterpeni ossigenati prevalgono in quest'ultimo gruppo il linalool (valore medio 2.4%) e il terpinen-4-ol (valore 1.5%).

I composti non terpenici (OT) sono più abbondanti negli oli del Gruppo 1 (valore medio 3.1%) che in quelli del Gruppo 2 (valore medio dell'1.6%) (Fig. 9).

Per quanto riguarda i sottogruppi *1a* e *1b* del Gruppo 1, le dissimilarità si possono sempre attribuire alla prevalenza o carenza di monoterpeni (idrocarburi e ossigenati). Tra gli idrocarburi i principali elementi di differenziazione sono individuabili nel contenuto di γ -terpinene, più elevato negli oli del sottogruppo *1a* (valore medio 25.8%) piuttosto che in *1b* (valore medio 13%). Inoltre, il *p*-cymene è più abbondante negli oli del sottogruppo *1b* (valore medio 17.4%) rispetto all'*1a* (valore medio 13.1%). Tra i monoterpeni ossigenati una significativa differenza si osserva nel contenuto in linolol, maggiore negli oli del sottogruppo

Ib (valore medio 6.8%), minore in quelli di *T. longicaulis* subsp. *longicaulis* (sottogruppo *Ia*) (valore medio 0.4%); e in timol metil etere, più abbondante negli oli del sottogruppo *Ib* (valore medio 6.1%) che in quelli del sottogruppo *Ia* (valore medio 2.6%).

Ulteriori elementi di dissimilarità si riscontrano tra gli oli di TV-LIGU e T-PRAEX, caratterizzati da un alto contenuto in monoterpeni ossigenati (valore medio 60.2%), rispetto agli altri oli dello stesso gruppo (Gruppo 1) nei quali i suddetti composti hanno una concentrazione, in media, compresa tra il 42.6% (sottogruppo *Ia*) e il 50.5% (sottogruppo *Ib*). L'olio essenziale di T-PRAEX è più ricco in timolo (45%), mentre quello di TV-LIGU ha un alto contenuto in carvacrolo (18.5%). In tutti gli altri oli del Gruppo 1 (sottogruppi *Ia* e *Ib*) i due fenoli hanno una concentrazione più bassa: dal 20.5% al 35.7% il timolo, dall'1.3% al 2.8% il carvacrolo.

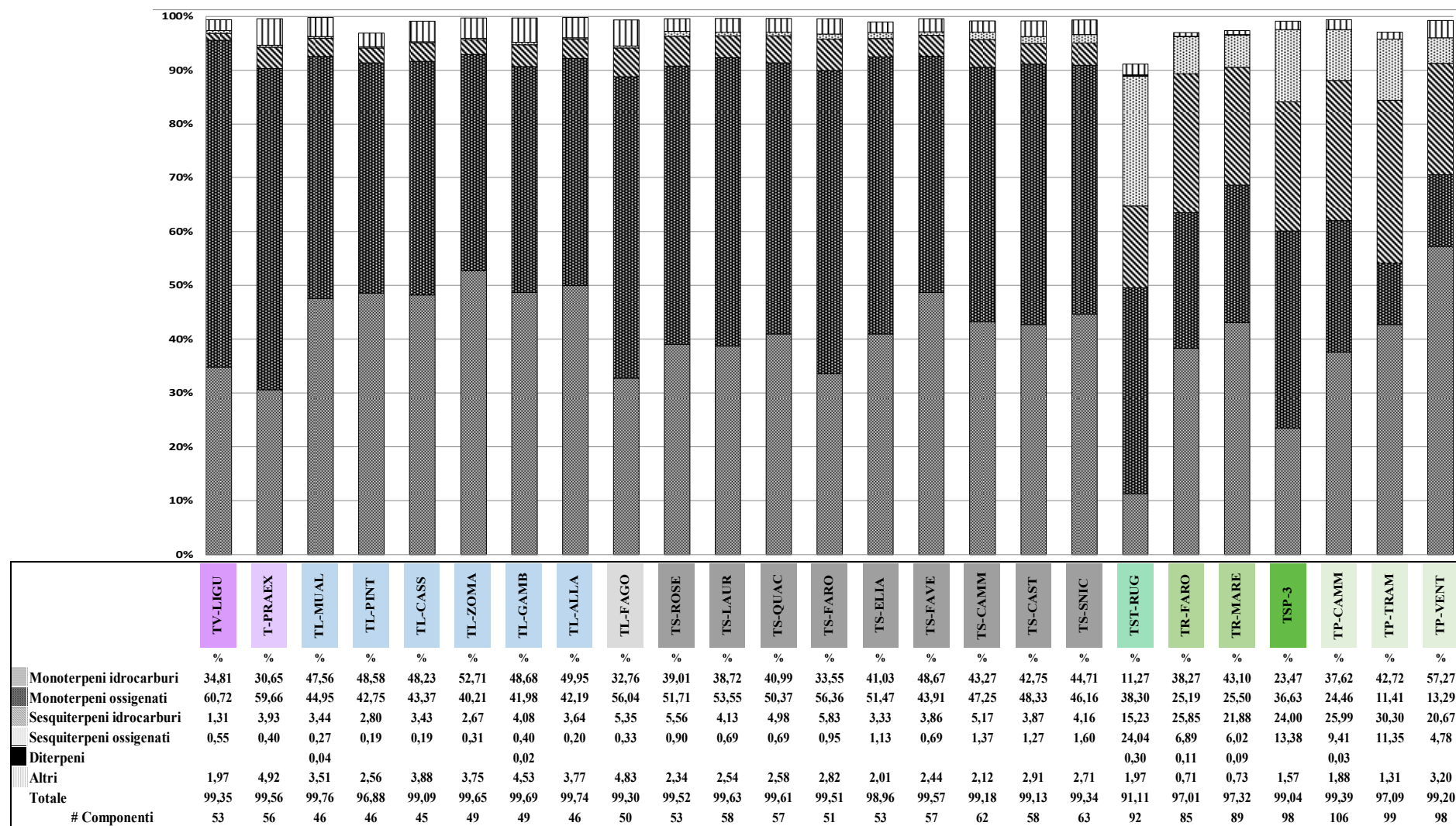


Figura 9. Percentuale relativa di ciascuna classe chimica di composti rappresentata negli oli essenziali estratti dalle parti vegetative di: *T. longicaulis* subsp. *longicaulis* (TL-MUAL, TL-PINT, TL-CASS, TL-ZOMA, TL-GAMB, TL-ALLA, TL-FAGO); *T. paronychioides* (TP-VENT, TP-TRAM, TP-CAMM); *T. praecox* subsp. *parvulus* (T-PRAEX); *T. richardii* subsp. *nitidus* (TR-FARO e TR-MARE); *T. spinulosus* (TS-ROSE, TS-LAUR, TS-QUAC, TS-FARO, TS-ELIA, TS-FAVE, TS-CAMM, TS-CAST, TS-SNIC); *T. striatus* subsp. *striatus* (TST-RUG), *T. vulgaris* subsp. *vulgaris* (TV-LIGU) e *Thymus* sp. (TSP-3). Campionamento 2017. Gradazioni di colore simili (etichette asse delle ascisse) indicano affinità composizionali tra i diversi oli (Fig. 8).

3.2.3 Comparazione tra oli essenziali di accessioni 2016/2017

L'analisi cluster, in funzione della composizione degli oli essenziali di *Thymus* estratti da parti vegetative campionate per due anni consecutivi (2016 e 2017) dalle stesse popolazioni, ha restituito un dendrogramma in cui le coppie di accessioni della stessa specie/provenienza si ripartiscono nello stesso gruppo (Fig. 10).

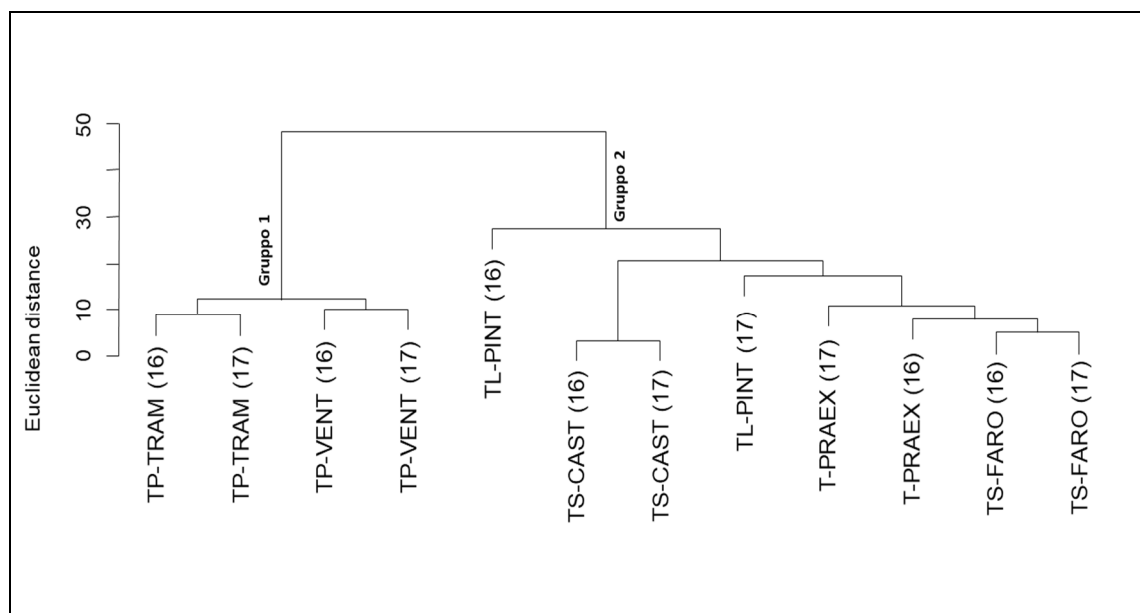


Figura 10. Dendrogramma ottenuto dall'analisi cluster in funzione della composizione chimica degli oli essenziali estratti dalle parti vegetative di: *T. longicaulis* subsp. *longicaulis* (TL-PINT); *T. paronychioides* (TP-TRAM e TP-VENT); *T. praecox* subsp. *parvulus* (TP-PRAEX) e *T. spinulosus* (TS-CAST e TS-FARO). Campionamenti 2016 (16) e 2017 (17).

Tale distribuzione può essere correlata alle limitate differenze composizionali tra gli oli essenziali dei due anni di campionamento (Fig. 11). L'analisi di dettaglio della composizione chimica conferma, infatti, una omogeneità di contenuto, in termini quali-quantitativi, tra le coppie di accessioni dello stesso *taxon* (Tabelle 3 e 4).

Nello specifico, gli oli di *T. paronychioides* (accessioni TP-TRAM, 2016/2017) hanno analogo contenuto in sesquiterpeni totali (45% accessione 2016, 41.7% accessione 2017) e in monoterpeni totali (52.7% accessione 2016, 54.1% accessione 2017). Lo stesso pattern si evidenzia tra le accessioni del 2016 e 2017 di *T. spinulosus* (TS-CAST, TS-FARO) e *T. praecox* subsp. *parvulus* (TP-PRAEX).

Di contro, differenze quantitative si riscontrano sia in sesquiterpeni totali (42.1 vs 25.5%) sia in monoterpeni (54.2% vs 70.6%) tra gli oli essenziali di *T. paronychioides* (TP-VENT) del 2016 e 2017.

Oltre a ciò, l'analisi cluster (Fig. 10) ha evidenziato che gli oli essenziali di *T. longicaulis* subsp. *longicaulis* (accessioni TL-PINT, 2016/2017), pur posizionandosi nello stesso Gruppo 2, si collocano l'uno rispetto all'altro a una distanza maggiore, diversamente dalla posizione

speculare delle altre coppie di accessioni. La suddetta distanza potrebbe correlarsi al differente contenuto in monoterpeni idrocarburi e ossigenati tra gli oli essenziali del 2016 e 2017 (Fig. 11), rispettivamente: 64.9% e 28.3% nel 2016; 48.6% e 42.8% nel 2017.

I principali composti coinvolti in tali differenze sono: il *p*-cymene, tra i monoterpeni idrocarburi, e il timolo tra gli ossigenati. La concentrazione del *p*-cymene, precursore del timolo, è più alta nell'olio del 2016 (26.1%), rispetto al corrispondente del 2017 (10.1%); mentre, il contenuto in timolo è più elevato nell'olio del 2017 (33.4%), rispetto a quello del 2016 (15.7%). L'inversione di contenuto riscontrata in due dei composti principali (*p*-cymene e timolo), correlati da legame biosintetico (Thompson *et al.*, 2003), potrebbe essere attribuita ai fattori ambientali. Quelli climatici, in particolare, potrebbero aver influito nel determinare tale diversità (Ruberto G., comunicazione personale).

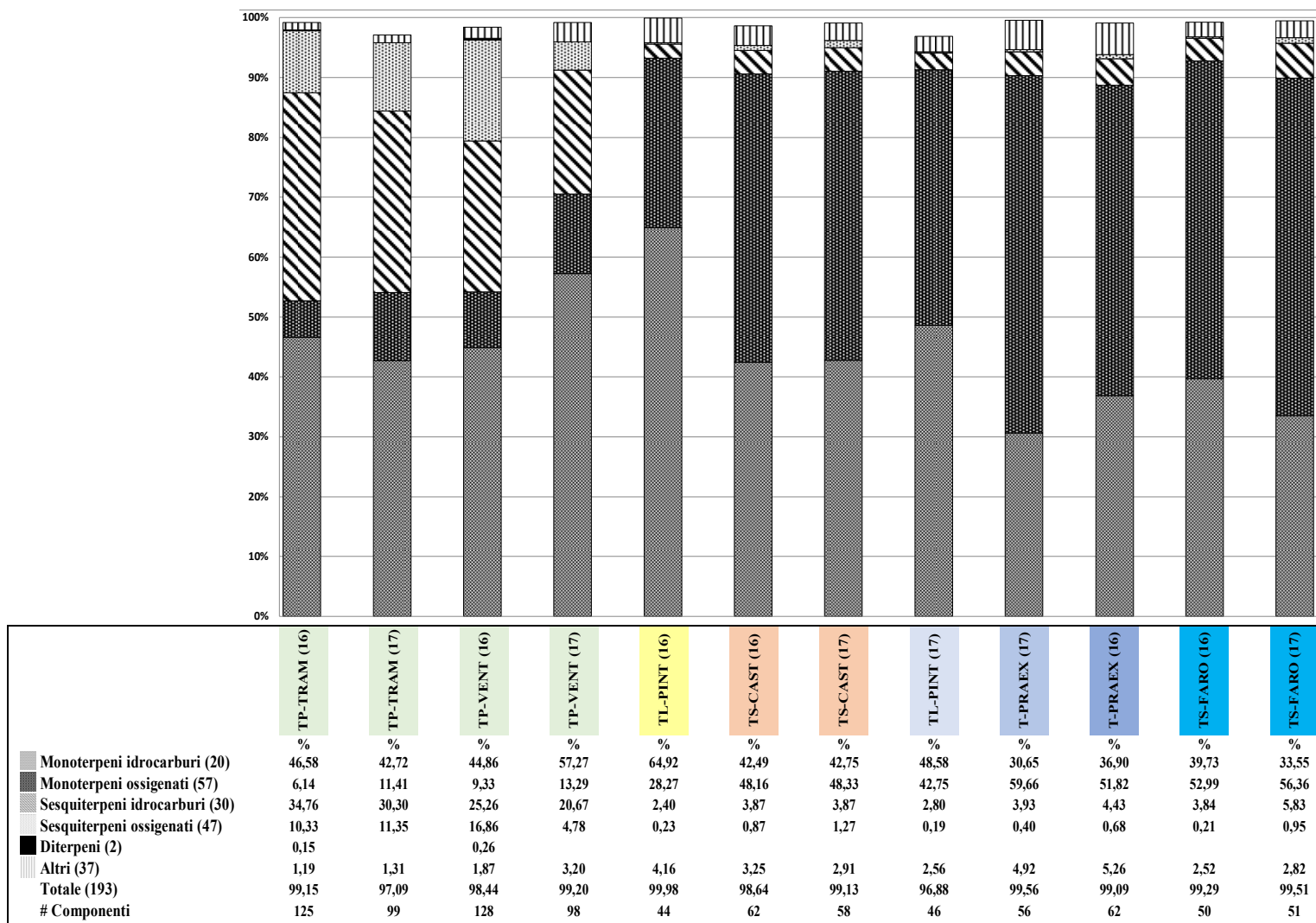


Figura 11. Percentuale relativa di ciascuna classe chimica di composti rappresentata negli oli essenziali estratti dalle parti vegetative di: *T. longicaulis* subsp. *longicaulis* (TL-PINT); *T. paronychioides* (TP-TRAM e TP-VENT); *T. praecox* subsp. *parvulus* (TP-PRAEX) e *T. spinulosus* (TS-CAST e TS-FARO). Campionamenti 2016 (16) e 2017 (17). Gradazioni di colore simili (etichette asse delle ascisse) indicano affinità composizionali tra i diversi oli (Fig. 10).

Dall'analisi dei dati climatici riferiti agli anni 2016 e 2017, relativi alla stazione meteo SIAS di Antillo (ME), situata a 796 m s.l.m., prossima al sito di Pizzo Pinto (ME) ove è stata campionata l'accessione di *T. longicaulis* subsp. *longicaulis* (TL-PINT), sono state evidenziate differenze rilevanti sia in termini di piovosità sia di temperatura (Figg. 12, 13). Il 2016 è stato caratterizzato da una precipitazione totale annua di 1.666 mm e da un periodo di aridità più breve (da giugno ad agosto), rispetto al 2017 (precipitazione totale annua 1.025 mm, periodo di aridità da aprile ad agosto).

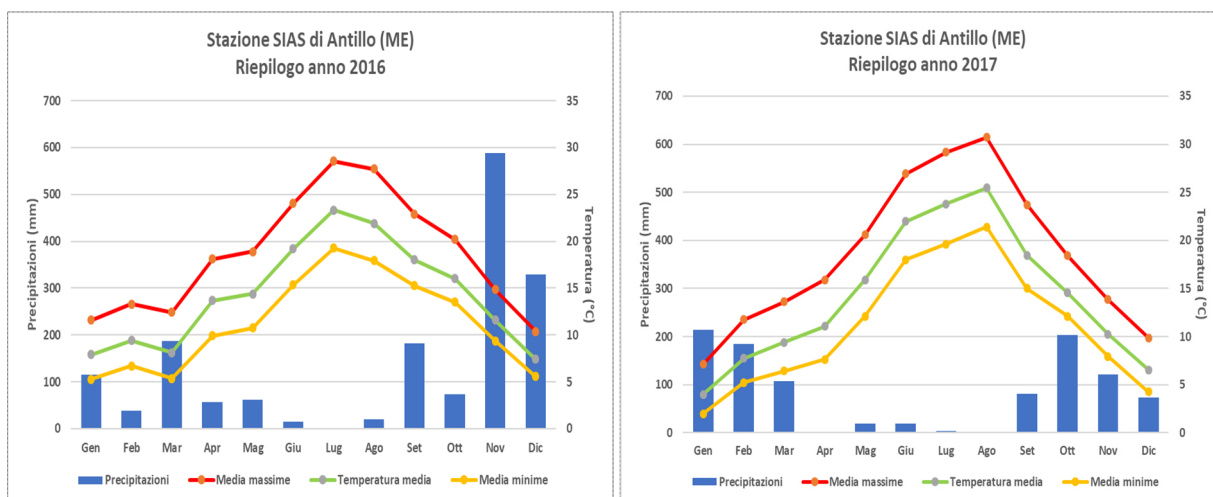


Figura 12. Dati annuali di piovosità e temperatura, registrati nel 2016 e 2017 dalla stazione meteo SIAS di Antillo, a 796 m s.l.m.

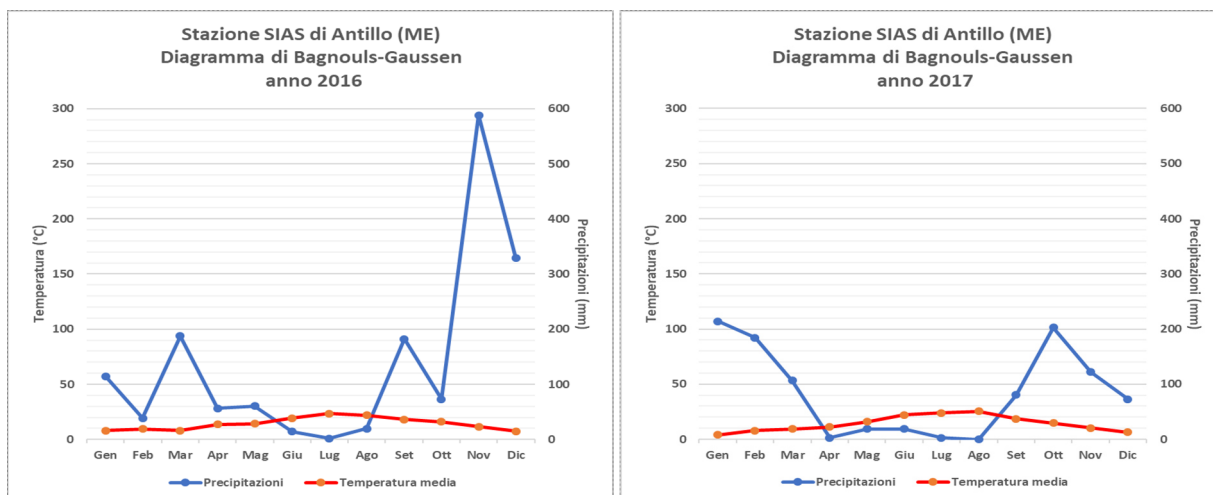


Figura 13. Diagramma termopluviometrico di Bagnouls-Gausson relativo al 2016 e 2017. I dati meteo sono della stazione SIAS di Antillo, a 796 m s.l.m.

In generale, l'influenza dei fattori abiotici (es. temperatura, caratteristiche chimiche del suolo, piovosità, stagionalità, stress idrico e osmotico) sulla composizione quali-quantitativa degli oli essenziali è stata esplorata da diversi Autori (Morais, 2009; Gobbo-Neto & Lopes, 2007; Abdelmajeed *et al.*, 2013) sia in indagini riguardanti il genere *Thymus* (Martónfi *et al.*, 1994; Salgueiro *et al.*, 1995, 1997b; Boira & Blanquer, 1998; Ložienė & Venskutonis, 2005;

Delazar *et al.*, 2011) sia in altri generi della famiglia delle Lamiaceae, quali *Mentha* (Maffei, 1988) e *Rosmarinus* (Maffei *et al.*, 1993).

In studi relativi a diverse popolazioni del genere *Thymus*, diffuse in habitat mediterranei, la presenza di differenti chemotipi e la maggiore produzione di composti fenolici (es. timolo e carvacrolo) è stata correlata alle specifiche condizioni pedoclimatiche e ambientali (altitudine, tipologia e profondità del suolo, temperatura, grado di aridità, etc.) dei siti di crescita (Passet 1971; Granger & Passet, 1973; Vernet *et al.*, 1977; Gouyon *et al.*, 1986; Thompson *et al.*, 1998). Più precisamente, i composti fenolici sarebbero più frequenti e a concentrazioni più elevate in aree contraddistinte da un clima caldo e arido, rispetto ai composti non fenolici, la cui sintesi sarebbe favorita in ambienti maggiormente freddi e umidi. Lo stress idrico, in particolare, avrebbe una rilevante influenza sia sulla resa sia sulla composizione chimica degli oli essenziali (Sharafzadeh & Zare, 2011; Llorens-Molina & Vacas, 2017). Una correlazione tra la composizione chimica e i fattori biogeografici, climatici ed edafici è stata evidenziata anche in un recente lavoro di Llorens *et al.* (2014), riguardante gli oli essenziali di differenti sottospecie e popolazioni di *T. richardii*. Altresì, nello studio condotto su *T. piperella* è stato rilevato un forte collegamento tra l'indice di aridità, i fattori che interferiscono con il bilancio idrico delle piante e la concentrazione dei principali composti fenolici (il timolo in particolare) (Boira & Blanquer, 1998).

Le differenze da noi riscontrate, in termini quantitativi, tra gli oli essenziali delle accessioni di *T. longicaulis* subsp. *longicaulis* (TL-PINT 16 e 17) campionate negli anni 2016/2017 dalla medesima popolazione trovano riscontro nei dati di letteratura sopracitati e con quanto rilevato da Aziz *et al.* (2008) in *T. vulgaris*. Tuttavia, una conferma della variabilità nella composizione chimica degli oli essenziali, in relazione ai fattori ambientali, necessita dell'acquisizione di dati micro-stazionali (es. temperatura, piovosità) e di campionamenti di materiale vegetale ripetuti per un più ampio arco temporale.

3.2.4 Comparazione tra oli essenziali di parti vegetative e fiorali

Il processo di idrodistillazione delle parti vegetative e fiorali ha evidenziato cospicue differenze tra le due matrici, in termini di resa in olio essenziale. Dalle parti vegetative è stata ottenuta una minore resa in olio rispetto a quelle fiorali. Differenze significative sono state riscontrate anche in termini di composizione.

Gli oli estratti dalle due matrici di alcuni dei *taxa* allo studio (accessioni 2017) sono stati comparati mediante analisi cluster, applicata al complesso dei composti chimici identificati.

Dal risultante dendrogramma (Fig. 14) si individuano due gruppi principali: Gruppo 1 e Gruppo 2, il quale comprende ulteriori due sottogruppi:

- sottogruppo 2a - includente gli oli delle parti vegetative;
- sottogruppo 2b - includente gli oli delle parti fiorali.

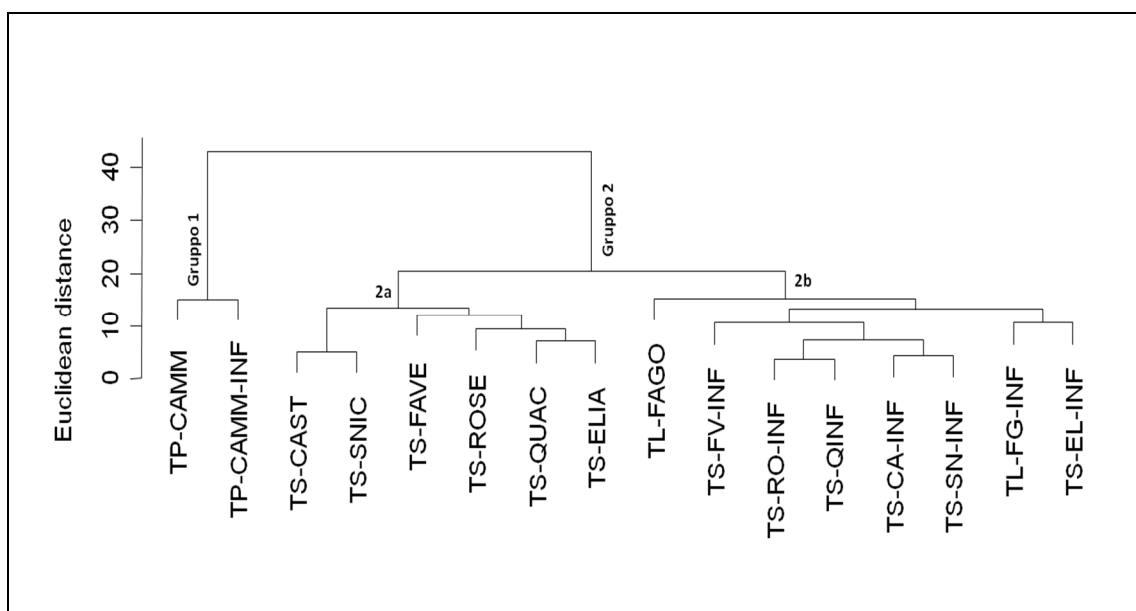


Figura 14. Dendrogramma ottenuto dall'analisi cluster in funzione della composizione chimica degli oli essenziali estratti dalle parti vegetative e fiorali (INF) di: *T. longicaulis* subsp. *longicaulis* (TL-FAGO, TL-FG-INF); *T. paronychioides* (TP-CAMM, TP-CAMM-INF); *T. spinulosus* (TS-CAST, TS-NIC, TS-FAVE, TS-ROSE, TS-QUAC, TS-ELIA, TS-FV-INF, TS-RO-INF, TS-QINF, TS-CA-INF, TS-SN-INF, TS-EL-INF). Campionamento 2017.

L'elemento che maggiormente discrimina il Gruppo 1 dal 2 è connesso a due classi di composti, i monoterpeni (idrocarburi e ossigenati) e i sesquiterpeni (idrocarburi e ossigenati) che, rispetto alla composizione complessiva, mostrano abbondanze relative alquanto differenti (Fig. 15). Gli oli del Gruppo 1, infatti, sono caratterizzati da un più basso contenuto di monoterpeni totali (60.8%) rispetto a quelli del Gruppo 2 (92.2%). Più precisamente, gli oli del Gruppo 1 hanno una concentrazione media in monoterpeni idrocarburi del 35.9% e del 24.8% in ossigenati. Negli oli del Gruppo 2, invece, la frazione ossigenata (valore medio 54.4%) prevale su quella idrocarburea (valore medio 37.7%).

I sesquiterpeni sono più rappresentati nel Gruppo 1 (valore medio del 36.5%) con una percentuale media del 26.5% gli idrocarburi e del 10% gli ossigenati. Tali composti non superano il valore medio del 5.1% negli oli del Gruppo 2 (4.5% sesquiterpeni idrocarburi e 0.6% ossigenati).

Differenze poco significative sono state rilevate in termini quantitativi tra i composti definiti come altri (OT): in entrambi i gruppi il contenuto medio è compreso tra l'1 e il 2% (Fig. 15).

I diterpeni sono invece rappresentati in tracce (0.03%) ed esclusivamente nell'olio delle parti vegetative dell'accessione TP-CAMM.

All'interno del Gruppo 2, i sottogruppi 2a e 2b includono, rispettivamente, gli oli essenziali estratti dalle parti vegetative (TS-CAST, TS-SNIC, TS-FAVE, TS-ROSE, TS-QUAC, TS-ELIA) e fiorali (TS-FV-INF, TS-RO-INF, TS-QINF, TS-CA-INF, TS-SN-INF, TS-EL-INF) delle diverse accessioni di *T. spinulosus* campionate nel 2017 nonché, gli oli di *T. longicaulis* subsp. *longicaulis*, estratti dalle parti sia vegetative che fiorali (TL-FAGO e TL-FG-INF).

I due sottogruppi 2a e 2b si differenziano per una complementarietà di contenuto delle due frazioni monoterpeniche, idrocarbura e ossigenata. Ovvero, gli oli delle parti vegetative del sottogruppo 2a hanno una più alta concentrazione in monoterpeni idrocarburi (valore medio 42.9%) rispetto a quelli del sottogruppo 2b (valore medio 34%). Tali rapporti si invertono relativamente al contenuto in monoterpeni ossigenati: 58.9% nel sottogruppo 2b e 48.7% nel 2a. I composti principali a cui è possibile correlare le suddette differenze sono: il *p*-cymene a più bassa concentrazione nel sottogruppo 2b (valore medio 9.5%) rispetto al 2a (valore medio 19.8%), e il timolo, più abbondante nel sottogruppo 2b (40.6%) rispetto al 2a (25.9%).

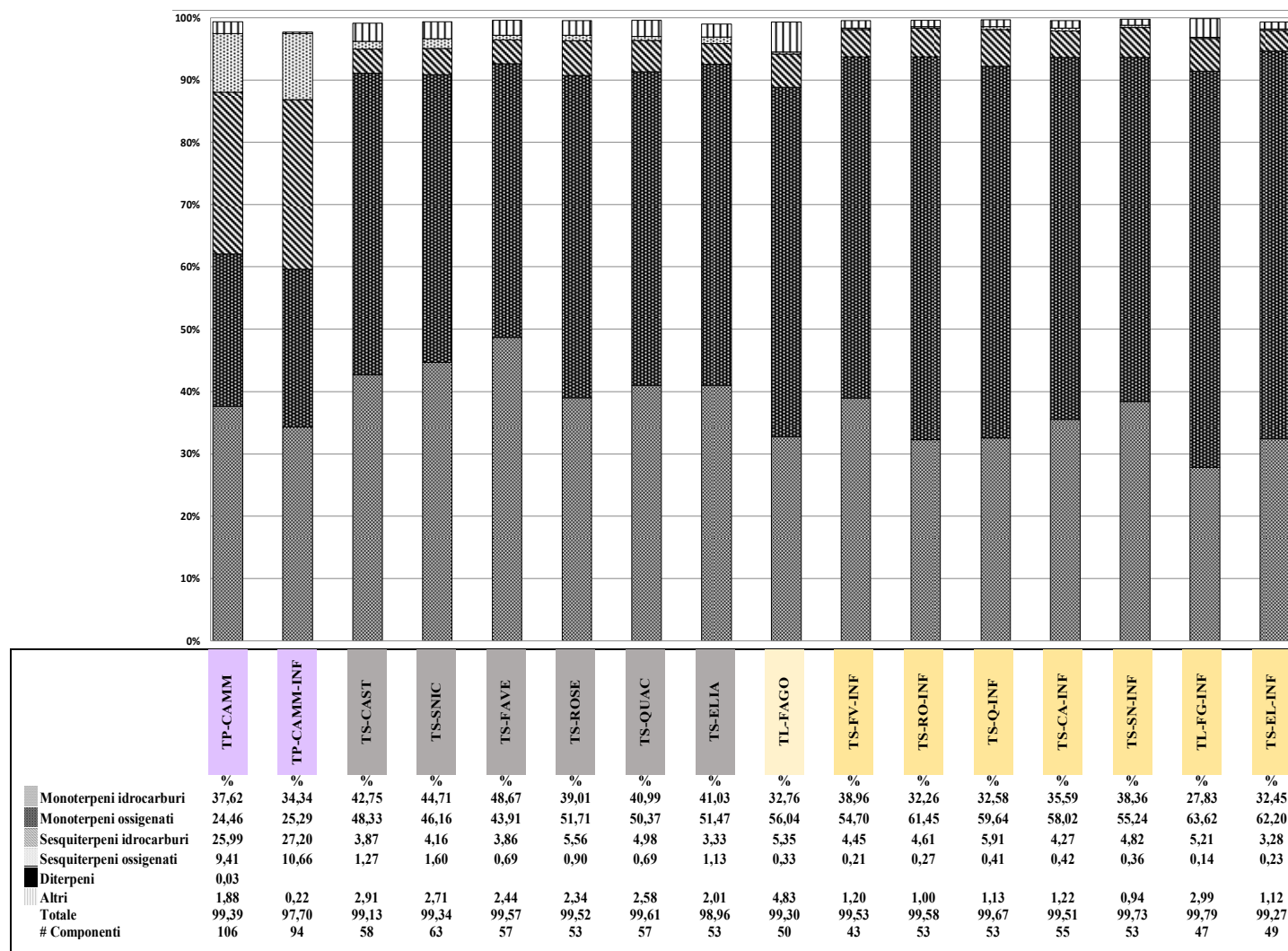


Figura 15. Percentuale relativa di ciascuna classe chimica di composti rappresentata negli oli essenziali estratti dalle parti vegetative e fiorali (INF) di: *T. longicaulis* subsp. *longicaulis* (TL-FAGO, TL-FG-INF); *T. paronychioides* (TP-CAMM, TP-CAMM-INF); *T. spinulosus* (TS-CAST, TS-NIC, TS-FAVE, TS-ROSE, TS-QUAC, TS-ELIA, TS-FV-INF, TS-RO-INF, TS-QINF, TS-CA-INF, TS-SN-INF, TS-EL-INF). Campionamento 2017. Gradazioni di colore simili (etichette asse delle ascisse) indicano affinità composizionali tra i diversi oli (Fig. 14).

3.3 Considerazioni

Analizzando complessivamente la composizione chimica dei 43 oli essenziali caratterizzati (accessioni 2016 e 2017) in relazione ai principali componenti riscontrati e alla loro abbondanza relativa (>5%), sono stati distinti i seguenti profili composizionali:

- A. *p*-cymene/ γ -terpinene/timolo, in tutti gli oli essenziali delle accessioni di *T. longicaulis* subsp. *longicaulis*;
- B. *p*-cymene/ γ -terpinene/1-8-cineolo/timolo, negli oli delle parti sia vegetative sia fiorali di un'accessione di *T. longicaulis* subsp. *longicaulis* raccolta in Calabria (TL-FAGO del 2017);
- C. *p*-cymene/ γ -terpinene/linalool/timol metil etere/timolo, in tutti gli oli essenziali estratti dalle parti vegetative delle accessioni di *T. spinulosus* raccolte in Sicilia;
- D. *p*-cymene/ γ -terpinene/linalool/timolo, negli oli essenziali estratti dalle parti vegetative delle accessioni di *T. spinulosus* raccolte in Calabria;
- E. *p*-cymene/ γ -terpinene/timol metil etere/timolo, in tutti gli oli essenziali estratti dalle parti fiorali delle accessioni di *T. spinulosus* raccolte in Sicilia e nell'olio essenziale delle parti vegetative di *T. praecox* subsp. *parvulus*;
- F. *p*-cymene/ γ -terpinene/timolo, negli oli essenziali estratti dalle parti fiorali delle accessioni di *T. spinulosus* raccolte in Calabria;
- G. timolo/geranil acetato/*E*-caryophyllene/*E*-nerolidol, nell'olio essenziale delle parti vegetative di *T. striatus* subsp. *striatus*;
- H. *p*-cymene/limonene/ γ -terpinene/carvacrol methyl ether/ β -bisabolene, negli oli essenziali di *T. richardii* subsp. *nitidus*;
- I. *p*-cymene/ γ -terpinene/timolo/carvacrolo, nell'olio essenziale delle parti vegetative di *T. vulgaris* subsp. *vulgaris*;
- J. myrcene/limonene/*E*-caryophyllene/germacrene D, negli oli essenziali delle parti vegetative e fiorali delle diverse accessioni di *T. paronychioides*;
- K. myrcene/limonene/*cis*-pinocarvylacetate*/*E*-caryophyllene/germacrene D, nell'olio essenziale delle parti vegetative in *Thymus* sp.

Confrontando la composizione degli oli essenziali estratti dalle accessioni provenienti da coltivazione in vivaio (TS-FARO e TR-FARO) con quella dei corrispondenti oli estratti da materiale vegetale campionato in natura (TS-QUAC e TR-MARE), non sono state riscontrate differenze rilevanti.

Comparando i profili aromatici dei *taxa* allo studio con i dati bibliografici disponibili in letteratura è emerso che il profilo aromatico da noi indentificato per *T. richardii* subsp. *nitidus*, contraddistinto da un elevato contenuto in β -bisabolene, coincide con quello descritto da Bader *et al.* (2001) e da Llorens *et al.* (2014).

Per *T. vulgaris*, trattandosi di una specie polimorfica sotto il profilo chimico, sono noti, invece, differenti chemotipi (Passet, 1971; Granger & Passet, 1973; Vernet *et al.*, 1986; Stahl-Biskup, 2002).

I risultati ottenuti dalla caratterizzazione chimica di *T. longicaulis* subsp. *longicaulis* confermano quanto rilevato da altri Autori (Kuštrak *et al.*, 1990; Baser *et al.*, 1993; De Martino *et al.*, 2009; Grujic-Jovanovic *et al.*, 2009) che hanno appurato una prevalenza di monoterpeni (idrocarburi e ossigenati), rispetto ad altri componenti (ad es. sesquiterpeni), negli oli essenziali di accessioni provenienti da differenti aree geografiche.

Tuttavia, tra gli oli essenziali analizzati nel presente studio e quelli caratterizzati da altri Autori, delle differenze quali-quantitative sono state riscontrate nei composti principali. Anche *T. longicaulis* è, infatti, una specie nota per le molteplici forme chimiche (Baser *et al.*, 1993).

Relativamente alla composizione chimica dell'olio essenziale di *T. praecox* subsp. *parvulus* non è stato rintracciato alcun riferimento in letteratura, pur essendo disponibili dati riguardanti altre subspecie e varietà. Negli oli essenziali di *T. praecox* subsp. *penyalarensis*, ad esempio, sono stati rilevati tra i componenti principali il timolo (18.5%), il *p*-cymene (14.6%), il carvacrolo (11.6%) e il γ -terpinene (10.1%) (Blanco *et al.*, 2012). Tre di questi (timolo, *p*-cymene, γ -terpinene), seppur con concentrazioni differenti, caratterizzano l'olio essenziale di *T. praecox* subsp. *parvulus*, analizzato nella presente indagine. Nel lavoro di Baser *et al.* (1996) sugli oli essenziali estratti da *T. praecox* subsp. *skorpilii* var. *laniger* e *T. praecox* subsp. *grossheimii* var. *grossheimii* (Turchia), è riportato un elevato contenuto in timolo (17.8-41.4%), analogamente a quanto riscontrato in *T. praecox* subsp. *parvulus* (41.4%, valore medio dei campioni del 2016 e 2017).

Studi condotti su campioni di *T. striatus* subsp. *striatus*, provenienti dalle Marche, hanno evidenziato una prevalenza di β -myrcene, γ -terpinene, borneol, β -caryophyllene e β -cubebene nell'olio essenziale estratto dalle parti vegetative (Bini Maleci *et al.*, 1997). Tali dati non coincidono con quanto da noi riscontrato per *T. striatus* subsp. *striatus*, caratterizzato da un'alta concentrazione di timolo (6.4%), geranyl acetate (19.5%), *E*-caryophyllene e *E*-nerolidol (16.6%) e da un basso contenuto in borneol (1.1%).

Il profilo chimico degli oli essenziali di *T. spinulosus* della Sicilia è stato descritto da De Feo *et al.* (2003). Tuttavia, il confronto composizionale tra i dati di letteratura e i nostri dati

sperimentali fa emergere molteplici differenze. Un'analisi di dettaglio ha evidenziato la presenza nei campioni analizzati da De Feo *et al.* (2003) di: un elevato contenuto in sesquiterpeni (es. *E*-caryophyllene); un'alta concentrazione in myrcene e limonene; una bassa in timolo tra i monoterpeni. Il profilo chimico degli oli essenziali di tutte le accessioni di *T. spinulosus* da noi analizzate, di contro è nettamente dissimile poichè caratterizzato da una prevalenza di *p*-cymene, γ -terpinene, linalool, timol metil etere e timolo.

Nondimeno, sono state rilevate delle similarità tra la composizione chimica degli oli essenziali di *T. spinulosus* descritti da De Feo *et al.* (2003) e quelli di *T. paronychioides* da noi caratterizzati. Inoltre, entrambe le accessioni (*T. spinulosus* e *T. paronychioides*) provengono da Rocca Busambra (PA), *locus classicus* di *T. paronychioides* (Bartolucci & Domina, 2015). Le analogie riscontrate avvalorano quindi l'idea che *T. spinulosus* di Rocca Busambra, come confermato dal lavoro di revisione di Bartolucci & Domina (2015) e dalla nostra indagine chemotassonomica, è da riferire a *T. paronychioides*.

CAPITOLO 3

ATTIVITÀ DEGLI OLI ESSENZIALI DI *THYMUS* SPP. SU GERMINAZIONE E CRESCITA DI PIANTE INFESTANTI

1. INTRODUZIONE

A partire dal XX secolo l'introduzione di sostanze chimiche di sintesi, per la gestione delle piante infestanti e la lotta ai parassiti responsabili di diverse patologie nelle piante, ha profondamente trasformato il panorama agricolo mondiale. Il vantaggio generato dall'incremento nella produttività e dalla riduzione dei costi di gestione, anche per la diffusione di piante transgeniche resistenti agli erbicidi ha determinato, tuttavia, un rilevante impatto a livello sia ambientale sia ecologico (Soule *et al.*, 1990; Stoate *et al.*, 2009).

Gli erbicidi, i pesticidi e i fertilizzanti sintetici impiegati a elevate concentrazioni, in ambiente urbano e negli agroecosistemi, possono contribuire ai fenomeni di inquinamento ed eutrofizzazione degli habitat acquatici, causare direttamente o indirettamente la perdita di biodiversità (Altieri, 1999; Geigera, 2010), costituire un potenziale rischio per la salute umana (Weisenburger, 1993), a causa delle contaminazioni del suolo e delle falde acquifere (Juhler *et al.*, 2001; 2008; Ren *et al.*, 2010) e della loro persistenza come residui tossici nei prodotti agricoli. Un'altra rilevante problematica correlata all'utilizzo degli erbicidi di sintesi è la loro capacità di esercitare, insieme alle tecniche colturali adottate, una pressione selettiva sulle specie infestanti, tale da indurre una più rapida insorgenza di biotipi resistenti (Prather *et al.*, 2000; Palumbi, 2001) e, di conseguenza, impoverire ulteriormente i livelli di biodiversità (Watkinson *et al.*, 2000).

Secondo l'*International Survey of Herbicide Resistant Weeds* (dati disponibili su www.weedscience.com, accesso al sito settembre 2018), che monitora il fenomeno a livello mondiale, sono 255 le specie (148 dicotiledoni e 107 monocotiledoni) che allo stato attuale hanno evoluto una forma di resistenza a 163 differenti tipologie di erbicidi.

Nell'ultimo ventennio, la crescente preoccupazione collettiva degli effetti negativi sugli organismi viventi (Barinaga, 1990; Marrs & Frost, 1997) e sull'ambiente derivante dall'uso dei diserbanti o dei loro prodotti di degradazione (Kolpin *et al.*, 1998), ha contribuito alla predisposizione e armonizzazione, soprattutto a livello Europeo, di normative atte a regolamentare la commercializzazione e l'utilizzo dei prodotti fitosanitari (Regolamenti CE, n. 1107/2009 e n. 396/2005).

I cambiamenti climatici, le comprovate conseguenze dell'intensa e spesso invasiva attività antropica a livello ecosistemico (Graber *et al.*, 1995) e la crescita della popolazione mondiale hanno ulteriormente contribuito a rendere necessaria l'attuazione di modelli di produzione e consumo più sostenibili, compatibili con la conservazione e la durevole utilizzazione delle risorse del pianeta.

Tali tematiche, sulle quali si è focalizzata l'attenzione del mondo scientifico, hanno promosso linee di ricerca volte ad individuare tra le sostanze naturali nuove molecole o composti, con

differenti meccanismi d'azione, biodegradabili e possibilmente privi di dannosi o indesiderati effetti collaterali, per la formulazione di prodotti ecocompatibili da impiegare in campo agronomico e nella difesa fitosanitaria (Dudai *et al.*, 1999; Duke *et al.*, 1999; 2000; Tworkoski, 2002; Isman *et al.*, 2011).

In tal senso, un particolare interesse è stato rivolto, negli ultimi decenni, allo studio delle interazioni allelopatiche tra colture e piante infestanti, come potenziale strategia, a più basso impatto ambientale, da sfruttare in campo agronomico (Putnam & Duke, 1978; Putnam, 1988; Weston, 1996; Dudai *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 2003).

L'allelopatia è comunemente definita come l'influenza diretta o indiretta che una pianta esercita sullo sviluppo e la crescita di un'altra mediante il rilascio di composti chimici (allelochimici) nell'ambiente (Molisch, 1937; Muller *et al.*, 1964; Rice, 1984; Inderjit & Duke, 2003). Questi ultimi sono metaboliti secondari, prodotti da diversi organi della pianta (Rice, 1984), coinvolti nelle interazioni ecosistemiche, nei meccanismi di difesa contro patogeni e/o eventuali competitori (insetti ed altre piante poste nelle vicinanze) e in un'ampia gamma di processi metabolici (Singh *et al.*, 1999).

Alcune sostanze allelopatiche possono avere un effetto fitotossico poiché capaci di inibire la germinazione dei semi o la crescita delle plantule, interferire con i processi fisiologici di fotosintesi e respirazione o alterare il bilancio idrico e l'attività enzimatica (Weir *et al.*, 2004). Tra le sostanze isolate dalle piante superiori, sono stati identificati svariati composti ad azione fitotossica quali: fenoli, derivati dell'acido cinnamico (Rice, 1984), cumarine, flavonoidi, alcaloidi, aminoacidi (Friedman & Waller, 1983; Waller, 1989; Dudai *et al.*, 1999) e terpenoidi, inclusi i terpeni volatili quali mono e sesquiterpeni, che rappresentano i principali costituenti degli oli essenziali (Fischer, 1986; Elakovich, 1988; Setia *et al.*, 2007; Rahimi *et al.*, 2013).

Gli oli essenziali sono complesse miscele di molteplici composti chimici, particolarmente abbondanti in alcune famiglie botaniche (*Apiaceae*, *Asteraceae*, *Cupressaceae*, *Lamiaceae*, *Lauraceae*, *Myrtaceae*, *Rutaceae*, *Liliaceae*, *Pinaceae* e *Zingiberaceae*), che si ottengono per distillazione in corrente di vapore o idrodistillazione di diverse porzioni della pianta (foglie, fiori, fusti, frutti, corteccia, radici), oppure mediante processi meccanici applicati quasi esclusivamente all'ottenimento di oli essenziali dall'epicarpo degli agrumi. In natura gli oli essenziali svolgono un importante ruolo ecologico nelle interazioni pianta-pianta, pianta-animale e pianta-ambiente; agiscono da repellenti contro i predatori o da attrattori per gli impollinatori; possono essere coinvolti nei meccanismi di adattamento al clima arido, limitando le perdite d'acqua della pianta stessa.

La loro sintesi e composizione è influenzata da molteplici fattori sia biotici sia abiotici (Figueiredo *et al.*, 2008)

La capacità degli oli essenziali o in generale delle sostanze allelopatiche di inibire o ritardare la germinazione e l'accrescimento delle plantule è stata indagata in diversi studi, soprattutto in relazione alle potenziali applicazioni in campo agronomico, come alternativa agli erbicidi di sintesi (Asplund, 1968; Duke, 1986; Elakovich, 1988; Vyvyan, 2002; Singh *et al.*, 2003; Batish *et al.*, 2007; Dayan *et al.*, 2009).

In letteratura sono ben documentati gli effetti fitotossici degli oli essenziali estratti da specie della famiglia delle *Myrtaceae* (Kohli *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 2005; Verdeguer *et al.*, 2009; Kordali *et al.*, 2016), *Asteraceae* (Chon *et al.*, 2003; Mancini *et al.*, 2011; Benvenuti *et al.*, 2017), *Rutaceae* (De Feo *et al.*, 2002) e *Lamiaceae* (Tworkoski, 2002; Arminante *et al.*, 2006; Batish *et al.* 2012).

Diversi Autori hanno anche descritto gli effetti di singoli componenti degli oli essenziali (Angelini *et al.*, 2003; Nishida *et al.* 2005; Kordali *et al.*, 2007; Ahuja *et al.*, 2014; 2015) sulla germinazione dei semi di diverse specie infestanti (es. *Amaranthus* spp., *Chenopodium album* L., *Portulaca oleracea* L., *Rumex crispus* L., *Lolium perenne* L.) e coltivate (es. *Lycopersicon esculentum* Mill., *Lactuca sativa* L., *Raphanus sativus* L.), al fine di determinarne la capacità di inibizione anche sul successivo accrescimento delle plantule.

Tra le *Lamiaceae*, gli oli essenziali e gli estratti acquosi di diverse specie del genere *Thymus* sono stati ampiamente indagati dal punto di vista composizionale e in particolare per le loro molteplici attività biologiche. In numerosi lavori è documentata l'attività degli oli essenziali o di loro costituenti come antimicrobici (Tepe *et al.* 2004; Dob *et al.*, 2006; Lopez *et al.* 2007; De Martino *et al.* 2009; Heni *et al.*, 2015), antiossidanti (Miguel *et al.*, 2004; Delgado *et al.*, 2014), antimicotici (Šegvic *et al.*, 2007; Soković *et al.*, 2009; Mota *et al.*, 2012), antitumorali (Khadir *et al.*, 2016), alghicidi (Tebaa *et al.*, 2017), repellenti contro insetti (Park *et al.*, 2005). Prodotti a base di olio essenziale di varie specie di *Thymus* o di altri generi sono oggi disponibili come insetticidi ad ampio spettro (Dayan *et al.*, 2009).

In tempi più recenti, la fitotossicità degli oli essenziali di *Thymus* è stata analizzata in condizioni sperimentali da vari Autori (Aziz *et al.*, 2010), ma la maggior parte degli studi hanno riguardato solo *T. vulgaris* (Angelini *et al.*, 2003; Uremis *et al.*, 2009; Grosso *et al.*, 2010; Rolim de Almeida *et al.*, 2010; Synowiec *et al.*, 2017). In un interessante lavoro condotto da Linhart *et al.* (2015), sono state indagate le complesse interazioni a livello di comunità vegetali e sono stati studiati gli effetti, in differenti condizioni, di quattro diversi chemotipi di *T. vulgaris* sulla germinazione, crescita e sopravvivenza delle plantule in varie specie target.

In generale gli oli essenziali offrono interessanti prospettive sia per la formulazione di prodotti da impiegare come erbicidi naturali a più basso impatto ambientale, per la rapida volatilizzazione e la trascurabile residualità; sia per l'identificazione di nuove molecole con meccanismi d'azione diversi da quelli degli erbicidi di sintesi. Negli Stati Uniti ad esempio, formulati a base di oli essenziali di citronella (*Cymbopogon* sp.) o di *Pinus sylvestris* L. (Dayan *et al.*, 2009; Dayan & Duke, 2010) sono già commercializzati come erbicidi naturali in agricoltura biologica, poiché in grado di distruggere la cuticola e provocare il disseccamento dei tessuti nelle giovani plantule.

Sebbene la degradabilità degli oli essenziali costituisca un vantaggio, dall'altro gli elevati costi di estrazione in termini energetici, l'elevata volatilità e la limitata solubilità in acqua ne hanno limitato l'applicabilità, su larga scala, in agricoltura. In tal senso, l'ingegneria chimica e le nanotecnologie, che impiegano particelle di dimensioni nanometriche (Schummer, 2004), possono fornire un valido supporto tecnologico per ovviare a tali limitazioni e migliorare le formulazioni a base di oli essenziali (Fernandes *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2015). Le suddette tecnologie rappresentano un grande potenziale per incrementare la solubilità, la disponibilità e la stabilità di componenti biologicamente attivi (Cheng *et al.*, 2016; Fraceto *et al.*, 2016; Prasad *et al.*, 2017), rallentare la degradazione di composti sensibili alla luce e alle alte temperature. Nell'ultimo decennio, infatti, è cresciuto notevolmente l'interesse verso lo sviluppo di formulazioni sempre più sofisticate, quali le nanoemulsioni o le nanoparticelle, da utilizzare come sistemi di trasporto di componenti lipofili, quali gli oli essenziali (Parris *et al.*, 2005).

Le nanoemulsioni (O/A olio essenziale-acqua) sono sistemi eterogenei costituiti da una fase oleosa dispersa sotto forma di piccolissime gocce (10-100 nm) in una fase esterna continua (acqua) (McClements & Rao, 2011). Esse hanno molteplici vantaggi in relazione alle piccole dimensioni, alla stabilità fisica, alla trasparenza ottica, all'elevata biodisponibilità (Ghosh *et al.*, 2013; Donsi & Ferrari, 2016). Per i suddetti vantaggi, rappresentano un grande potenziale da utilizzare in campo agronomico come larvicidi (Ghosh *et al.*, 2013), repellenti (Pascual-Villalobos *et al.*, 2017) e per il controllo delle piante infestanti (Hazrati *et al.*, 2017). Le particelle, prodotte con vari processi di incapsulamento -lo spray-drying è tra i più diffusi - possono essere realizzate con varie tipologie di matrici, inclusi polimeri biodegradabili, lipidi e proteine (Kah *et al.*, 2013; Grillo *et al.*, 2016; Synowiec *et al.*, 2016).

Tra le diverse matrici impiegate nei processi di microincapsulamento degli oli essenziali o di loro costituenti, la zeina -principale proteina di riserva del mais (*Zea mays*) - è ampiamente utilizzata per le sue promettenti caratteristiche quali la biocompatibilità, la biodegradabilità, la bassa tossicità e i ridotti costi di produzione (Paliwal & Palakurthi, 2014; De Oliveira *et al.*,

2018). In diversi studi la zeina è stata utilizzata come agente incapsulante per veicolare composti naturali dei quali sono stati saggiati gli effetti come repellenti contro insetti (De Oliveira *et al.*, 2018), antiossidanti (Wu *et al.*, 2012b) e antimicrobici (Chen *et al.*, 2015).

In alcune ricerche è stato osservato che gli oli essenziali di origano e di timo microincapsulati non solo hanno mantenuto la loro attività antimicotica e antibatterica ma ne è stata anche incrementata la loro stabilità (Da Costa *et al.* 2012; Del Toro-Sanchez *et al.* 2010). Saggi sugli oli essenziali microincapsulati o nanoemulsionati, mediante vari processi e sostanze, sono stati condotti per valutare gli effetti anche su germinazione e crescita di diverse piante infestanti (Synowiec *et al.*, 2016; Synowiec & Drozdek, 2016) o coltivate (Scarfato *et al.*, 2007).

Obiettivi e scopo dello studio

Altro obiettivo perseguito dalla presente ricerca è stata la valutazione dell'effetto di differenti oli essenziali di *Thymus*, *in vitro* e *in vivo*, su semi e plantule di diverse specie target, allo scopo di individuare oli capaci di inibire la germinazione e l'accrescimento di piante infestanti, comunemente diffuse in ambiente Mediterraneo.

Lo studio della fitotossicità degli oli essenziali, per un loro potenziale utilizzo come erbicidi naturali, occupa, allo stato attuale e a livello globale, un ruolo chiave in un'ottica di gestione integrata e più sostenibile degli agro-ecosistemi.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Materiale vegetale per i saggi di bioattività *in vitro* e *in vivo*

Per saggiare *in vitro* e *in vivo* l'attività biologica degli oli essenziali delle differenti specie del genere *Thymus* allo studio sono stati utilizzati semi di 5 specie infestanti di interesse agrario: *Amaranthus blitum* L., *Amaranthus retroflexus* L., *Portulaca oleracea* s.l. (dicotiledoni), *Avena fatua* L. ed *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv. (monocotiledoni) e semi di *Lepidium sativum* L. (dicotiledone), specie coltivata e comunemente impiegata nei saggi di tossicità per la rapida germinabilità e l'elevata sensibilità alle sostanze tossiche (APAT, 2004).

I semi di *A. blitum*, *A. retroflexus* e *P. oleracea* s.l., conservati presso la Banca del Germoplasma del Dipartimento di Scienze Biologiche, Geologiche e Ambientali dell'Università degli Studi di Catania, sono stati raccolti da popolazioni naturali all'inizio della disseminazione in diverse aree della provincia di Catania (Tab. 1). Le cariossidi (da ora in avanti denominate semi) di *E. crus-galli* (forma frumentacea) e *A. fatua* (biotipo senza dormienza) sono state acquistate presso l'azienda Herbiseed (New Farm, Mire Lane, West End, Twyford England), specializzata nella commercializzazione di sementi. I semi di *L. sativum* (Sgaravatti, al 96% di purezza e 85% germinabilità) sono stati acquistati presso rivenditori autorizzati.

Tabella 1. Specie infestanti e coltivate per i saggi di bioattività. Per le specie campionate in natura sono riportate: data di raccolta, località (comune e prov.), altitudine (m s.l.m.), coordinate geografiche del sito di raccolta.

Specie	Data di raccolta	Comune	Prov.	Altitudine (ms.l. m.)	Coordinate geografiche WGS84	
					N	E
<i>A. blitum</i>	29.09.2012	Fiumefreddo di Sicilia	Catania	126	37° 48' 09.91"	15° 11' 48.72"
<i>A. retroflexus</i>	16.08.2013	Castiglione di Sicilia	Catania	624	37° 51' 51.41"	15° 07' 00.70"
<i>Portulaca oleracea</i> s.l.	19.10.2013	Catania	Catania	77	37° 31' 07.52"	15° 04' 16.31"
<i>Avena fatua</i>	New Farm, Mire Lane, West End, Twyford England					
<i>Echinochloa crus-galli</i>	New Farm, Mire Lane, West End, Twyford England					
<i>Lepidium sativum</i>	Azienda Sgaravatti					

2.2 Preparazione delle nanoemulsioni

Le emulsioni e le nanoemulsioni (olio essenziale-acqua – O/A) con l'olio essenziale di *T. spinulosus* (TS-FARO 2016) sono state preparate adottando la tecnica dell'omogeneizzazione ad alta pressione (HPH) (Donsì *et al.*, 2012).

Le emulsioni sono state allestite disperdendo una fase oleosa, costituita dall'olio essenziale di *T. spinulosus* (0.25% p/p) preliminarmente miscelato con olio di semi di girasole (proporzione 1:4 in peso) all'1% (p/p), a una fase acquosa, includente un emulsionante idrofilico allo 0.75% (p) di polisorbato 80 (Tween 80, T80 - Sigma-Aldrich, Milano, Italia), o all'1.25% di proteine del siero del latte (WPI – VolactiveUltraWhey 90, VolacSocoor S.r.l., Italia), o al 2.5% di Gomma Arabica (GA – Sigma-Aldrich, Milano, Italia). Le proporzioni fanno riferimento al totale della formulazione.

Tali emulsioni (emulsioni primarie) sono state ottenute usando un Ultra Turrax T25 (IKA Labortechnik, Germany) a 20.000 rpm per 4 min, mantenendo i campioni in un bagno di ghiaccio.

Successivamente, le emulsioni primarie sono state sottoposte ad un trattamento di omogeneizzazione ad alta pressione (high pressure homogenization – HPH) in tre passaggi a 200 MPa per produrre emulsioni di dimensioni nanometriche (nanoemulsioni). Ciò, ricorrendo ad un sistema equipaggiato di valvola con un orifizio del diametro di 100 µm (modello WS1973, Maximator JET GmbH, Schweinfurt, Germany). Dopo ogni passaggio, le emulsioni sono state raffreddate a 5°C mediante uno scambiatore di calore montato immediatamente a valle della valvola, al fine di preservare la degradazione o la volatilizzazione dell'olio essenziale.

Per confronto, sono state preparate anche nanoemulsioni vergini (controlli), sostituendo l'olio essenziale con l'olio di semi di girasole.

2.3 Preparazione delle nanoparticelle di zeina

Le nanoparticelle di zeina sono state ottenute utilizzando una variante del metodo di precipitazione per antisolvente (Patel *et al.*, 2010). Inizialmente, è stata predisposta una soluzione stock composta da un solvente binario etanolo/acqua (proporzione in peso 80:20) in cui sono stati disciolti 27 mg/g di zeina (Sigma-Aldrich, Milano, Italia), usando un agitatore magnetico per una notte. L'olio essenziale di *T. spinulosus*, successivamente, è stato disperso nella soluzione stock alla concentrazione di 7.9 mg/g. Le nanoparticelle sono state preparate versando rapidamente 48 g della soluzione alcolica in 140 g di acqua Milli-Q, contenente maltodestrine (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) alla concentrazione di 4.5 mg/g, usando un agitatore magnetico (1000 rpm-modello EM3300TLabotech Inc, Germany). Tale

concentrazione, scelta sulla base di precedenti studi (Donsì *et al.*, 2017) e preliminari esperimenti, è idonea a evitare fenomeni di flocculazione (Davidov-Pardo *et al.*, 2015).

Le dispersioni (con e senza olio essenziale, come controllo) sono state sottoposte a rimozione dell'etanolo in condizioni di sottovuoto (50 ± 5 mbar, 35°C), utilizzando un evaporatore rotante (Rotavapor R-114, Buchi, Switzerland). Il pH della dispersione è stato stabilizzato a 4.0 ± 0.1 . La concentrazione finale di olio raggiunta, dopo la rimozione dell'etanolo, è stata dello 0.25% (p/p).

2.3.1 Dimensione media delle nanoparticelle e potenziale- ζ

La dimensione media delle particelle e il potenziale- ζ del campione sono stati determinati a 25°C usando un nanogranulometro a diffusione dinamica della luce, equipaggiato con un analizzatore di potenziale- ζ (Zetasizer Nano ZS – Malvern Instruments, Worcestershire, UK).

I campioni, disposti in cuvette monouso da 3 mL, sono stati caricati nella cella termostata del sistema, con un tempo di stabilizzazione di 5 min. Sulla base dei dati di diffusione dinamica della luce e di mobilità elettroforetica sono stati ottenuti il diametro medio delle particelle (d_H) e l'indice di polidispersione (PdI), utilizzando l'equazione di Stokes-Einstein, il potenziale- ζ utilizzando il modello di Smoluchowsky. Il diametro medio delle particelle è stato misurato nei campioni non diluiti, mentre il potenziale- ζ su campioni diluiti 1:10 con acqua bidistillata al pH corretto rispetto a quello del sistema iniziale (pH 7 per le emulsioni, pH 4 per le particelle di zeina).

Le nanoemulsioni e le nanoparticelle di zeina sono state preparate dal Prof. Donsì del Dipartimento di Ingegneria Industriale dell'Università degli Studi di Salerno.

2.4 Test di germinazione *in vitro* con oli essenziali “tal quali”

Nei test *in vitro* è stata analizzata l'attività biologica e l'effetto dose-risposta di 7 oli essenziali *tal quali*, estratti dalle parti vegetative di *T. longicaulis* subsp. *longicaulis* (accessione TL-FAGO-2017), *T. paronychioides* (accessioni TP-VENT-2017 e TP-CAMM-2017), *T. praecox* subsp. *parvulus* (accessione T-PRAEX-2017), *T. richardii* subsp. *nitidus* (accessione TR-MARE -2017), *T. spinulosus* (accessione TS-FAVE-2017) e *T. vulgaris* subsp. *vulgaris* (TV-LIGU-2017), sulla germinazione dei semi di due dicotiledoni (*A. retroflexus* e *P. oleracea* s.l.) e due monocotiledoni (*A. fatua* ed *E. crus-galli*).

Gli esperimenti sono stati condotti nei laboratori dell'Università Politecnica di Valencia e in quelli dell'Università degli Studi di Catania, applicando il protocollo Verdeguer *et al.*, (2009). La composizione chimica dettagliata di ciascuno dei sopraelencati oli è riportata in Tabella 4 (Cap. 2).

In particolare, a causa delle basse rese in olio essenziale di alcune delle specie sopra elencate e, pertanto delle limitate disponibilità in oli, i test di valutazione “in vitro” (utilizzando gli oli *tal quali*) sono stati condotti così come di seguito specificato:

- ✓ cinque concentrazioni (0.125µL; 0.25µL; 0.5µL; 1µL; 2µL/mL) per gli oli essenziali di *T. longicaulis* subsp. *longicaulis*, *T. praecox* subsp. *parvulus*, *T. spinulosus* e *T. vulgaris* subsp. *vulgaris* testate su semi di *A. retroflexus*, *P. oleracea* s.l., *A. fatua* ed *E. crus-galli*;
- ✓ tre concentrazioni (0.125µL; 0.25µL; 0.5µL/mL) per l'olio di *Thymus paronychioides* (accessione TP-VENT-2017), testate su semi di *A. retroflexus* e su cariossidi di *E. crus-galli*;
- ✓ tre concentrazioni per l'olio essenziale di *T. paronychioides* (accessione TP-CAMM) testate su semi di *A. retroflexus*, e due (0.125µL e 0.25µL/mL) saggiate su cariossidi di *E. crus-galli*;
- ✓ una concentrazione (0.125µL /mL) per l'olio essenziale di *T. richardii* subsp. *nitidus* saggiata su semi di *A. retroflexus*.

I test di germinazione sono stati effettuati in piastre Petri del diametro di 9 cm, rivestite con due dischi di carta da filtro, dello spessore di 60 g/m², imbibiti con 2.5 o 3 mL (in funzione della dimensione dei semi) di acqua distillata sui quali sono stati distribuiti i semi delle diverse specie target. A loro volta, i semi sono stati coperti con altri due dischi di carta da filtro. Questi ultimi sono stati imbibiti con ulteriori 2.5 mL (*A. retroflexus* e *P. oleracea* s.l.) o 3 mL (*E. crus-galli* e *A. fatua*) di acqua distillata e volumi variabili di olio essenziale *tal quale*, aggiunto mediante micropipetta, al fine di ottenere concentrazioni (dosi) di 0.125µL; 0.25µL; 0.5µL; 1µL; 2µL/mL. Per ogni trattamento e i relativi bianchi di controllo (solo

acqua distillata) sono state allestite 5 repliche di 20 semi (*A. retroflexus*, *P. oleracea* s.l.) o 10 repliche di 10 semi (*A. fatua*, *E. crus-galli*). Il differente numero di semi per piastra, tra dicotiledoni e monocotiledoni, è dipeso dalle dimensioni delle diaspore. Tutte le piastre, opportunamente sigillate con Parafilm, sono state incubate alla temperatura alterna di 30/20°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) con fotoperiodo di 16/8h di luce/buio. Le condizioni di incubazione sono state scelte sulla base sia di precedenti studi sia di test preliminari (Angelini *et al.*, 2003; Verdeguer *et al.*, 2009; Verdeguer, 2011).

Per i test effettuati in Spagna (oli impiegati TL-FAGO, T-PRAEX e TS-FAVE, accessioni 2017) è stata utilizzata una camera di crescita (EQUITEC, Spain) munita di lampade fluorescenti (Spectralux® Plus NL 36W/840, Germany); per quelli realizzati nella Banca del Germoplasma del Dipartimento di Scienze biologiche, geologiche e ambientali dell'Università degli Studi di Catania (oli impiegati TP-VENT, TR-MARE e TP-CAMM, accessioni 2017) è stata utilizzata una camera termostatica modello MCT 200 (Angelantoni Scientifica, Italia), munita di lampade fluorescenti (OSRAM L 8W/640).

Per ciascuna specie target è stato rilevato il numero di semi germinati (ogni seme è stato considerato germinato quando la radichetta ha raggiunto una lunghezza ≥ 1 mm) (Bewley & Black, 1985) e la lunghezza delle plantule, attraverso la misura di radichetta e ipocotile nelle dicotiledoni, della radichetta più lunga e del germoglio nelle monocotiledoni.

La lettura delle piastre è stata effettuata al 3°, 5°, 7°, 10°, 14° giorno dall'incubazione; durante il monitoraggio sono state acquisite delle immagini digitali, successivamente analizzate per misurare la lunghezza di radichette e ipocotile/germoglio, con l'ausilio del programma Digimizer image analysis (© MedCalc Software bvba, Belgium).

A ogni controllo le piastre sono state nuovamente sigillate con Parafilm senza ulteriore aggiunta di olio o acqua; ogni trattamento ha avuto una durata complessiva di 14 giorni. L'effetto degli oli essenziali su ogni singola specie target è stato determinato calcolando l'indice di inibizione della germinazione (GI), in percentuale, applicando la seguente formula (Muller *et al.*, 1964):

$$GI = \left[\frac{GC - GT}{GC} \right] \times 100$$

in cui GC corrisponde al numero di semi germinati nel controllo e GT al numero di semi germinati in ogni trattamento;

La determinazione dell'effetto sull'accrescimento delle plantule è stata ottenuta attraverso la formula di Chou *et al.* (1978):

$$\% \textit{Fitotossicità} = \frac{LC - L T}{LC} \times 100$$

in cui LC e LT corrispondono, rispettivamente, alla lunghezza della radichetta e/o dell'ipocotile/germoglio delle plantule nel controllo e nei diversi trattamenti.

2.5 Test di germinazione *in vitro* con olio essenziale *Thymus spinulosus* in nanoemulsione e in nanoparticelle

Le differenti nanoemulsioni (T80, WPI, GA) e le nanoparticelle (Z), preparate con l'olio essenziale di *T. spinulosus* (accessione TS-FARO 2016) sono state saggiate *in vitro* su tre diverse specie infestanti (*A. blitum*, *A. retroflexus*, *P. oleracea* s.l.) e una specie coltivata (*L. sativum*).

Le differenti dosi sono state allestite diluendo un volume variabile di formulazione (T80, WPI, GA, Z) in acqua distillata, tenendo la soluzione su un agitatore magnetico (ARE, VELP Scientifica, Italia). Per ciascuna nanoemulsione sono state saggiate, complessivamente, 7 concentrazioni: 0.0006%; 0.0012%; 0.0025%; 0.005%; 0.01%; 0.02% e 0.03% (v/v).

Nei test di germinazione sono state utilizzate piastre Petri in vetro del diametro di 9 cm e tre dischi di carta da filtro dello spessore di 60 g/m² come substrato, imbibiti con 5.5 mL di soluzione alla concentrazione nota.

Per ogni trattamento e per tutte le specie target, sono state predisposte 4 repliche di 25 semi. Tutte le piastre sono state opportunamente sigillate con Parafilm e incubate, in relazione alla temperatura ottimale di germinazione della specie target, in camere termostatiche (modello MCT 200, marca Angelantoni scientifica, Italia). Le piastre con i semi di *A. retroflexus* e *A. blitum* sono state incubate a 30°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) con fotoperiodo di 12h/12h luce/buio; quelli di *P. oleracea* s.l. a 25°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), con fotoperiodo di 12/12h luce/buio; quelli di *L. sativum* a 25°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), al buio continuo (0/24h). Le condizioni termiche sono state scelte sulla base di dati bibliografici e di preliminari esperimenti (Cristaudo *et al.*, 2014; 2016). Per singola specie sono stati eseguiti i relativi bianchi di controllo: T80, WPI, GA, Z, acqua distillata.

La lettura delle piastre è stata effettuata dopo 4 giorni di incubazione (96h), conteggiando i semi germinati e rilevando la lunghezza di 5 plantule per piastra (20 plantule per trattamento). In particolare, l'effetto delle nanoemulsioni sulle plantule è stato valutato sulla base della lunghezza della radichetta.

In generale, le diverse formulazioni, conservate a basse temperature ($5\pm 1^\circ\text{C}$), hanno mostrato una buona stabilità nel tempo (alcuni mesi dopo la preparazione). Un certo grado di alterazione delle proprietà organolettiche, probabilmente in conseguenza di contaminazioni microbiche, è stato riscontrato nelle formulazioni di controllo, prive di olio essenziale, soprattutto in WPI e Z.

2.6 Test di tossicità *in vivo* con olio essenziale di *Thymus spinulosus* in soluzione acquosa

L'attività dell'olio essenziale di *T. spinulosus* (accessione Cozzo S. Elia, 2017), estratto sia dalle parti vegetative sia fiorali, è stata saggiata "in vivo" su tre specie infestanti di interesse agrario: *A. retroflexus*, *A. fatua* ed *E. crus-galli*.

I saggi sono stati realizzati nelle serre dell'Università Politécnica di Valencia (gennaio-febbraio 2018). Per le semine sono stati utilizzati vasetti di 8 × 8 × 7 cm, contenenti torba universale miscelata ad agriperlite (rapporto 60:40). In ciascun vasetto sono stati collocati 3 semi per specie target. I semi sono gli stessi impiegati per gli altri saggi di fitotossicità (cfr. Tab. 1).

Per ottenere una germinazione più rapida, i vasetti sono stati incubati alla temperatura alterna di 30/20°C (± 1°C), con termoperiodo e fotoperiodo di 16/8h, in camera di germinazione (EQUITEC, Spain, munita di lampade fluorescenti Spectralux® Plus NL 36W/840, Germany). Dopo l'emergenza le plantule sono state trasferite in serra per l'acclimatazione, alla temperatura media di 26°C (± 2°C), in condizioni di luce naturale e irrigate regolarmente per sub-irrigazione.

I trattamenti sono stati effettuati su plantule provviste di almeno due foglie (a circa 2-3 settimane dalla semina).

Le soluzioni sono state preparate con volumi differenti di acqua distillata (5, 10, 20 mL) e di olio essenziale (8µL/mL, 12µL/mL, 16µL/mL), miscelati con l'impiego di un agente emulsionante (1µL/mL) costituito da acqua e olio di soia al 40% (Fitoil, Xeda, Italia). La soluzione è stata applicata per irrigazione e/o nebulizzata con l'ausilio di un vaporizzatore, al fine di bagnare omogeneamente tutta la superficie della plantula. Per ciascuna specie, per ogni trattamento e per i relativi bianchi di controllo (acqua e acqua + Fitoil) sono state allestite 5 repliche (1 pianta per vaso). In relazione alla quantità di olio disponibile e sulla base di esperimenti preliminari sono stati effettuati:

- 2 trattamenti (1 per irrigazione e 1 per nebulizzazione), utilizzando 20 mL di soluzione alla concentrazione di 8µL/mL di olio essenziale, su *A. fatua*, *A. retroflexus* ed *E. crus-galli*;
- 2 trattamenti (nebulizzazione), utilizzando 5 e 10 mL di soluzione alla concentrazione di 8µL/mL di olio essenziale, su piante di *E. crus-galli*;
- 2 trattamenti (nebulizzazione), utilizzando 5 mL di soluzione alle concentrazioni di 12µL/mL e 16µL/mL di olio essenziale, su *E. crus-galli*.

L'effetto sulle piante è stato rilevato visivamente a partire dalle 24h; il grado di efficacia dei trattamenti è stato valutato adottando una scala di valori da 0 a 3: 0 = assenza di fitotossicità,

1 = presenza di clorosi o necrosi fogliare, 2 = appassimento, 3 = avvizzimento. Le piante sono state monitorate per 10 giorni, al termine dei quali, quelle sopravvissute sono state prelevate per determinarne il peso fresco e secco, dopo 48h di permanenza in stufa a 60°C.

I risultati relativi al peso (fresco e secco) sono riportati come valore medio $\pm$ l'errore standard.

2.7 Analisi statistica

I dati relativi alle germinazioni con oli essenziali *tal quali* sono stati analizzati utilizzando un modello lineare generalizzato, con errore binomiale e link logit. Le proporzioni medie dei semi germinati nei diversi trattamenti, ricavate dai parametri del modello per retrotrasformazione, sono state utilizzate per i confronti multipli applicando il test-t eteroscedastico.

I risultati relativi alla germinazione, corredati dai relativi errori standard, sono stati espressi come percentuale massima di germinazione ottenuta al termine di ciascun biodosaggio (14° giorno).

I dati relativi alle lunghezze medie delle plantule sono stati sottoposti ad ANOVA, previa trasformazione logaritmica stabilizzante, per correggere l'eterogeneità delle varianze. Le medie, retrotrasformate, sono state sottoposte a procedura di confronto multiplo utilizzando il test-t eteroscedastico.

I dati relativi all'effetto delle nanoemulsioni e nanoparticelle (T80, WPI, GA, Z) con olio essenziale di *T. spinulosus* sono stati analizzati utilizzando un modello di regressione non lineare, previa trasformazione logaritmica. I risultati dei test, alle diverse concentrazioni e per ciascuna specie target, sono stati rappresentati graficamente in una curva dose-risposta. I valori medi relativi alla lunghezza delle radichette sono stati sottoposti ad ANOVA, previa trasformazione logaritmica stabilizzante (*A. blitum* e *P. oleracea* s.l.) per correggere l'eterogeneità delle varianze. Le medie retrotrasformate sono state sottoposte a procedura di confronto multiplo utilizzando il test t eteroscedastico.

3. RISULTATI

3.1 Attività *in vitro* degli oli essenziali “tal quali” sulla germinazione di piante infestanti

Gli oli essenziali delle diverse specie di *Thymus* hanno manifestato effetti inibitori, a vari livelli, sulla germinazione dei semi delle differenti specie target, in condizioni di laboratorio (Tab. 2).

Tabella. 2. Effetto degli oli essenziali di *T. longicaulis* subsp. *longicaulis* (TL-FAGO 2017), *T. praecox* subsp. *parvulus* (T-PRAEX 2017), *T. spinulosus* (TS-FAVE 2017), *T. vulgaris* subsp. *vulgaris* (TV-LIGU 2017), *T. paronychioides* (TP-VENT e TP-CAMM 2017) e *T. richardii* subsp. *nitidus* (TR-MARE 2017), sulla germinazione dei semi delle 4 specie target. I dati riportati in tabella esprimono il numero medio di semi germinati nelle 5 (20 semi per replica, dicotiledoni) o 10 repliche (10 semi per replica, monocotiledoni) $\pm$ l'errore standard e le lettere di significatività. I valori con differenti lettere sono statisticamente significativi allo 0.05.

Semi Germinati													
Amaranthus retroflexus													
Dose	TL-FAGO		T-PRAEX		TS-FAVE		TV-LIGU		TP-VENT		TP-CAMM		TR-MARE
Controllo	19,60 ±0,66	G	19,60 ±0,66	G	19,60 ±0,66	G	19,60 ±0,66	G	19,60 ±0,66	G	19,60 ±0,66	G	
0.125µL/mL	9,40 ±0,93	D	4,40 ±0,93	BC	16,40 ±0,93	F	5,00 ±0,93	C	19,20 ±0,93	G	15,60 ±0,93	EF	14,80 ±0,93 EF
0.25µL/mL	2,00 ±0,93	AB	0,00 ±0,93	A	13,40 ±0,93	E	0,00 ±0,93	A	19,00 ±0,93	G	14,20 ±0,93	EF	
0.5µL/mL	0,20 ±0,93	A	0,00 ±0,93	A	2,00 ±0,93	AB	0,00 ±0,93	A	5,00 ±0,93	C	1,80 ±0,93	A	
1µL/mL	0,00 ±0,93	A	0,00 ±0,93	A	0,00 ±0,93	A	0,00 ±0,93	A					
2µL/mL	0,00 ±0,93	A	0,00 ±0,93	A	0,00 ±0,93	A	0,00 ±0,93	A					
Portulaca oleracea s.l.													
Dose	TL-FAGO		T-PRAEX		TS-FAVE		TV-LIGU						
Controllo	18,60 ±0,79	D	18,60 ±0,79	D	18,60 ±0,79	D	18,60 ±0,79	D					
0.125µL/mL	17,00 ±0,79	D	0,00 ±0,79	A	14,20 ±0,79	C	0,00 ±0,79	A					
0.25µL/mL	11,60 ±0,79	B	0,00 ±0,79	A	1,40 ±0,79	A	0,00 ±0,79	A					
0.5µL/mL	1,20 ±0,79	A	0,00 ±0,79	A	0,00 ±0,79	A	0,00 ±0,79	A					
1µL/mL	0,00 ±0,79	A	0,00 ±0,79	A	0,00 ±0,79	A	0,00 ±0,79	A					
2µL/mL	0,00 ±0,79	A	0,00 ±0,79	A	0,00 ±0,79	A	0,00 ±0,79	A					
Avena fatua													
Dose	TL-FAGO		T-PRAEX		TS-FAVE		TV-LIGU						
Controllo	5,50 ±0,21	F	5,50 ±0,21	F	5,50 ±0,21	F	5,50 ±0,21	F					
0.125µL/mL	1,90 ±0,30	C	1,00 ±0,30	B	4,60 ±0,30	E	0,10 ±0,30	A					
0.25µL/mL	0,40 ±0,30	AB	1,10 ±0,30	BC	2,90 ±0,30	D	0,00 ±0,30	A					
0.5µL/mL	0,00 ±0,30	A	0,00 ±0,30	A	0,00 ±0,30	A	0,00 ±0,30	A					
1µL/mL	0,00 ±0,30	A	0,00 ±0,30	A	0,00 ±0,30	A	0,00 ±0,30	A					
2µL/mL	0,00 ±0,30	A	0,00 ±0,30	A	0,00 ±0,30	A	0,00 ±0,30	A					
Echinochloa crus-galli													
Dose	TL-FAGO		T-PRAEX		TS-FAVE		TV-LIGU		TP-VENT		TP-CAMM		
Controllo	4,80 ±0,26	G	4,80 ±0,26	G	4,80 ±0,26	G	4,80 ±0,26	G	4,80 ±0,26	G	4,80 ±0,26	G	
0.125µL/mL	2,70 ±0,36	DE	4,00 ±0,36	FG	2,40 ±0,36	DE	3,00 ±0,36	EF	5,90 ±0,36	H	4,80 ±0,36	G	
0.25µL/mL	1,80 ±0,36	CD	0,60 ±0,36	AB	2,50 ±0,36	DE	0,60 ±0,36	AB	4,70 ±0,36	G	5,00 ±0,36	GH	
0.5µL/mL	1,10 ±0,36	BC	0,00 ±0,36	A	1,70 ±0,36	CD	0,00 ±0,36	A	4,50 ±0,36	G			
1µL/mL	0,00 ±0,36	A	0,00 ±0,36	A	0,00 ±0,36	A	0,00 ±0,36	A					
2µL/mL	0,00 ±0,36	A	0,00 ±0,36	A	0,00 ±0,36	A	0,00 ±0,36	A					

3.1.1 Olio essenziale di *Thymus longicaulis* subsp. *longicaulis*

L'olio essenziale di *T. longicaulis* subsp. *longicaulis* (accessione TL-FAGO 2017) ha espresso una marcata fitossicità su quasi tutte le specie saggiate (*A. retroflexus*, *A. fatua* ed *E. crus-galli*), determinando un forte calo della percentuale finale di germinazione sin dalla concentrazione di 0.125 µL/mL (Fig. 2); solo *P. oleracea* s.l. ha espresso una più alta tolleranza. Alle concentrazioni >0.5 µL/mL la germinazione è stata totalmente inibita in tutte le specie target. L'effetto inibente dell'olio si può così sinteticamente descrivere: *A. fatua* > *A. retroflexus* > *E. crus-galli* > *P. oleracea* s.l. (Fig. 1).

I semi non germinati di *A. retroflexus*, *P. oleracea* s.l e *A. fatua* hanno mostrato una lacerazione del tegumento, per effetto dell'imbibizione, e una perdita della vitalità presumibilmente a causa di danni strutturali a livello dei tessuti embrionali (Fig. 3). Fenomeno non osservato nei semi di *E. crus-galli*.

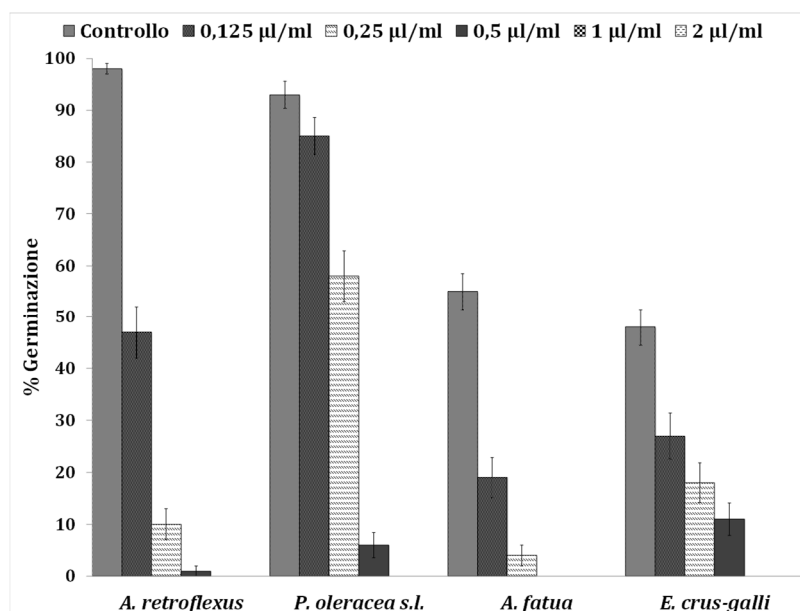


Figura 1. Effetto delle differenti dosi dell'olio essenziale di *T. longicaulis* subsp. *longicaulis* (accessione TL-FAGO 2017) sulla germinazione finale (espressa in %). Le barre verticali indicano il doppio dell'errore standard.

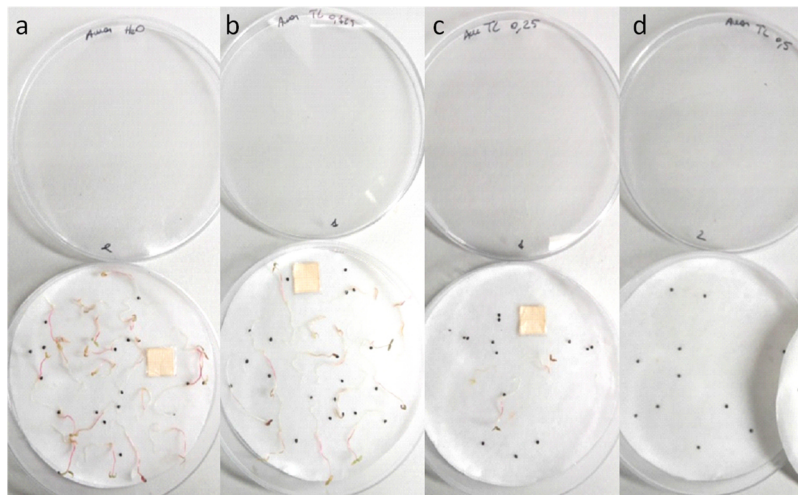


Figura 2. Semi di *A. retroflexus* con: a) acqua distillata, b) 0.125µL/mL, c) 0.25µL/mL, d) 0.5µL/mL di olio essenziale di *T. longicaulis* subsp. *longicaulis*.



Figura 3. Semi non germinati di *A. retroflexus* danneggiati dal trattamento con olio essenziale di *T. longicaulis* subsp. *longicaulis* alla concentrazione di 0.25µL/mL.

3.1.2 Olio essenziale di *Thymus paronychioides* (accessioni TP-VENT-2017, TP-CAMM-2017)

L'olio essenziale di *T. paronychioides* (TP-VENT-2017) non ha manifestato un rilevante effetto inibitorio sulla germinazione dei semi di *A. retroflexus* ed *E. crus-galli* (Fig. 4). Infatti, la risposta germinativa alle concentrazioni di 0.125 μ L e 0.25 μ L/mL non è stata significativamente differente, rispetto al controllo. In *A. retroflexus* l'effetto fitotossico è stato significativo solo alla dose di 0.5 μ L/mL (74% di inibizione).

In *E. crus-galli* l'olio essenziale, applicato alla concentrazione di 0.125 μ L/mL, ha indotto un incremento della germinazione dell'11%, rispetto al controllo.

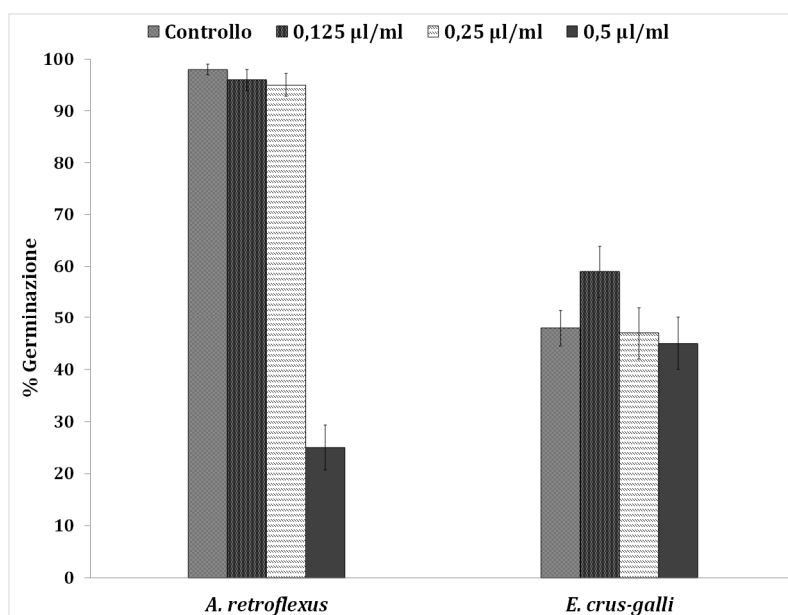


Figura 4. Effetto delle differenti dosi dell'olio essenziale di *T. paronychioides* (accessione TP-VENT 2017) sulla germinazione finale (espressa in %). Le barre verticali indicano il doppio dell'errore standard.

Di contro, l'olio essenziale dell'accessione TP-CAMM-2017 ha significativamente inibito la germinazione in *A. retroflexus* a tutte le dosi saggate, rispetto al controllo (Fig. 5). Alla concentrazione di 0.5 μ L/mL la percentuale di fitotossicità è stata del 90%.

In *E. crus-galli*, alle sole concentrazioni testate di 0.125 μ L e 0.25 μ L/mL, l'olio essenziale non ha determinato alcuna inibizione della germinazione.

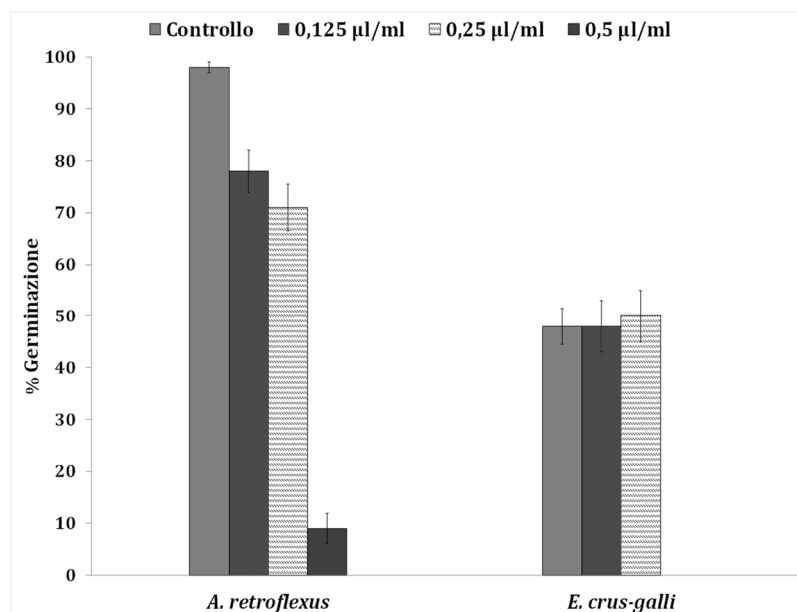


Figura 5. Effetto delle differenti dosi dell'olio essenziale di *T. paronychioides* (accessione TP-CAMM-2017) sulla germinazione finale (espressa in %). Le barre verticali indicano il doppio dell'errore standard.

3.1.3 Olio essenziale di *Thymus praecox subsp. parvulus*

L'olio essenziale di *T. praecox subsp. parvulus* (accessione T-PRAEX-2017) ha manifestato una elevata fitotossicità, inibendo la germinazione già alla concentrazione di 0.125µL/mL, in tutte le specie saggiate (Fig.6). L'azione inibente è stata massima in *P. oleracea* s.l. mentre in *A. retroflexus* e *A. fatua* l'indice GI è stato del 77 e 81%, rispettivamente.

In *E. crus-galli* l'effetto inibitorio è cresciuto dal 16 all'87% alle concentrazioni di 0.125µL/mL e 0.25µL/mL, rispettivamente. Le dosi >0.25µL/mL sono state letali per tutte le specie allo studio (Fig. 7).

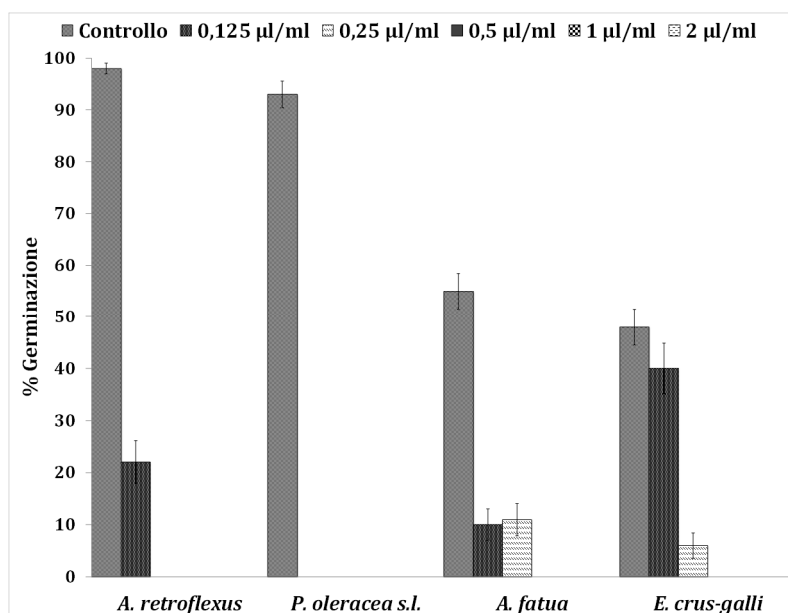


Figura 6. Effetto delle differenti dosi dell'olio essenziale di *T. praecox subsp. parvulus* (accessione T-PRAEX-2017) sulla germinazione finale (espressa in %). Le barre verticali indicano il doppio dell'errore standard.



Figura 7. Semi non vitali di *A. fatua* trattati con olio essenziale di *T. praecox subsp. parvulus* alla concentrazione di 0.25µL/mL.

3.1.4 Olio essenziale di *Thymus richardii* subsp. *nitidus*

L'olio essenziale di *T. richardii* subsp. *nitidus* (accessione TR-MARE-2017) è stato saggiato esclusivamente alla concentrazione di 0.125µL/mL e solo su *A. retroflexus*, la cui germinazione è stata inibita del 24% (Fig. 8). Confrontando l'effetto dell'olio di *T. richardii* subsp. *nitidus* con quello degli altri oli essenziali, alla medesima concentrazione, si rileva una maggiore fitotossicità rispetto a quanto espresso da tre degli oli saggiati: *T. richardii* subsp. *nitidus*>*T. paronychioides* (accessione TP-CAMM-2017, 20% inibizione)>*T. spinulosus* (16% di inibizione)>*T. paronychioides* (accessione TP-VENT-2017, 2% di inibizione).

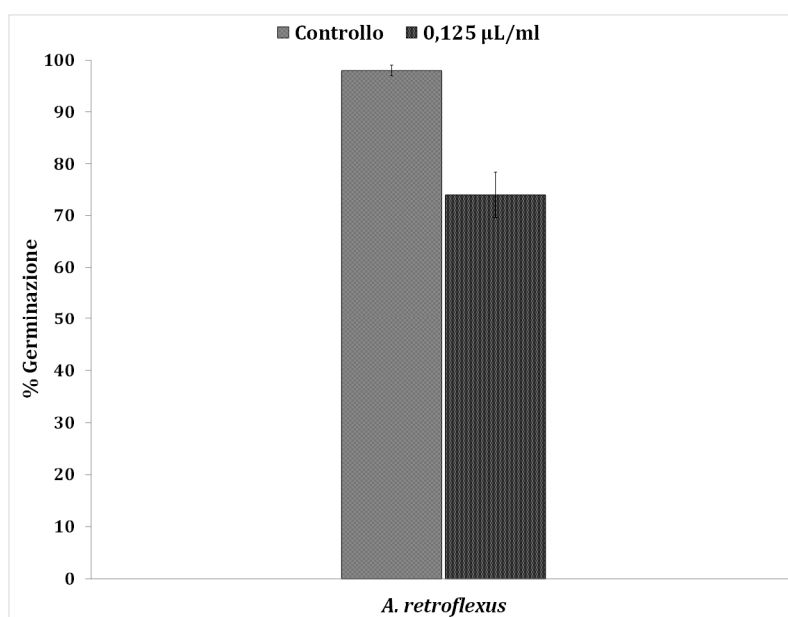


Figura 8. Effetto dell'olio essenziale di *T. richardii* subsp. *nitidus* (accessione TR-MARE-2017), alla concentrazione di 0.125µL/mL, sulla germinazione finale (espressa in %). Le barre verticali indicano il doppio dell'errore standard.

3.1.5 Olio essenziale di *Thymus spinulosus*

La risposta germinativa delle quattro specie target, trattate con olio essenziale di *T. spinulosus* (accessione TS-FAVE-2017), è stata piuttosto diversificata. In generale, è stata osservata una significativa relazione dose-risposta evidenziata da una riduzione della percentuale finale di germinazione all'aumentare della dose applicata (Figg. 9 e 10).

L'olio di *T. spinulosus* ha determinato un efficace controllo della germinazione alla concentrazione di 0.25µL/mL in tre delle specie target, inibendo la germinazione del 92% in *P. oleracea* s.l. e del 47% in *A. fatua* ed *E. crus-galli*. In *A. retroflexus*, un'analogia azione fitotossica è stata determinata dalla concentrazione di 0.5µL/mL (inibizione dell'89%). Alle concentrazioni >0.5µL/mL la germinazione è stata completamente inibita.

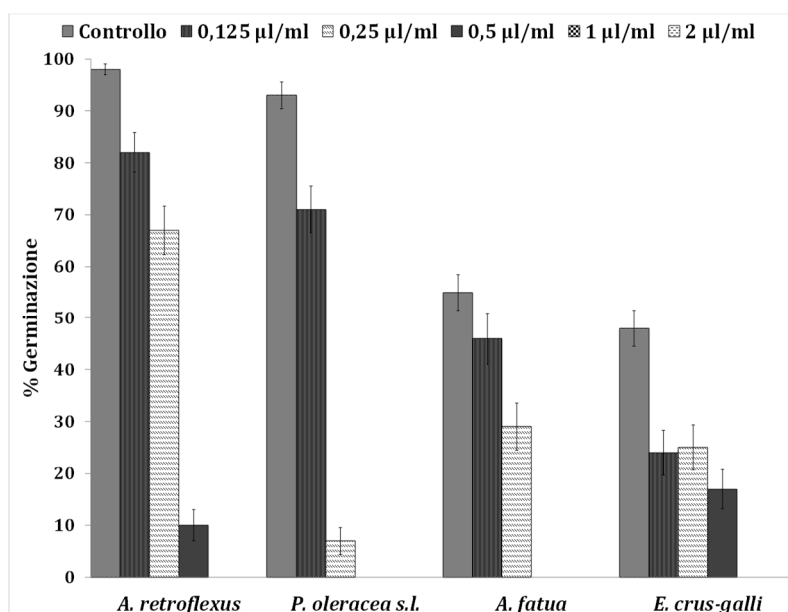


Figura 9. Effetto delle differenti dosi dell'olio essenziale di *T. spinulosus* (accessione TS-FAVE-2017) sulla germinazione finale (espressa in %). Le barre verticali indicano il doppio dell'errore standard.

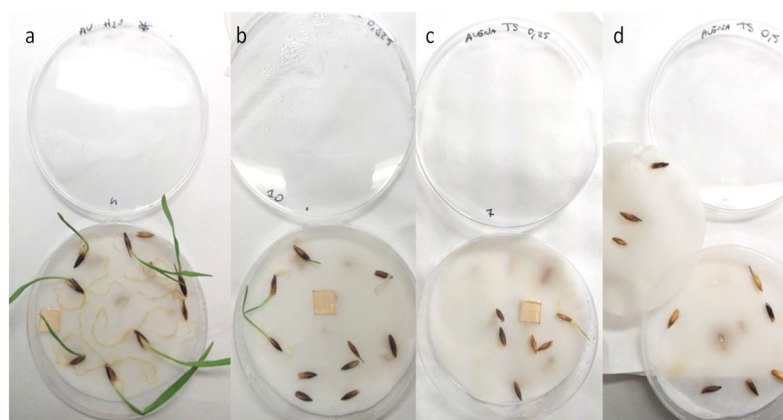


Figura 10. Semi di *A. fatua* con: a) acqua distillata, b) 0.125µL/mL, c) 0.25µL/mL, d) 0.5µL/mL di olio essenziale di *T. spinulosus*.

3.1.6 Olio essenziale di *Thymus vulgaris* subsp. *vulgaris*

L'effetto fitotossico dell'olio essenziale di *T. vulgaris* subsp. *vulgaris* è stato significativo già alla più bassa dose testata (0.125 µL/mL). La germinazione è stata totalmente inibita in *P. oleacea* s.l. e *A. fatua*, sensibilmente ridotta in *A. retroflexus* ed *E. crus-galli* (Fig. 11). In queste ultime specie, alla dose di 0.125 µL/mL, è stato rilevato un GI del 74 e 37%, rispettivamente. Alla dose di 0.25 µL/mL, la germinazione è stata del 6% in *E. crus-galli* e completamente soppressa in *A. retroflexus*.

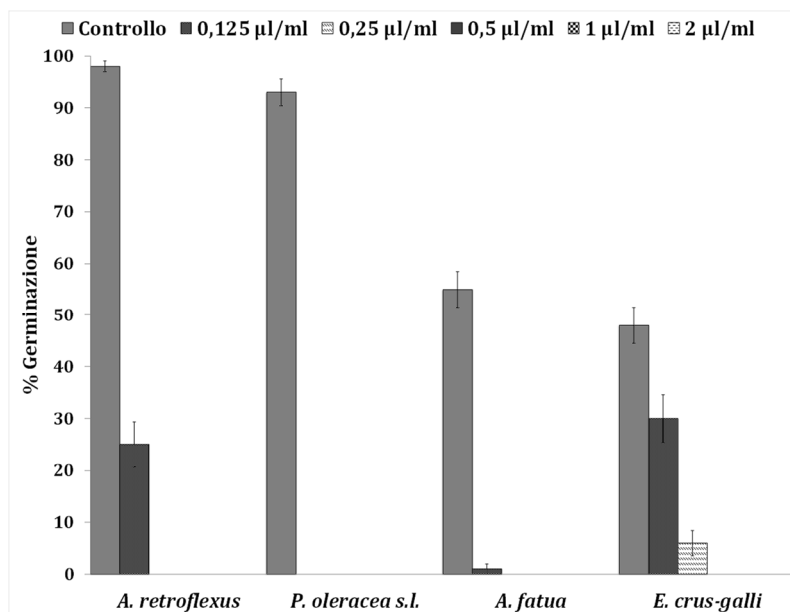


Figura 11. Effetto delle differenti dosi dell'olio essenziale di *T. vulgaris* subsp. *vulgaris* sulla germinazione finale (espressa in %). Le barre verticali indicano il doppio dell'errore standard.

3.2 Attività *in vitro* degli oli essenziali “tal quali” sull’accrescimento delle plantule di specie infestanti

La ricerca ha evidenziato che gli oli essenziali dei *taxa* di *Thymus* allo studio, alle diverse concentrazioni, in condizioni di laboratorio, hanno effetti fitotossici anche sull’accrescimento complessivo delle plantule delle specie target, sia a livello radicale sia dell’ipocotile/germoglio (Tabb. 3, 4). L’attività dei singoli oli e delle relative dosi sulle specie target viene descritta analiticamente di seguito.

Tabella 3. Effetto degli oli essenziali di: *T. longicaulis* subsp. *longicaulis* (TL-FAGO 2017), *T. paecox* subsp. *parvulus* (T-PRAEX 2017), *T. spinulosus* (TS-FAVE 2017), *T. vulgaris* subsp. *vulgaris* (TV-LIGU), *T. paronychioides* (TP-VENT e TP-CAMM 2017) e *T. richardii* subsp. *nitidus* (TR-MARE 2017) sull’accrescimento radicale, dopo 14 giorni, delle 4 specie target. I dati riportati in tabella esprimono la lunghezza media della radichetta (in mm) delle plantule germinate nelle 5 (20 semi per replica, dicotiledoni) o 10 repliche (10 semi per replica, monocotiledoni) $\pm$ l’errore standard e le lettere di significatività. I valori con differenti lettere sono statisticamente significativi allo 0.05.

Lunghezza radichetta (mm)												
<i>Amaranthus retroflexus</i>												
Dose	TL-FAGO		T-PRAEX		TS-FAVE		TV-LIGU		TP-VENT		TP-CAMM	TR-MARE
Controllo	26,66 $\pm$ 0,75	H	26,66 $\pm$ 0,75	H	26,66 $\pm$ 0,75	H	26,66 $\pm$ 0,75	H	26,66 $\pm$ 0,75	H	26,66 $\pm$ 0,75	H
0.125 μ L/mL	21,14 $\pm$ 1,06	G	4,05 $\pm$ 1,06	C	18,00 $\pm$ 1,06	F	3,50 $\pm$ 1,06	BC	25,27 $\pm$ 1,06	H	18,46 $\pm$ 1,06	FG
0.25 μ L/mL	8,44 $\pm$ 1,06	DE	0,00 $\pm$ 1,06	A	7,67 $\pm$ 1,06	DE	0,00 $\pm$ 1,06	A	25,35 $\pm$ 1,06	H	15,83 $\pm$ 1,06	F
0.5 μ L/mL	0,62 $\pm$ 1,06	AB	0,00 $\pm$ 1,06	A	5,46 $\pm$ 1,06	CD	0,00 $\pm$ 1,06	A	9,65 $\pm$ 1,06	E	4,33 $\pm$ 1,06	C
1 μ L/mL	0,00 $\pm$ 1,06	A	0,00 $\pm$ 1,06	A	0,00 $\pm$ 1,06	A	0,00 $\pm$ 1,06	A				
2 μ L/mL	0,00 $\pm$ 1,06	A	0,00 $\pm$ 1,06	A	0,00 $\pm$ 1,06	A	0,00 $\pm$ 1,06	A				
<i>Portulaca oleracea</i> s.l.												
Dose	TL-FAGO		T-PRAEX		TS-FAVE		TV-LIGU					
Controllo	6,99 $\pm$ 0,23	E	6,99 $\pm$ 0,23	E	6,99 $\pm$ 0,23	E	6,99 $\pm$ 0,23	E				
0.125 μ L/mL	5,07 $\pm$ 0,23	D	0,00 $\pm$ 0,23	A	1,08 $\pm$ 0,23	BC	0,00 $\pm$ 0,23	A				
0.25 μ L/mL	1,08 $\pm$ 0,23	BC	0,00 $\pm$ 0,23	A	1,40 $\pm$ 0,23	C	0,00 $\pm$ 0,23	A				
0.5 μ L/mL	0,74 $\pm$ 0,23	B	0,00 $\pm$ 0,23	A	0,00 $\pm$ 0,23	A	0,00 $\pm$ 0,23	A				
1 μ L/mL	0,00 $\pm$ 0,23	A	0,00 $\pm$ 0,23	A	0,00 $\pm$ 0,23	A	0,00 $\pm$ 0,23	A				
2 μ L/mL	0,00 $\pm$ 0,23	A	0,00 $\pm$ 0,23	A	0,00 $\pm$ 0,23	A	0,00 $\pm$ 0,23	A				
<i>Avena fatua</i>												
Dose	TL-FAGO		T-PRAEX		TS-FAVE		TV-LIGU					
Controllo	80,20 $\pm$ 3,04	C	80,20 $\pm$ 3,04	C	80,20 $\pm$ 3,04	C	80,20 $\pm$ 3,04	C				
0.125 μ L/mL	6,76 $\pm$ 4,29	A	5,79 $\pm$ 4,29	A	23,73 $\pm$ 4,29	B	0,37 $\pm$ 4,29	A				
0.25 μ L/mL	1,96 $\pm$ 4,29	A	4,43 $\pm$ 4,29	A	20,00 $\pm$ 4,29	B	0,00 $\pm$ 4,29	A				
0.5 μ L/mL	0,00 $\pm$ 4,29	A	0,00 $\pm$ 4,29	A	0,00 $\pm$ 4,29	A	0,00 $\pm$ 4,29	A				
1 μ L/mL	0,00 $\pm$ 4,29	A	0,00 $\pm$ 4,29	A	0,00 $\pm$ 4,29	A	0,00 $\pm$ 4,29	A				
2 μ L/mL	0,00 $\pm$ 4,29	A	0,00 $\pm$ 4,29	A	0,00 $\pm$ 4,29	A	0,00 $\pm$ 4,29	A				
<i>Echinochloa crus-galli</i>												
Dose	TL-FAGO		T-PRAEX		TS-FAVE		TV-LIGU		TP-VENT		TP-CAMM	
Controllo	31,47 $\pm$ 1,18	F	31,47 $\pm$ 1,18	F	31,47 $\pm$ 1,18	F	31,47 $\pm$ 1,18	F	31,47 $\pm$ 1,18	F	31,47 $\pm$ 1,18	F
0.125 μ L/mL	6,94 $\pm$ 1,67	C	5,80 $\pm$ 1,67	BC	19,32 $\pm$ 1,67	D	3,10 $\pm$ 1,67	ABC	30,19 $\pm$ 1,67	EF	30,08 $\pm$ 1,67	EF
0.25 μ L/mL	2,89 $\pm$ 1,67	ABC	3,89 $\pm$ 1,67	ABC	18,72 $\pm$ 1,67	D	0,91 $\pm$ 1,67	A	26,32 $\pm$ 1,67	E	28,91 $\pm$ 1,67	EF
0.5 μ L/mL	1,31 $\pm$ 1,67	AB	0,00 $\pm$ 1,67	A	19,93 $\pm$ 1,67	D	0,00 $\pm$ 1,67	A	30,80 $\pm$ 1,67	EF		
1 μ L/mL	0,00 $\pm$ 1,67	A	0,00 $\pm$ 1,67	A	0,00 $\pm$ 1,67	A	0,00 $\pm$ 1,67	A				
2 μ L/mL	0,00 $\pm$ 1,67	A	0,00 $\pm$ 1,67	A	0,00 $\pm$ 1,67	A	0,00 $\pm$ 1,67	A				

Tabella 4. Effetto degli oli essenziali di: *T. longicaulis* subsp. *longicaulis* (TL-FAGO 2017), *T. paecox* subsp. *parvulus* (T-PRAEX 2017), *T. spinulosus* (TS-FAVE 2017), *T. vulgaris* subsp. *vulgaris* (TV-LIGU 2017), *T. paronychioides* (TP-VENTe TP-CAMM 2017) e *T. richardii* subsp. *nitidus* (TR-MARE 2017) sull'accrescimento dell'ipocotile/germoglio, dopo 14 giorni, delle 4 specie target. I dati riportati in tabella esprimono la lunghezza media dell'ipocotile/germoglio (in mm) delle plantule germinate nelle 5 (20 semi per replica, dicotiledoni) o 10 repliche (10 semi per replica, monocotiledoni) $\pm$ l'errore standard e le lettere di significatività. I valori con differenti lettere sono statisticamente significativi allo 0.05.

Lunghezza ipocotile/germoglio (mm)												
<i>Amaranthus retroflexus</i>												
Dose	TL-FAGO		T-PRAEX		TS-FAVE		TV-LIGU		TP-VENT		TP-CAMM	TR-MARE
Controllo	15,40 $\pm$ 0,51	L	15,40 $\pm$ 0,51	L	15,40 $\pm$ 0,51	L	15,40 $\pm$ 0,51	L	15,40 $\pm$ 0,51	L	15,40 $\pm$ 0,51	L
0.125 μ L/mL	13,32 $\pm$ 0,72	JK	3,30 $\pm$ 0,72	CD	11,85 $\pm$ 0,72	IJ	2,52 $\pm$ 0,72	BC	14,89 $\pm$ 0,72	KL	11,62 $\pm$ 0,72	IJ
0.25 μ L/mL	6,30 $\pm$ 0,72	EF	0,00 $\pm$ 0,72	A	7,60 $\pm$ 0,72	FG	0,00 $\pm$ 0,72	A	13,05 $\pm$ 0,72	JK	9,12 $\pm$ 0,72	GH
0.5 μ L/mL	0,73 $\pm$ 0,72	AB	0,00 $\pm$ 0,72	A	4,67 $\pm$ 0,72	DE	0,00 $\pm$ 0,72	A	6,33 $\pm$ 0,72	EF	2,46 $\pm$ 0,72	BC
1 μ L/mL	0,00 $\pm$ 0,72	A	0,00 $\pm$ 0,72	A	0,00 $\pm$ 0,72	A	0,00 $\pm$ 0,72	A				
2 μ L/mL	0,00 $\pm$ 0,72	A	0,00 $\pm$ 0,72	A	0,00 $\pm$ 0,72	A	0,00 $\pm$ 0,72	A				
<i>Portulaca oleracea</i> s.l.												
Dose	TL-FAGO		T-PRAEX		TS-FAVE		TV-LIGU					
Controllo	6,10 $\pm$ 0,25	D	6,10 $\pm$ 0,25	D	6,10 $\pm$ 0,25	D	6,10 $\pm$ 0,25	D				
0.125 μ L/mL	4,60 $\pm$ 0,25	C	0,00 $\pm$ 0,25	A	1,15 $\pm$ 0,25	B	0,00 $\pm$ 0,25	A				
0.25 μ L/mL	1,65 $\pm$ 0,25	B	0,00 $\pm$ 0,25	A	1,41 $\pm$ 0,25	B	0,00 $\pm$ 0,25	A				
0.5 μ L/mL	0,99 $\pm$ 0,25	B	0,00 $\pm$ 0,25	A	0,00 $\pm$ 0,25	A	0,00 $\pm$ 0,25	A				
1 μ L/mL	0,00 $\pm$ 0,25	A	0,00 $\pm$ 0,25	A	0,00 $\pm$ 0,25	A	0,00 $\pm$ 0,25	A				
2 μ L/mL	0,00 $\pm$ 0,25	A	0,00 $\pm$ 0,25	A	0,00 $\pm$ 0,25	A	0,00 $\pm$ 0,25	A				
<i>Avena fatua</i>												
Dose	TL-FAGO		T-PRAEX		TS-FAVE		TV-LIGU					
Controllo	87,41 $\pm$ 1,71	C	87,41 $\pm$ 1,71	C	87,41 $\pm$ 1,71	C	87,41 $\pm$ 1,71	C				
0.125 μ L/mL	6,47 $\pm$ 2,42	A	6,24 $\pm$ 2,42	A	28,51 $\pm$ 2,42	B	0,00 $\pm$ 2,42	A				
0.25 μ L/mL	2,58 $\pm$ 2,42	A	4,21 $\pm$ 2,42	A	28,21 $\pm$ 2,42	B	0,00 $\pm$ 2,42	A				
0.5 μ L/mL	0,00 $\pm$ 2,42	A	0,00 $\pm$ 2,42	A	0,00 $\pm$ 2,42	A	0,00 $\pm$ 2,42	A				
1 μ L/mL	0,00 $\pm$ 2,42	A	0,00 $\pm$ 2,42	A	0,00 $\pm$ 2,42	A	0,00 $\pm$ 2,42	A				
2 μ L/mL	0,00 $\pm$ 2,42	A	0,00 $\pm$ 2,42	A	0,00 $\pm$ 2,42	A	0,00 $\pm$ 2,42	A				
<i>Echinochloa crus-galli</i>												
Dose	TL-FAGO		T-PRAEX		TS-FAVE		TV-LIGU		TP-VENT		TP-CAMM	
Controllo	33,18 $\pm$ 1,43	I	33,18 $\pm$ 1,43	I	33,18 $\pm$ 1,43	I	33,18 $\pm$ 1,43	I	33,18 $\pm$ 1,43	I	33,18 $\pm$ 1,43	I
0.125 μ L/mL	20,73 $\pm$ 2,02	F	20,72 $\pm$ 2,02	F	24,34 $\pm$ 2,02	FGH	11,00 $\pm$ 2,02	CD	27,52 $\pm$ 2,02	GH	28,44 $\pm$ 2,02	HI
0.25 μ L/mL	14,55 $\pm$ 2,02	DE	8,52 $\pm$ 2,02	BC	20,44 $\pm$ 2,02	F	3,50 $\pm$ 2,02	AB	21,11 $\pm$ 2,02	F	29,10 $\pm$ 2,02	HI
0.5 μ L/mL	10,12 $\pm$ 2,02	CD	0,00 $\pm$ 2,02	A	22,72 $\pm$ 2,02	FG	0,00 $\pm$ 2,02	A	19,11 $\pm$ 2,02	EF		
1 μ L/mL	0,00 $\pm$ 2,02	A	0,00 $\pm$ 2,02	A	0,00 $\pm$ 2,02	A	0,00 $\pm$ 2,02	A				
2 μ L/mL	0,00 $\pm$ 2,02	A	0,00 $\pm$ 2,02	A	0,00 $\pm$ 2,02	A	0,00 $\pm$ 2,02	A				

3.2.1 Olio essenziale di *Thymus longicaulis* subsp. *longicaulis*

L'olio essenziale di *T. longicaulis* subsp. *longicaulis* (accessione TL-FAGO 2017) ha determinato nelle quattro specie trattate (*A. retroflexus*, *P. oleracea* s.l., *A. fatua*, *E. crus-galli*) differenti gradi di inibizione nell'accrescimento sia della radichetta sia dell'ipocotile/germoglio (Figg.12, 13, 14, 15), in relazione alle dosi applicate. L'azione è stata particolarmente inibente a livello della radichetta, a tutte le concentrazioni testate, in entrambe le monocotiledoni e del germoglio in *A. fatua*.

L'effetto fitotossico dell'olio è risultato proporzionale alle dosi applicate in *A. retroflexus* e *P. oleracea* s.l.

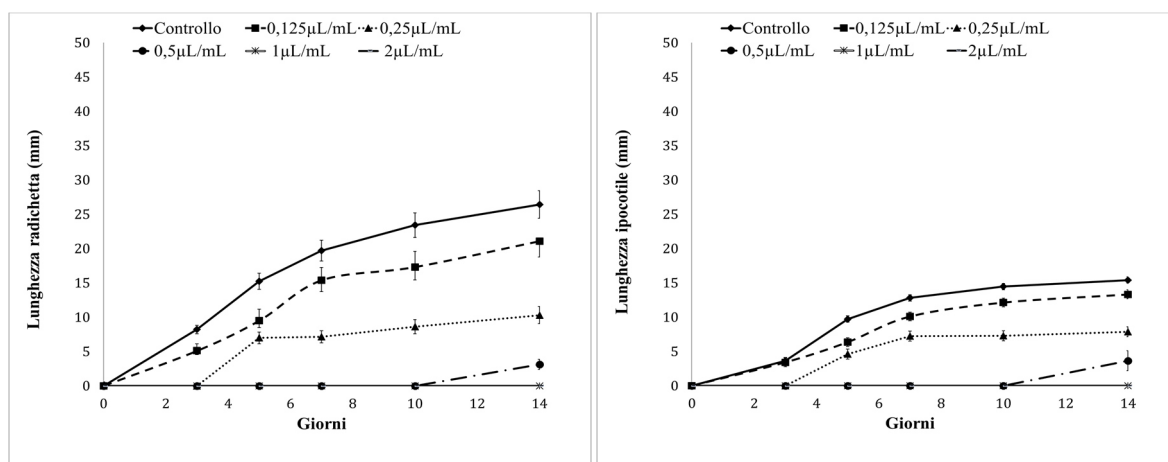


Figura 12. Effetto dell'olio essenziale di *T. longicaulis* subsp. *longicaulis* (accessione TL-FAGO 2017), a differenti dosi, sull'accrescimento della radichetta e dell'ipocotile in *A. retroflexus*. Le misure sono espresse come medie (in mm) e le barre verticali esprimono il doppio dell'errore standard.

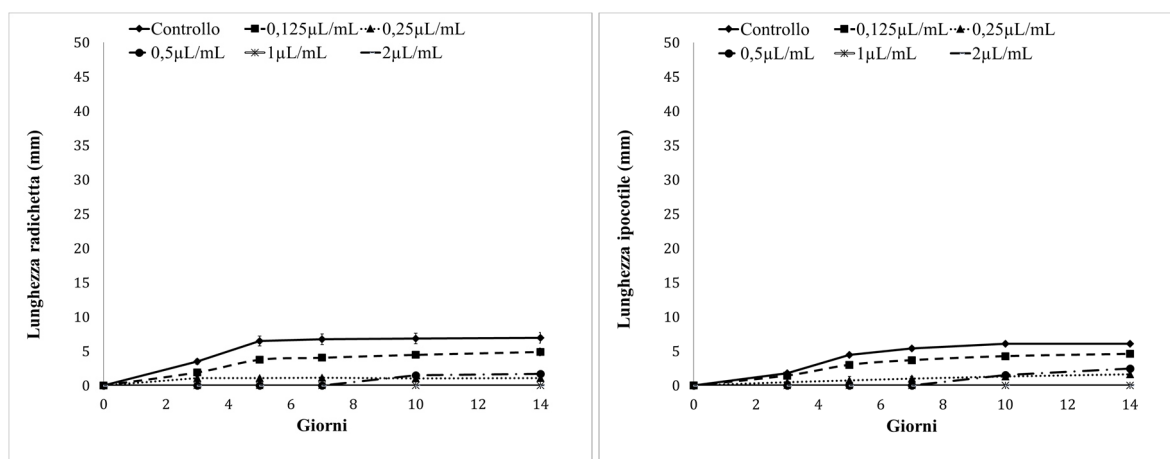


Figura 13. Effetto dell'olio essenziale di *T. longicaulis* subsp. *longicaulis* (accessione TL-FAGO 2017), a differenti dosi, sull'accrescimento della radichetta e dell'ipocotile in *P. oleracea* s.l. Le misure sono espresse come medie (in mm) e le barre verticali esprimono il doppio dell'errore standard.

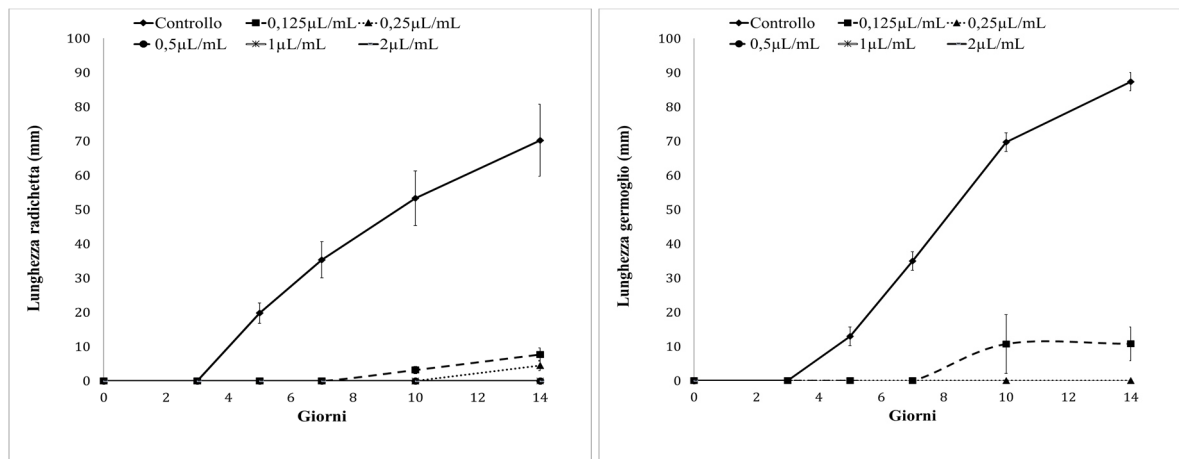


Figura 14. Effetto dell'olio essenziale di *T. longicaulis* subsp. *longicaulis* (accessione TL-FAGO 2017), a differenti dosi, sull'accrescimento della radichetta e del germoglio in *A. fatua*. Le misure sono espresse come medie (in mm) e le barre verticali esprimono il doppio dell'errore standard.

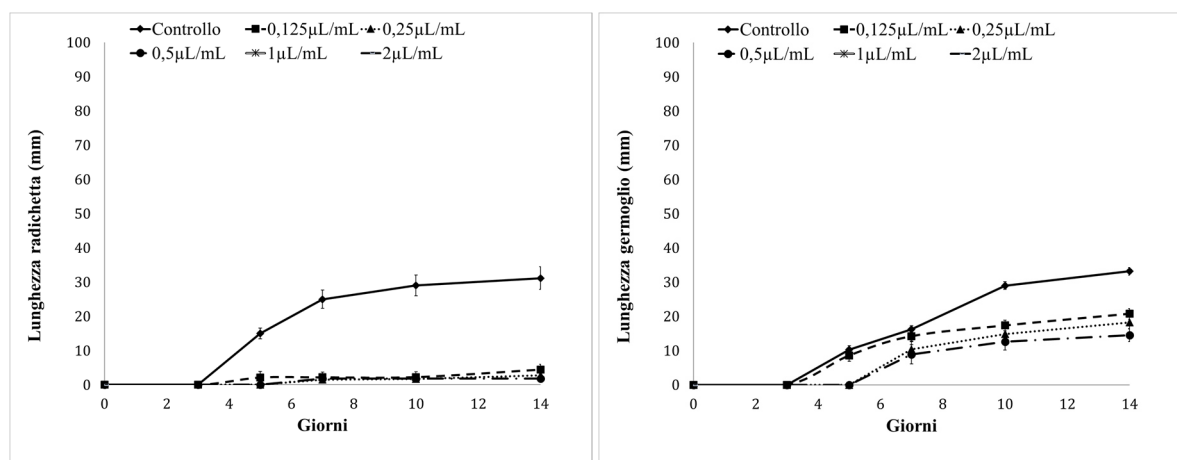


Figura 15. Effetto dell'olio essenziale di *T. longicaulis* subsp. *longicaulis* (accessione TL-FAGO 2017), a differenti dosi, sull'accrescimento della radichetta e del germoglio in *E. crus-galli*. Le misure sono espresse come medie (in mm) e le barre verticali esprimono il doppio dell'errore standard.

3.2.2 Olio essenziale di *Thymus paronychioides* (accessioni TP-VENT-2017, TP-CAMM-2017)

In *A. retroflexus* ed *E. crus-galli* l'effetto dell'olio di *T. paronychioides* (accessione TP-VENT-2017) è stato influente alle concentrazioni di 0.125µL e 0.25µL/mL, tanto sull'accrescimento della radichetta quanto sull'ipocotile/germoglio (Figg. 16 e 17). Una significativa fitotossicità è stata, invece, riscontrata alla dose di 0.5µL/mL: a livello della radichetta, in *A. retroflexus* (64%); del germoglio, in *E. crus-galli* (42%).

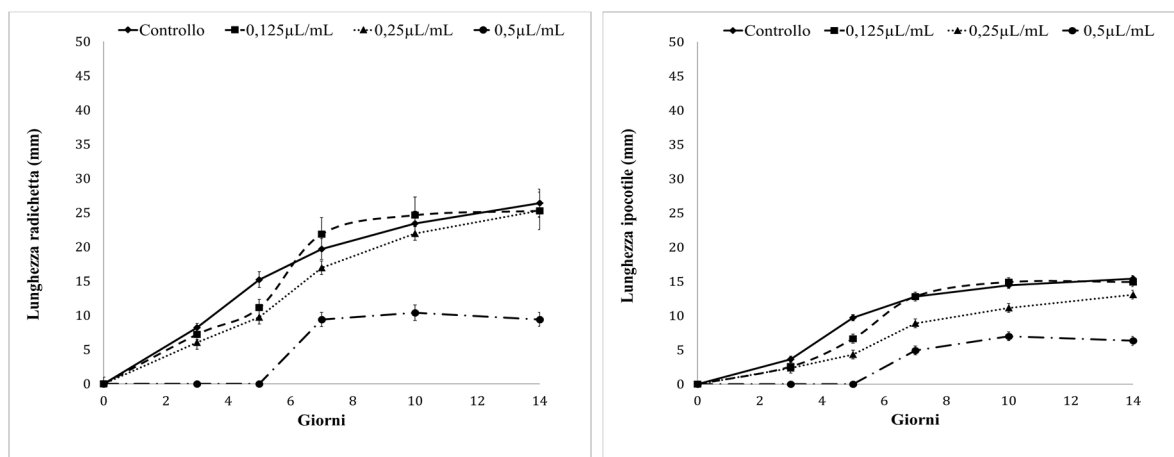


Figura 16. Effetto dell'olio essenziale di *T. paronychioides* (accessione TP-VENT 2017), a differenti dosi, sull'accrescimento della radichetta e dell'ipocotile in *A. retroflexus*. Le concentrazioni al di sopra di 0.5µL/mL non sono state saggiate. Le misure sono espresse come medie (in mm) e le barre verticali indicano il doppio dell'errore standard.

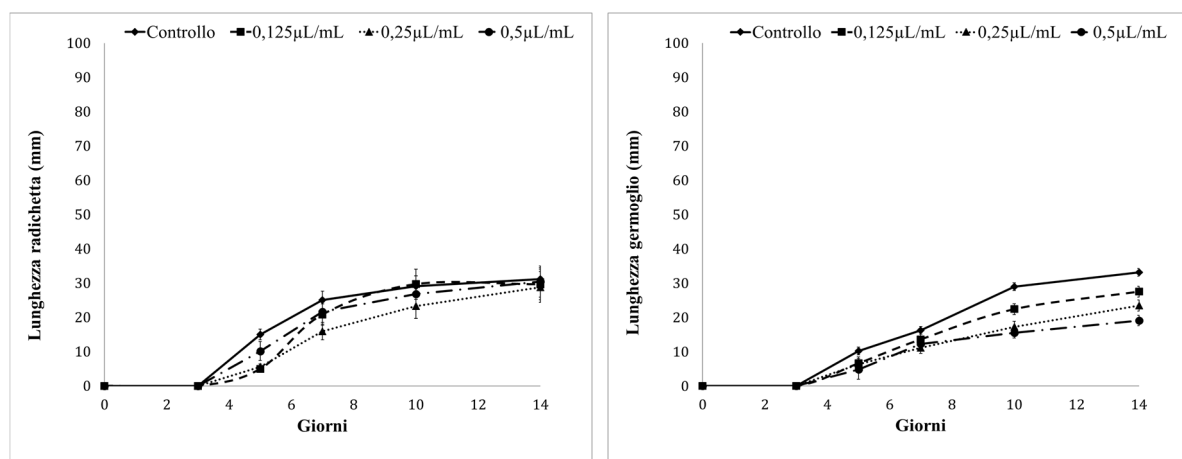


Figura 17. Effetto dell'olio essenziale di *T. paronychioides* (accessione TP-VENT 2017), a differenti dosi, sull'accrescimento della radichetta e del germoglio in *E. crus-galli*. Le concentrazioni al di sopra di 0.5µL/mL non sono state saggiate. Le misure sono espresse come medie (in mm) e le barre verticali indicano il doppio dell'errore standard.

L'olio essenziale dell'accessione TP-CAMM 2017 ha provocato una fitotossicità crescente, legata alla dose applicata, sulla radichetta (fitotossicità del 73% alla dose di 0.5 μ L/mL), in *A. retroflexus* (Fig. 18). In *E. crus-galli* (Fig. 19), alle due dosi saggate, non ha prodotto differenze statisticamente significative sull'accrescimento dei due organi, rispetto al controllo.

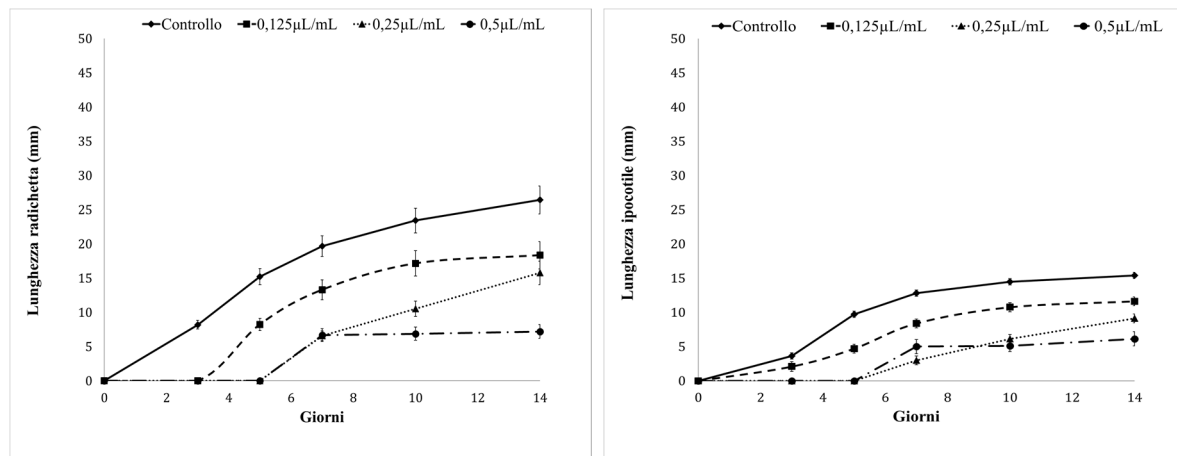


Figura 18. Effetto dell'olio essenziale di *T. paronychioides* (accessione TP-CAMM 2017), a differenti dosi, sull'accrescimento della radichetta e dell'ipocotile in *A. retroflexus*. Le concentrazioni al di sopra di 0.5 μ L/mL non sono state saggate. Le misure sono espresse come medie (in mm) e le barre verticali indicano il doppio dell'errore standard.

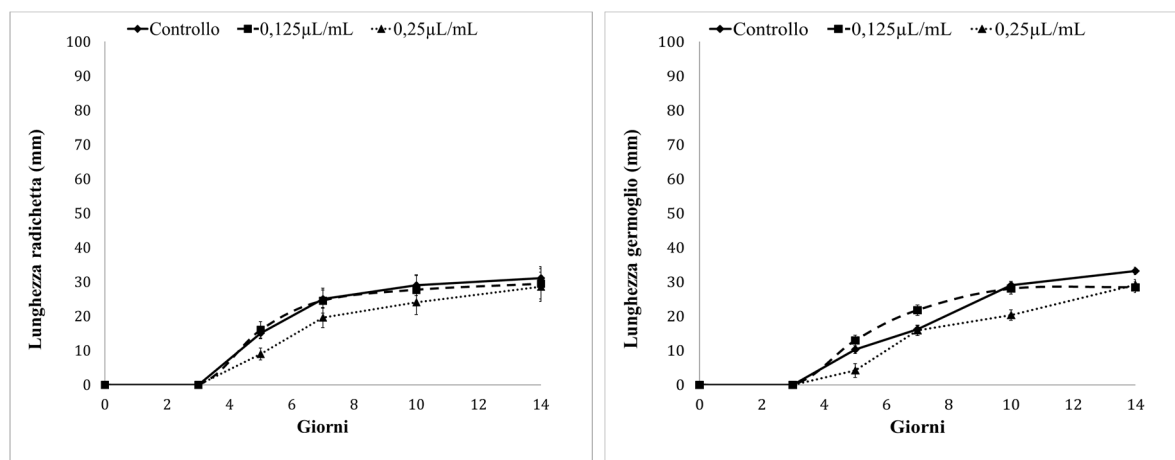


Figura 19. Effetto dell'olio essenziale di *T. paronychioides* (accessione TP-CAMM 2017), a differenti dosi, sull'accrescimento della radichetta e del germoglio in *E. crus-galli*. Le concentrazioni al di sopra di 0.25 μ L/mL non sono state saggate. Le misure sono espresse come medie (in mm) e le barre verticali indicano il doppio dell'errore standard.

3.2.3 Olio essenziale di *Thymus praecox subsp. parvulus*

L'olio essenziale di *Thymus praecox subsp. parvulus* (accessione T-PRAEX 2017) ha espresso un'elevata fitotossicità in *A. retroflexus*, *A. fatua* ed *E. crus-galli*. Alla più bassa dose applicata ($0.125\mu\text{L/mL}$), infatti, è stata osservata una significativa riduzione della lunghezza sia della radichetta sia dell'ipocotile/germoglio (Figg. 20, 21, 22). Il maggiore grado di inibizione (83-87%) è stato riscontrato a livello radicale, sin dalla concentrazione di $0.125\mu\text{L/mL}$, in tutte le specie target.

In *A. fatua* ed *E. crus-galli*, alla concentrazione di $0.25\mu\text{L/mL}$, è stato rilevato anche un ritardo nell'emergenza del germoglio, osservata al 7° e 10° giorno, rispettivamente.

L'azione inibente dell'olio sulle 4 specie target può essere così riassunta: *A. fatua* > *A. retroflexus* > *E. crus-galli*.

Per *P. oleracea* s.l., a causa dell'azione inibente dell'olio sulla germinazione dei semi, non è stato possibile valutare l'effetto sull'accrescimento delle plantule.

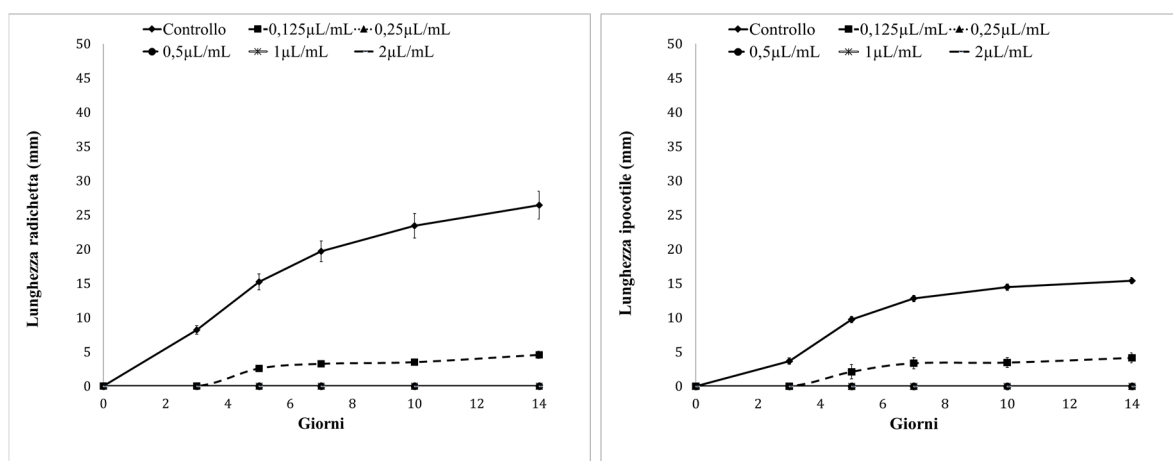


Figura 20. Effetto dell'olio essenziale di *T. praecox subsp. parvulus* (accessione T-PRAEX 2017), a differenti dosi, sull'accrescimento della radichetta e dell'ipocotile in *A. retroflexus*. Le misure sono espresse come medie (in mm) e le barre verticali indicano il doppio dell'errore standard.

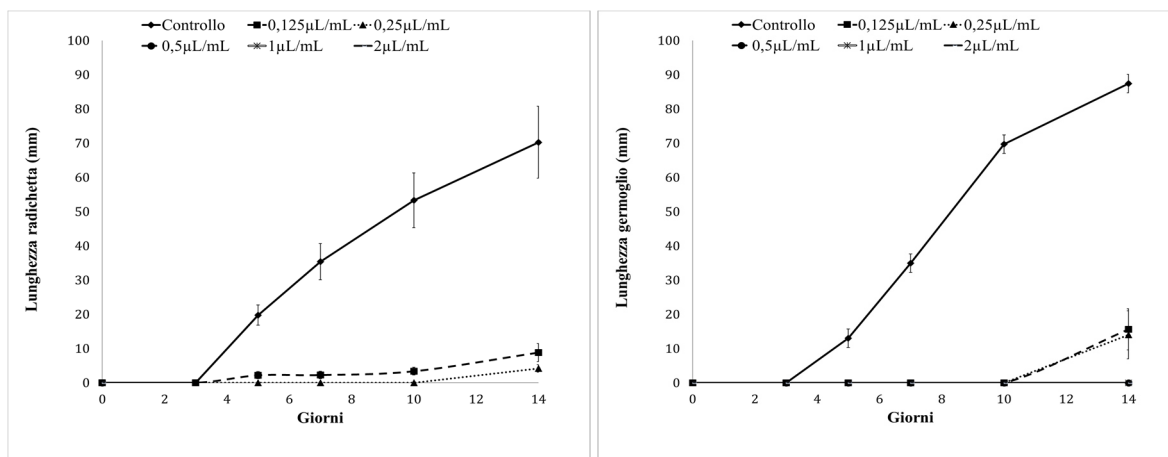


Figura 21. Effetto dell'olio essenziale di *T. praecox* subsp. *parvulus* (accessione T-PRAEX 2017), a differenti dosi, sull'accrescimento della radichetta e del germoglio in *A. fatua*. Le misure sono espresse come medie (in mm) e le barre verticali indicano il doppio dell'errore standard.

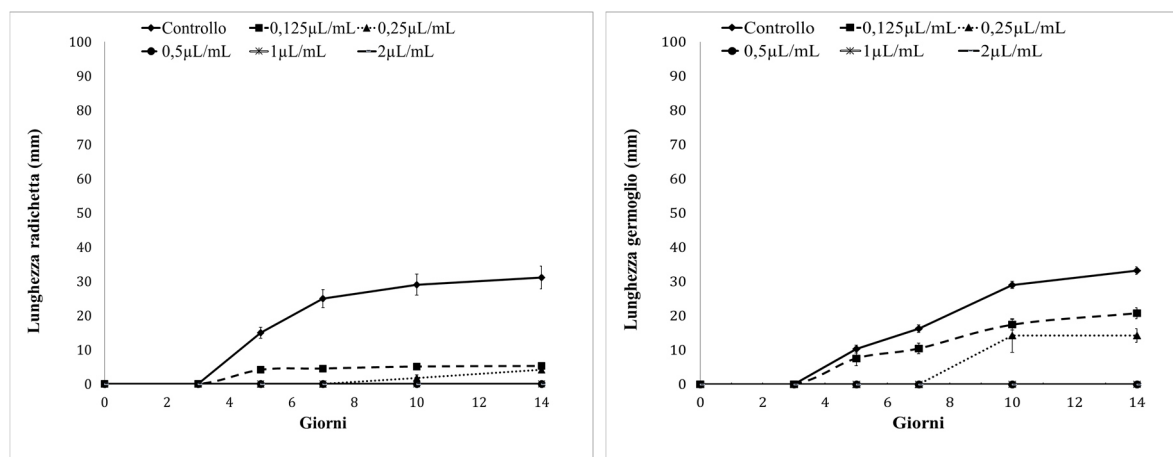


Figura 22. Effetto dell'olio essenziale di *T. praecox* subsp. *parvulus* (accessione T-PRAEX 2017), a differenti dosi, sull'accrescimento della radichetta e del germoglio in *E. crus-galli*. Le misure sono espresse come medie (in mm) e le barre verticali indicano il doppio dell'errore standard.

3.2.4 Olio essenziale di *Thymus richardii* subsp. *nitidus*

L'olio essenziale di *Thymus richardii* subsp. *nitidus* (accessione TR-MARE 2017), all'unica dose saggiata ($0.125\mu\text{L/mL}$) e solo su *A. retroflexus*, ha agito analogamente su radichetta e ipocotile, inibendone l'accrescimento del 36%, rispetto al controllo (Fig. 23).

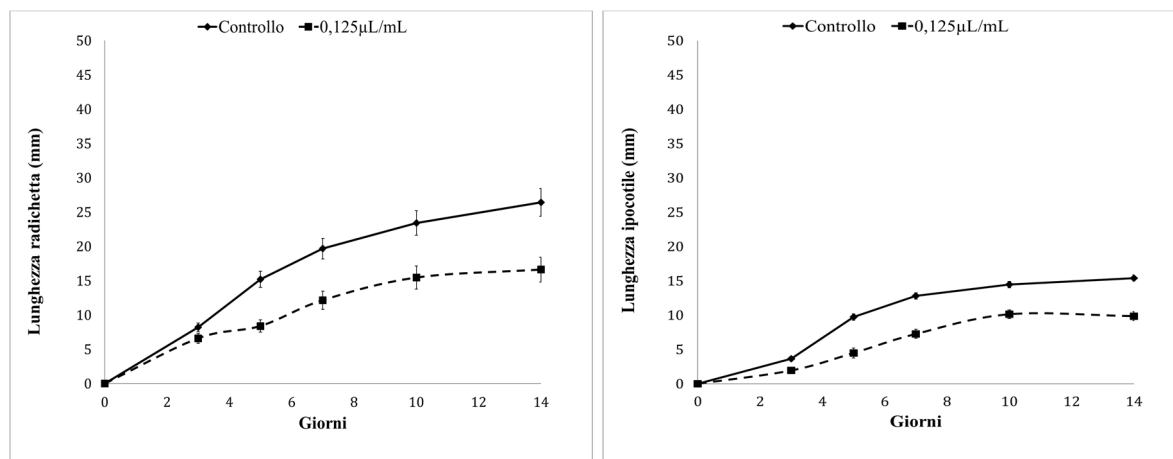


Figura 23. Effetto dell'olio essenziale di *T. richardii* subsp. *nitidus* (accessione TR-MARE 2017), a differenti dosi, sull'accrescimento della radichetta e dell'ipocotile in *A. retroflexus*. Le concentrazioni al di sopra di $0.125\mu\text{L/mL}$ non sono state saggiate. Le misure sono espresse come medie (in mm) e le barre verticali indicano il doppio dell'errore standard.

3.2.5 Olio essenziale di *Thymus spinulosus*

L'olio essenziale di *T. spinulosus* (accessione TS-FAVE 2017) ha indotto effetti differenziati sulle specie target (*A. retroflexus*, *P. oleracea* s.l., *A. fatua* ed *E. crus-galli*). In *A. retroflexus*, in particolare, è stata osservata una progressiva azione inibente sull'accrescimento della radichetta e dell'ipocotile (dal 34 al 74%), all'aumentare della dose di olio applicata (Fig. 24). In *P. oleracea* s.l. e *A. fatua* (Figg. 25, 26), la lunghezza della radichetta e dell'ipocotile/germoglio è stata ridotta più del 70% sin dalla dose di 0.125 $\mu\text{L/mL}$. In *E. crus-galli* l'effetto fitotossico riscontrato sull'accrescimento dei due organi non è stato condizionato dalle dosi applicate: inibizione media del 20%, rispetto al controllo (Fig. 27).

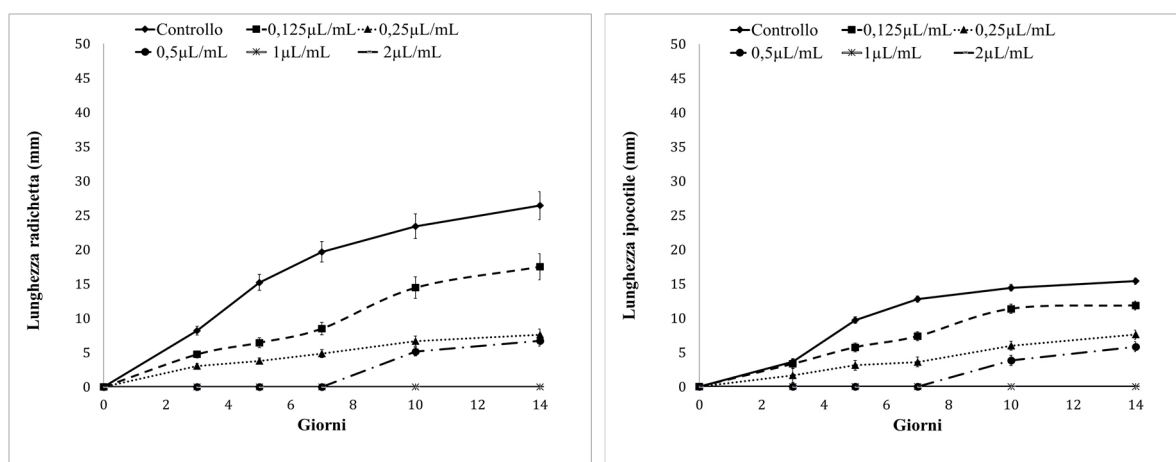


Figura 24. Effetto dell'olio essenziale di *T. spinulosus* (accessione TS-FAVE 2017), a differenti dosi, sull'accrescimento della radichetta e dell'ipocotile in *A. retroflexus*. Le misure sono espresse come medie (in mm) e le barre verticali indicano il doppio dell'errore standard.

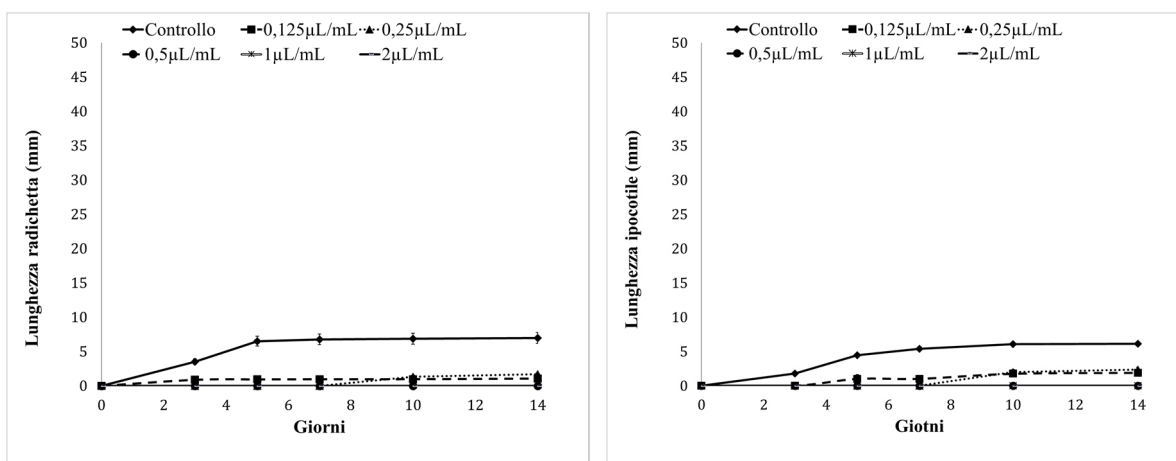


Figura 25. Effetto dell'olio essenziale di *T. spinulosus* (accessione TS-FAVE 2017), a differenti dosi, sull'accrescimento della radichetta e dell'ipocotile in *P. oleracea* s.l. Le misure sono espresse come medie (in mm) e le barre verticali indicano il doppio dell'errore standard.

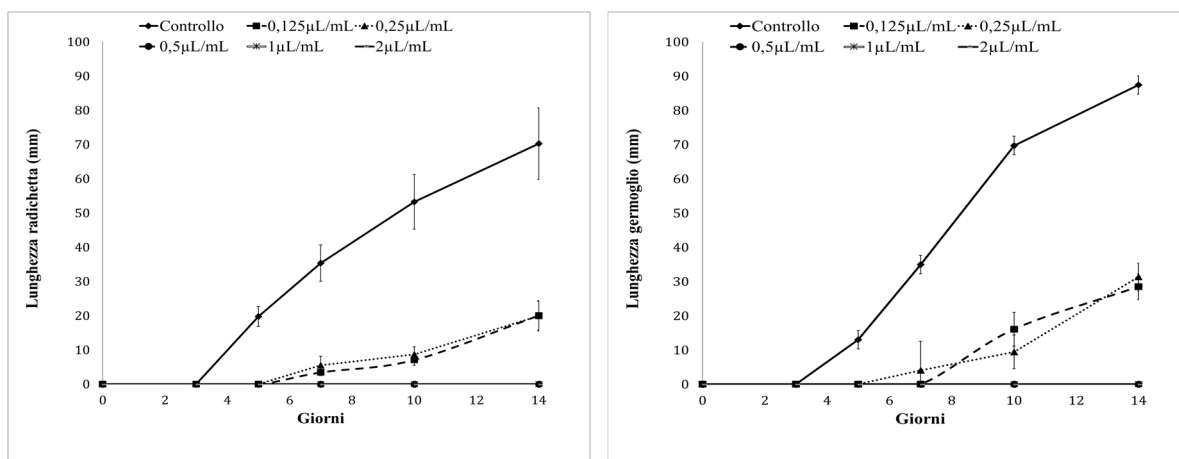


Figura 26. Effetto dell'olio essenziale di *T. spinulosus* (accessione TS-FAVE 2017), a differenti dosi, sull'accrescimento della radichetta e del germoglio in *A. fatua*. Le misure sono espresse come medie (in mm) e le barre verticali indicano il doppio dell'errore standard.

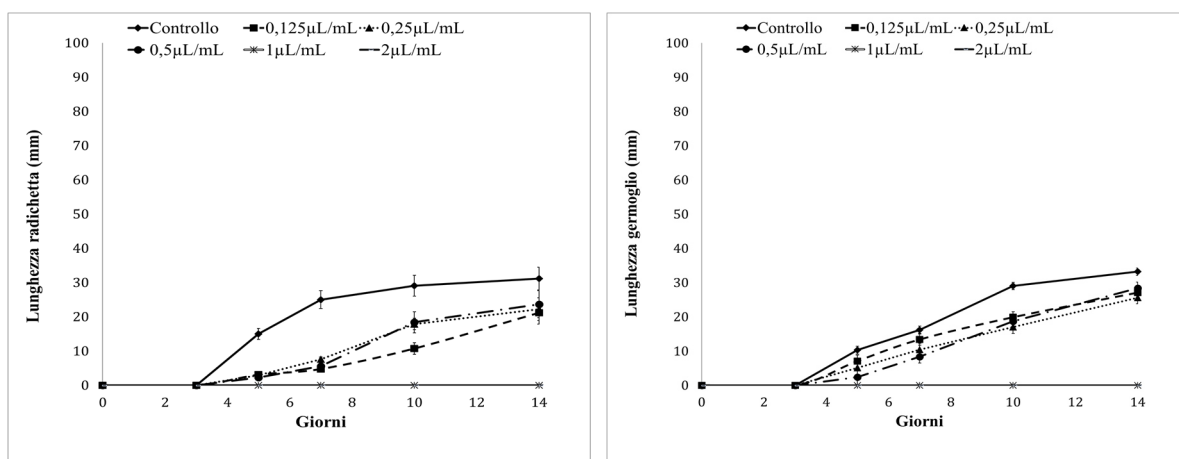


Figura 27. Effetto dell'olio essenziale di *T. spinulosus* (accessione TS-FAVE 2017), a differenti dosi, sull'accrescimento della radichetta e del germoglio in *E. crus-galli*. Le misure sono espresse come medie (in mm) e le barre verticali indicano il doppio dell'errore standard.

3.2.6 Olio essenziale di *Thymus vulgaris* subsp. *vulgaris*

L'olio essenziale di *Thymus vulgaris* subsp. *vulgaris* ha mostrato un'elevata fitotossicità sull'accrescimento delle plantule delle quattro specie infestanti.

In *A. retroflexus* ed *E. crus-galli*, alla minima concentrazione applicata ($0.125\mu\text{L/mL}$), l'accrescimento della radichetta è stato inibito del 79% e dell'88%, rispettivamente (Figg. 28 e 29). Inoltre, in *E. crus-galli* l'allungamento del germoglio è stato ridotto dal 58 al 73% con l'applicazione della dose di $0.25\mu\text{L/mL}$ (Fig. 29).

Per *P. oleracea* s.l. e *A. fatua*, in conseguenza dell'effetto inibente dell'olio sulla germinazione dei semi, non è stato possibile valutare l'azione sull'accrescimento delle plantule.

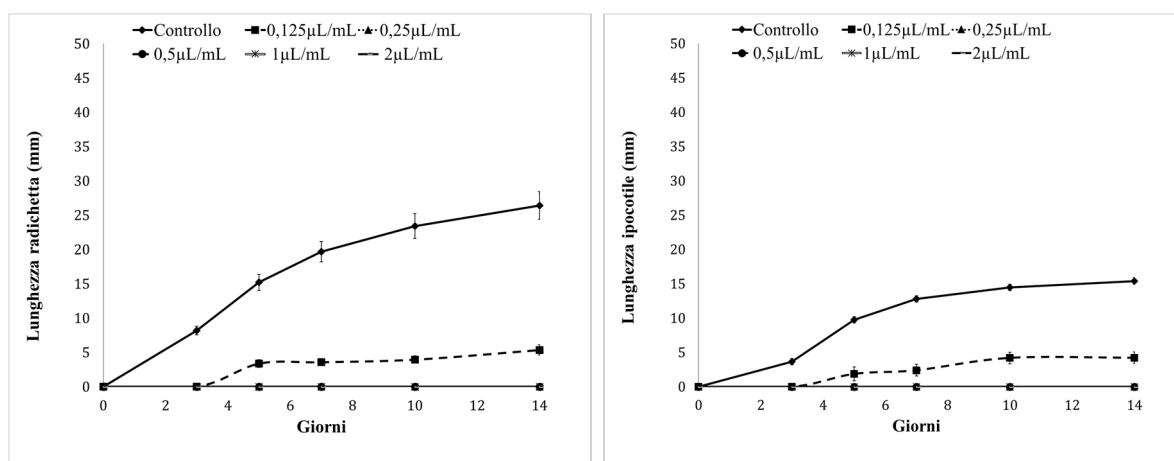


Figura 28. Effetto dell'olio essenziale di *T. vulgaris* subsp. *vulgaris*, a differenti dosi, sull'accrescimento della radichetta e dell'ipocotile in *A. retroflexus*. Le misure sono espresse come medie (in mm) e le barre verticali indicano il doppio dell'errore standard.

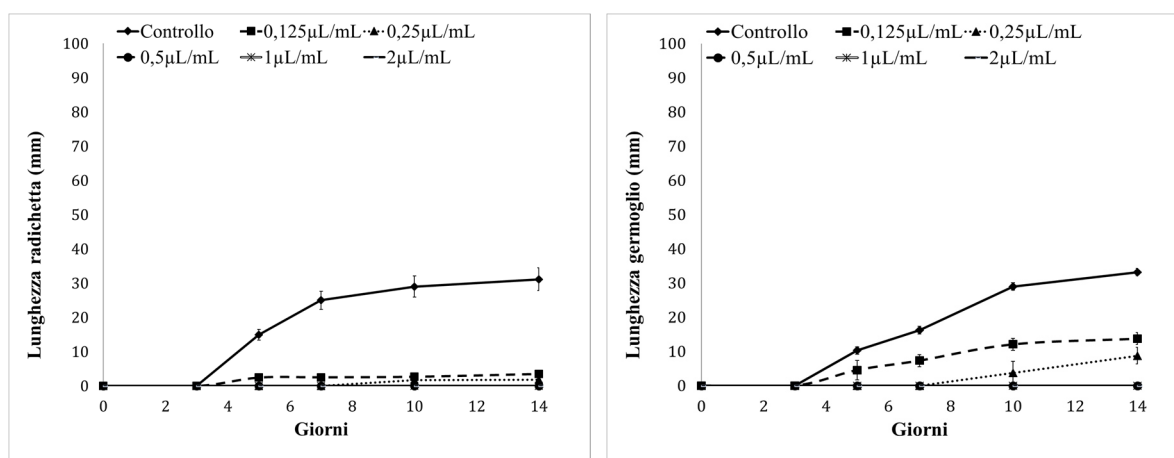


Figura 29. Effetto dell'olio essenziale di *T. vulgaris* subsp. *vulgaris*, a differenti dosi, sull'accrescimento della radichetta e del germoglio in *E. crus-galli*. Le misure sono espresse come medie (in mm) e le barre verticali indicano il doppio dell'errore standard.

3.3 Attività dell'olio essenziale di *T. spinulosus* in nanoemulsione e in nanoparticelle sulla germinazione dei semi e sull'accrescimento di piante infestanti

I risultati relativi all'effetto sulla germinazione dei semi delle diverse formulazioni (Z, GA, WPI, T80) con l'olio essenziale di *T. spinulosus* (accessione TS-FARO 2016) sono espressi mediante curve dose/risposta (Fig. 30). I dati relativi alla lunghezza della radichetta sono riportati come valore medio $\pm$ l'errore standard (Tab. 6).

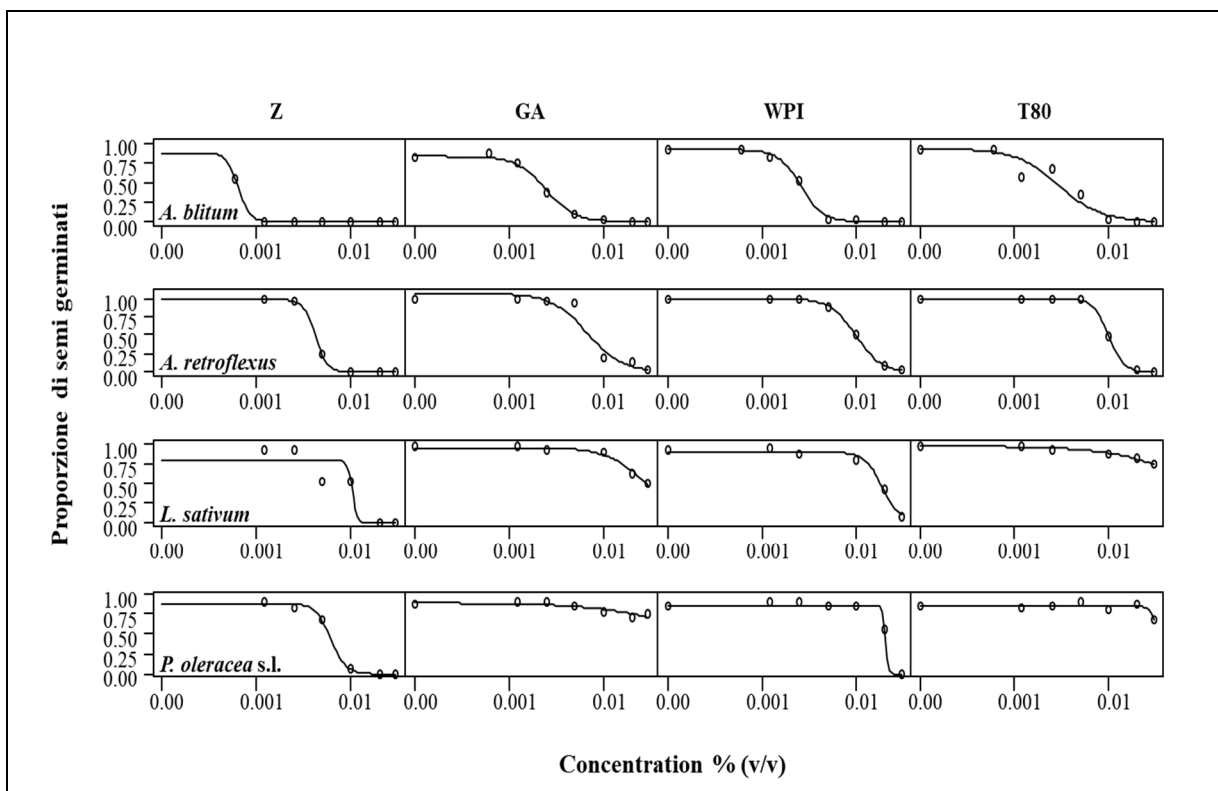


Figura 30. Effetto delle diverse formulazioni (Z, GA, WPI, T80) con olio essenziale di *T. spinulosus* sulla germinazione, a 96 ore dal trattamento. Nell'asse orizzontale sono riportate le concentrazioni in % (v/v), il valore 0.00 corrisponde al bianco di controllo. Nell'asse verticale è riportato il numero di semi germinati, espresso sotto forma di proporzione.

Tra le diverse formulazioni saggiate, le nanoparticelle di zeina (Z) hanno espresso il più alto grado di fitotossicità su tutte le specie target. In particolare, la totale inibizione della germinazione è stata raggiunta alle concentrazioni di: 0.0012% in *A. blitum*, 0.01% in *A. retroflexus*, 0.02% in *L. sativum* e *P. oleracea s.l.* (Fig. 30).

Un blando effetto fitotossico sulla germinazione e sull'accrescimento della radichetta è stato riscontrato anche nei saggi con le nanoparticelle di zeina prive di olio essenziale (bianco di controllo). In *A. blitum*, in particolare, il controllo Z (12% v/v) ha ridotto del 24% la germinazione rispetto al corrispondente saggio con solo acqua distillata. Tuttavia, applicando la formulazione Z vergine a una più bassa concentrazione (8% v/v), la percentuale di germinazione è stata pressochè identica nei due controlli.

In *A. retroflexus* e *L. sativum*, l'effetto inibitorio è stato rilevato solo a livello della radichetta, il cui accrescimento è stato ridotto di circa il 60% e 7%, rispettivamente.

Le nanoemulsioni (GA, WPI e T80), caratterizzate da una più bassa fitotossicità rispetto alle nanoparticelle di zeina, hanno determinato un efficace controllo della germinazione nelle due specie del genere *Amaranthus*; una risposta germinativa più diversificata in *L. sativum* e *P. oleracea* s.l. (Figg. 30, 31). Nelle ultime due specie, più tolleranti ai trattamenti, il maggiore effetto fitotossico (dal 13% al 100%) è stato rilevato alla dose di 0.03%. Una più bassa azione inibitoria sia sulla germinazione sia sull'accrescimento radicale è stata determinata dal T80 in *L. sativum* e *P. oleracea* s.l. (Fig. 30).

In sintesi, il grado di sensibilità delle specie target e l'effetto fitotossico delle formulazioni sulla germinazione dei semi è stato il seguente:

A. blitum > *A. retroflexus* > *L. sativum* > *P. oleracea* s.l.;

Z > WPI > GA > T80.

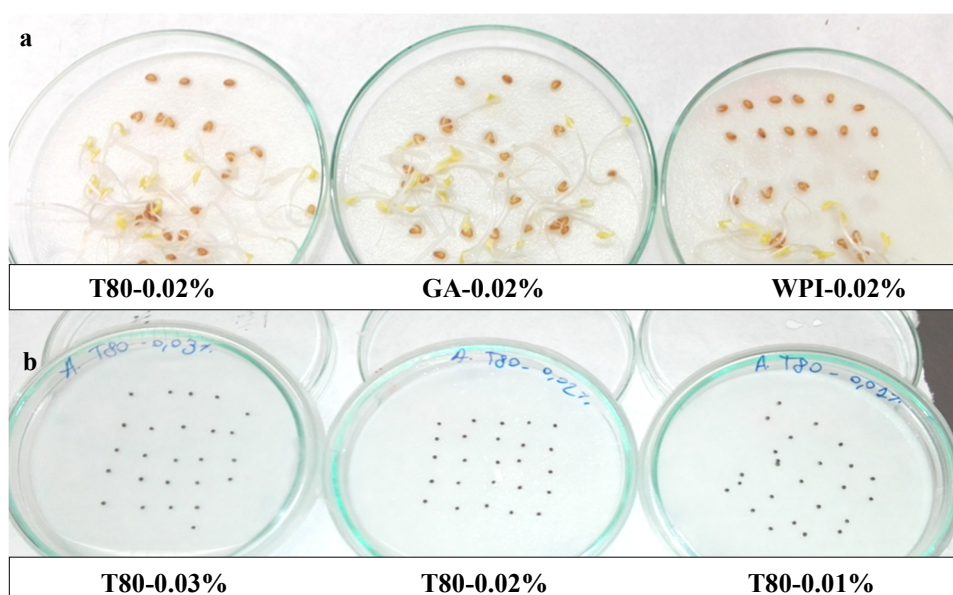


Figura 31. Effetto sulla germinazione di diverse nanoemulsioni (T80-GA-WPI) con olio essenziale di *T. spinulosus* (accessione TS-FARO 2016) in: a) *L. sativum*, alla dose di 0.02% (v/v); b) *A. blitum* alle dosi di 0.01, 0.02, 0.03% (v/v).

Nei trattamenti a concentrazioni >0.01%, ove la germinazione è stata soppressa o considerevolmente ridotta, i semi non germinati hanno presentato solo una lacerazione del tegumento, per effetto dell'imbibizione, e una perdita di vitalità a causa di possibili alterazioni strutturali a carico dell'embrione e dei tessuti annessi (Fig. 32).

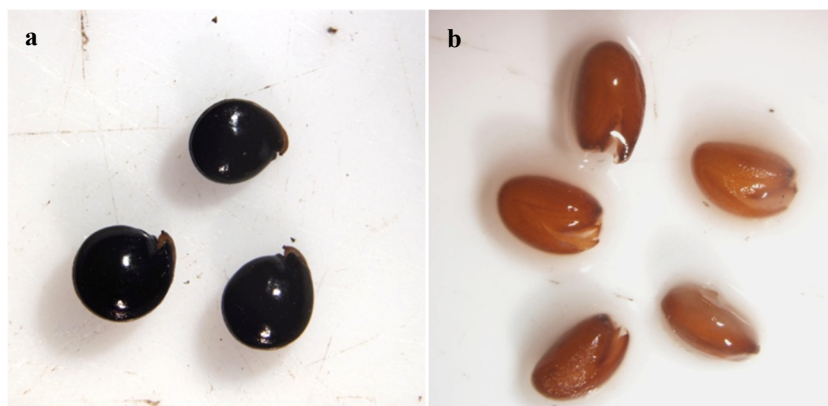


Figura 32. Semi non germinati di: a) *A. retroflexus*, b) *L. sativum* trattati con le nanoemulsioni T80 e WPI, alla dose di 0.01% di olio essenziale di *T. spinulosus* (accessione TS-FARO 2016).

L'effetto delle formulazioni rilevato sull'accrescimento radicale segue lo stesso trend osservato per la germinazione. Si conferma infatti la maggiore efficacia, in termini di fitotossicità, delle nanoparticelle di zeina e una forte correlazione tra la dose applicata e il livello di inibizione dello sviluppo della radichetta in tutte le specie target. Anche nei test con le nanoemulsioni (GA, WPI e T80) è stata registrata una progressiva riduzione della lunghezza media della radichetta con l'applicazione di concentrazioni crescenti di olio essenziale, eccetto che in *L. sativum* (Tab. 6).

Tabella 6. Effetto delle diverse formulazioni e dei relativi bianchi di controllo (H₂O, GA, T80, WPI, Z) sull'accrescimento della radichetta, nelle diverse specie target. I dati sono espressi come valore medio $\pm$ l'errore standard (ES). I valori con differenti lettere sono statisticamente significativi allo 0.05.

	<i>Amaranthus blitum</i>			<i>Amaranthus retroflexus</i>			<i>Lepidium sativum</i>			<i>Portulaca oleracea</i> s.l.		
Formulazione % (v/v)	Lunghezza (cm)	SE		Lunghezza (cm)	SE		Lunghezza (cm)	SE		Lunghezza (cm)	SE	
H2O	1,21 (0,06)	BDE		3,03 (0,09)	EFG		4,06 (0,14)	CEG		1,10 (0,04)	BCDI	
GA	1,16 (0,17)	BCDEF		2,40 (0,11)	CD		4,48 (0,16)	DEF		1,35 (0,05)	EFG	
GA-0,0006	1,44 (0,12)	DG										
GA-0,0012	0,74 (0,12)	HIJKL		2,85 (0,18)	EFG		3,82 (0,28)	ABCG		1,31 (0,09)	AEFG	
GA-0,0025	0,72 (0,12)	HIJKL		2,75 (0,18)	CEFG		4,12 (0,28)	ABCDEG		1,47 (0,09)	EFH	
GA-0,005	1,64 (0,14)	G		2,33 (0,18)	CD					1,24 (0,09)	ABCEG	
GA-0,01	0,35 (0,17)	AH		1,74 (0,12)	AB		4,61 (0,16)	DF		1,00 (0,09)	DI	
GA-0,02	0,00 (0,00)			1,30 (0,12)	HIJ		4,43 (0,14)	DEF		0,46 (0,09)	JK	
GA-0,03	0,00 (0,00)			0,95 (0,17)	HKL		3,57 (0,16)	AB		0,29 (0,09)	J	
T80	1,26 (0,07)	DE		2,41 (0,11)	CD		5,07 (0,16)	HI		1,53 (0,05)	H	
T80-0,0006	1,07 (0,12)	BCEFI										
T80-0,0012	0,98 (0,12)	BCFIJK		3,23 (0,18)	E		4,85 (0,28)	DFHI		1,81 (0,09)	L	
T80-0,0025	0,74 (0,12)	FHIJKL		2,53 (0,18)	CDFG		4,09 (0,28)	ABCDEG		1,78 (0,09)	L	
T80-0,005	1,04 (0,12)	BCEFIK		2,47 (0,18)	CDF					1,74 (0,09)	L	
T80-0,01	0,50 (0,14)	AHL		1,52 (0,11)	AI		5,45 (0,16)	H		1,16 (0,09)	ABCDG	
T80-0,02	0,00 (0,00)			0,86 (0,15)	KLM		5,47 (0,16)	H		0,62 (0,09)	K	
T80-0,03	0,00 (0,00)			0,40 (0,37)	KLM		4,78 (0,15)	FI		0,41 (0,09)	JK	
WPI	0,44 (0,07)	A		1,62 (0,11)	AB		3,67 (0,16)	ABC		1,16 (0,05)	ABCD	
WPI-0,0006	0,97 (0,12)	BCFIJK										
WPI-0,0012	0,81 (0,12)	CFIJKL		3,03 (0,18)	EG		4,31 (0,28)	DEFG		1,63 (0,09)	HL	
WPI-0,0025	0,64 (0,12)	AHJL		2,46 (0,18)	CDF		4,71 (0,28)	DFI		1,49 (0,09)	FH	
WPI-0,005	0,55 (0,25)	AHIJKL		1,64 (0,18)	ABI					0,58 (0,09)	K	
WPI-0,01	0,35 (0,17)	AH		1,33 (0,09)	IJ		4,04 (0,16)	CEG		0,92 (0,09)	I	
WPI-0,02	0,00 (0,00)			0,78 (0,12)	KLM		1,89 (0,14)	J		0,24 (0,09)	J	
WPI-0,03	0,00 (0,00)			0,54 (0,15)	KM		0,86 (0,16)	K				
Z	0,65 (0,10)	AHL		1,10 (0,13)	HJL		3,75 (0,20)	ABCG		1,19 (0,07)	ABCDG	
Z-0,0006	0,70 (0,12)	AHJL										
Z-0,0012	0,20 (0,25)	AH		2,49 (0,18)	CDF		4,14 (0,28)	ACDEG		1,45 (0,09)	EFH	
Z-0,0025	0,00 (0,00)			2,03 (0,18)	BD		3,55 (0,28)	ABCG		1,27 (0,09)	ACEFG	
Z-0,005	0,00 (0,00)			0,28 (0,26)	M		1,28 (0,28)	K		0,40 (0,09)	JK	
Z-0,01	0,00 (0,00)			0,00 (0,00)			0,78 (0,20)	K		0,25 (0,09)	J	

3.4 Attività erbicida dell'olio essenziale di *Thymus spinulosus* in soluzione acquosa

L'olio essenziale di *Thymus spinulosus* (accessione Cozzo S. Elia 2017), applicato *in vivo*, ha determinato evidenti sintomi di disseccamento in *A. retroflexus*, *A. fatua* ed *E. crus-galli*, a tutte le concentrazioni testate (8µL, 12µL, 16µL/mL).

Il più alto grado di fitotossicità (valore 3) è stato rilevato in *A. retroflexus*. Tutte le piante, a 24h dal trattamento, sia nebulizzate sia irrigate con 20 mL di soluzione alla concentrazione di 8µL/mL di olio essenziale hanno evidenziato un rapido avvizzimento (Fig. 33).

Severi sintomi di fitotossicità (valore 2), quali clorosi e necrosi fogliare, sono stati osservati anche nelle piante di *A. fatua*. La nebulizzazione è stato il metodo di somministrazione più efficace (Fig. 34).

In *E. crus-galli* è stato raggiunto il 100% di mortalità nebulizzando 20 mL e 5 mL di soluzione alle dosi di 8µL/mL e 16µL/mL (Figg. 35 e 36). Alle concentrazioni di 8µL e 12µL/mL, applicate impiegando un minor quantitativo di soluzione (10 o 5 mL), sono sopravvissute soltanto le piante più vigorose (1 singola pianta per trattamento) che hanno, comunque, manifestato sintomi di necrosi e disseccamento nei giorni seguenti il trattamento (Fig. 36).

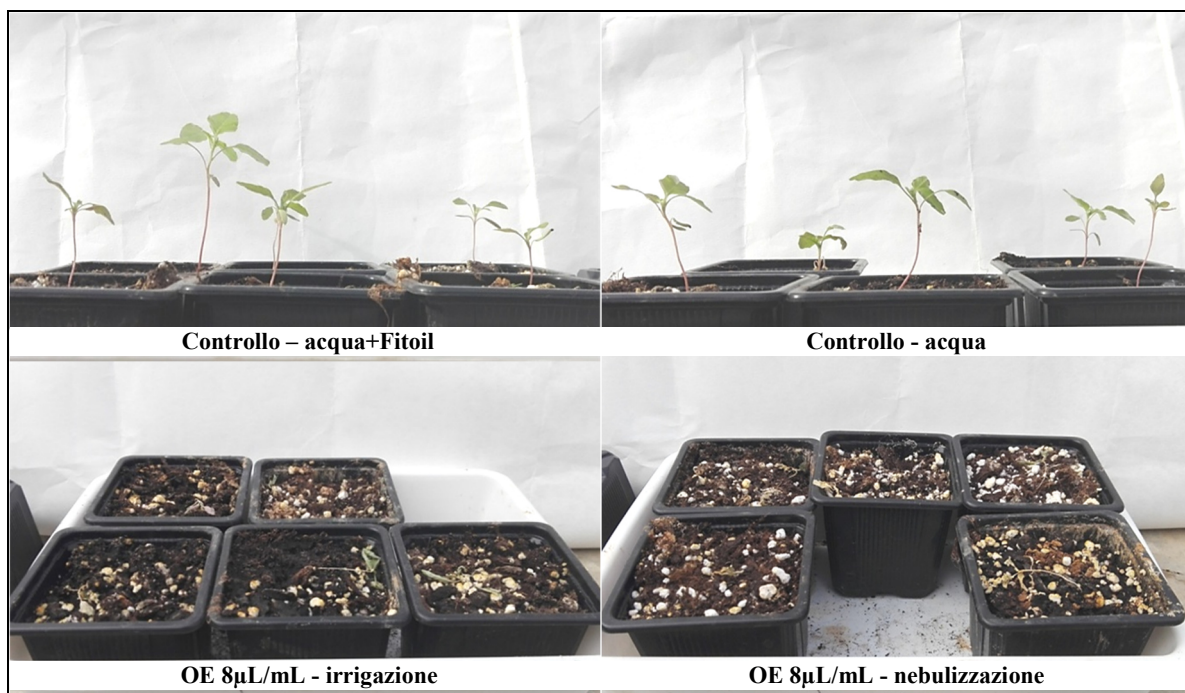


Figura 33. Piante di *A. retroflexus* irrigate e nebulizzate con 20 mL di soluzione contenente 8µL/mL di olio essenziale di *T. spinulosus*, a 9 giorni dai trattamenti.

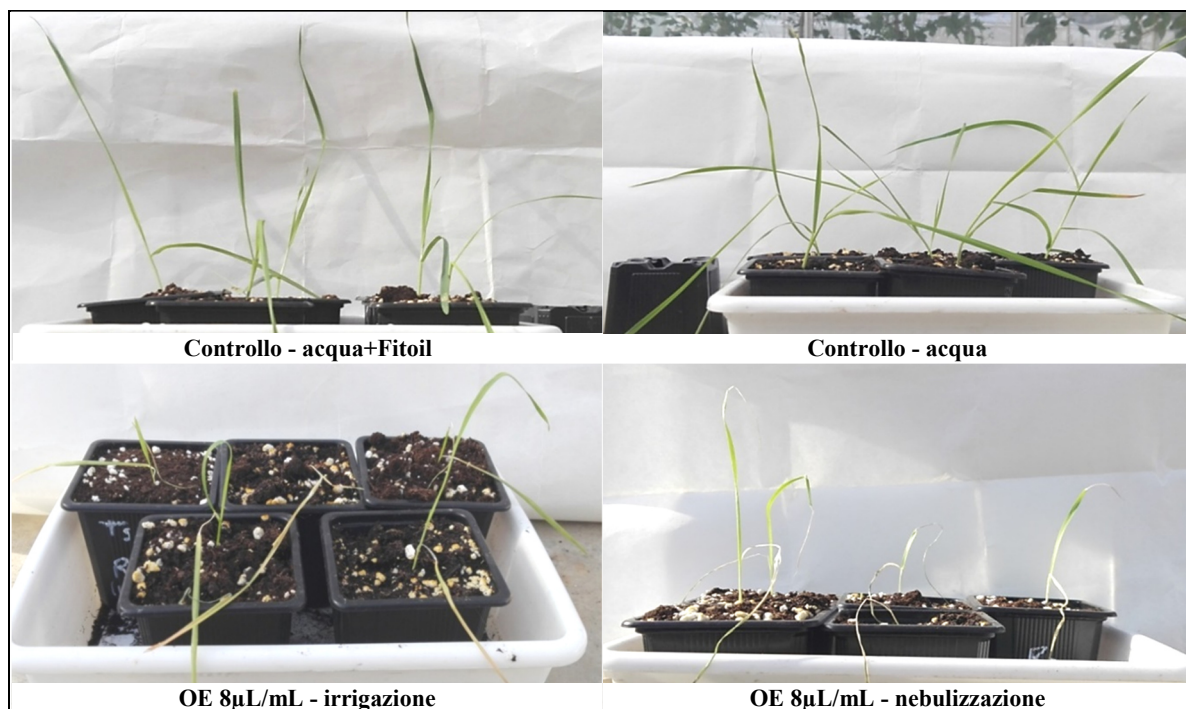


Figura 34. Piante di *A. fatua* irrigate e nebulizzate con 20 mL di soluzione contenente 8µL/mL di olio essenziale di *T. spinulosus*, a 9 giorni dai trattamenti.

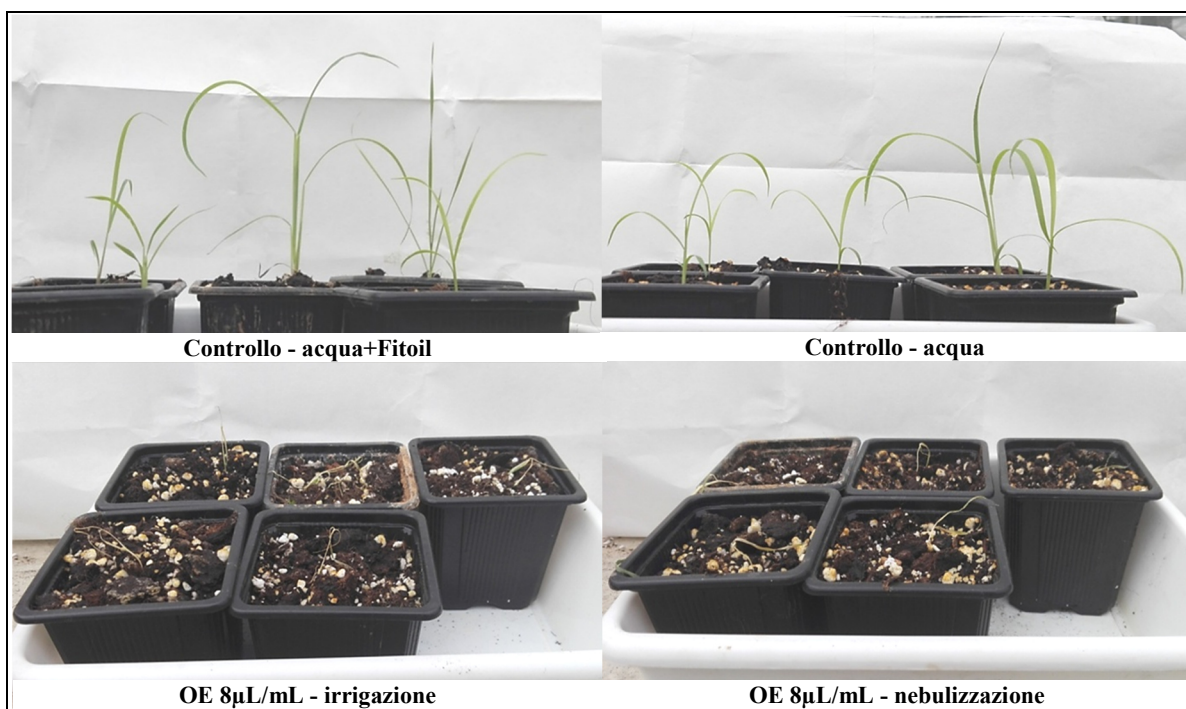


Figura 35. Piante di *E. crus-galli* irrigate e nebulizzate con 20 mL di soluzione contenente 8µL/mL di olio essenziale di *T. spinulosus*, a 9 giorni dai trattamenti.

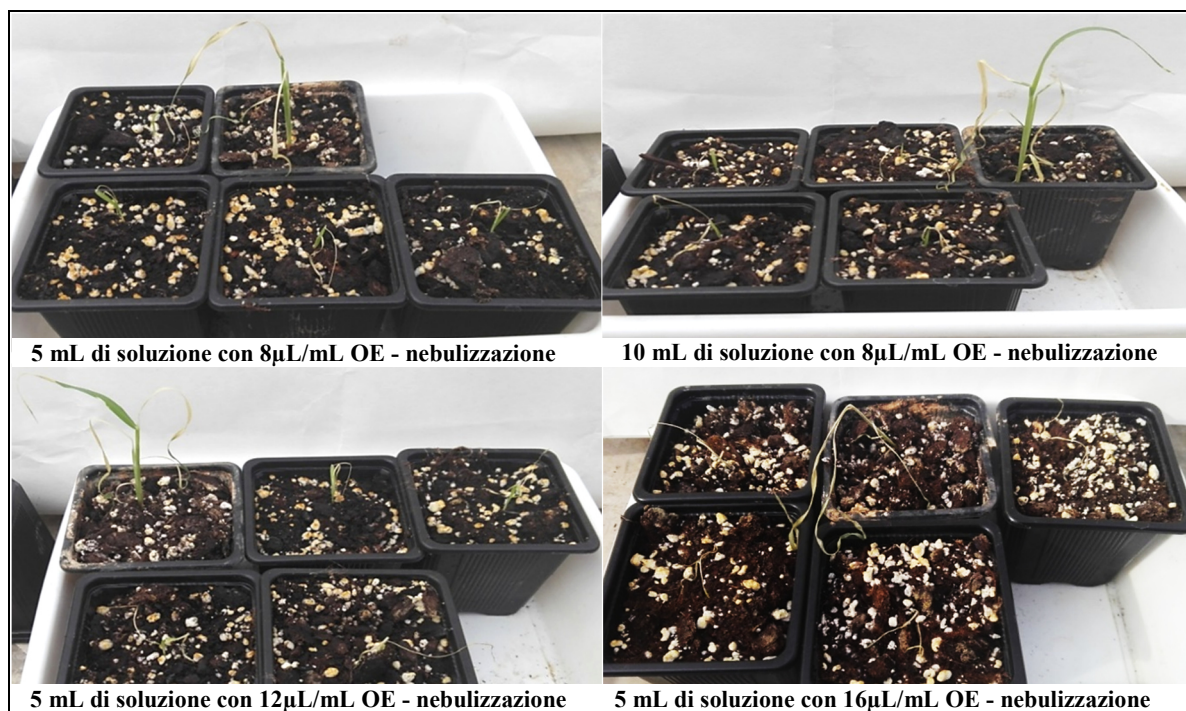


Figura 36. Piante di *E. crus-galli* nebulizzate con 5 e/o 10 mL di soluzione alla concentrazione di 8µL, 12µ e 16µL/mL di olio essenziale di *T. spinulosus*, a 6 giorni dai trattamenti.

Per valutare l'effetto dei trattamenti e di questi rispetto ai bianchi di controllo (acqua e acqua+Fitoil), dopo 10 giorni, le piante di *A. fatua* e di *E. crus-galli* sono state eradicare ed è stato determinato il peso fresco e secco (essiccazione in stufa per 48h a 60°C) (Tabb. 7 e 8).

Tabella 7. Effetto dell'olio essenziale di *T. spinulosus*, somministrato per irrigazione e nebulizzazione, su piante di *A. fatua*. Il peso fresco e secco (dopo 48h in stufa a 60°C) delle 5 plantule, determinato dopo i trattamenti, è espresso (in mg) come media $\pm$ l'errore standard (ES).

<i>Avena fatua</i>						
Dose	Modalità applicazione	Volume soluzione	Peso fresco	ES	Peso secco	ES
Controllo	irrigazione	20mL	3,809 $\pm$ 0,90		0,472 $\pm$ 0,03	
Fitoil 1 μ L/mL	irrigazione	20mL	4,053 $\pm$ 0,34		0,542 $\pm$ 0,04	
8 μ L/mL	irrigazione	20mL	2,048 $\pm$ 0,95		0,172 $\pm$ 0,01	
8 μ L/mL	nebulizzazione	20mL	0,562 $\pm$ 0,16		0,183 $\pm$ 0,05	

Tabella 8. Effetto dell'olio essenziale di *T. spinulosus*, somministrato per irrigazione e nebulizzazione, su piante di *E. crus-galli*. Il peso fresco e secco (dopo 48h in stufa a 60°C) delle 5 plantule, determinato dopo i trattamenti, è espresso (in mg) come media $\pm$ l'errore standard (ES).

<i>Echinocloa crus-galli</i>						
Dose	Modalità applicazione	Volume soluzione	Peso fresco	ES	Peso secco	ES
Controllo	irrigazione	20mL	1,204 $\pm$ 0,38		0,157 $\pm$ 0,06	
Fitoil 1 μ L/mL	irrigazione	20mL	1,213 $\pm$ 0,56		0,205 $\pm$ 0,11	
8 μ L/mL	nebulizzazione	10mL	0,600 $\pm$ 0,46		0,097 $\pm$ 0,07	
8 μ L/mL	nebulizzazione	5mL	0,340 $\pm$ 0,19		0,066 $\pm$ 0,05	
12 μ L/mL	nebulizzazione	5mL	0,350 $\pm$ 0,26		0,071 $\pm$ 0,05	
16 μ L/mL	nebulizzazione	5mL	0,176 $\pm$ 0,09		0,048 $\pm$ 0,03	

4. DISCUSSIONI

La fitotossicità di vari oli essenziali e dei loro componenti principali sulla germinazione e sull'accrescimento vegetativo di diverse specie vegetali è ben documentata in letteratura (Putnam & Tang, 1986; Fischer, 1991; Dudai *et al.*, 1999; Batish *et al.*, 2012; Verdeguer *et al.*, 2009; 2012; Taban *et al.*, 2013; Amri *et al.*, 2013; Rolli *et al.*, 2014).

Agli oli essenziali e ai loro costituenti, infatti, viene attribuita la capacità di: inibire la divisione cellulare e la sintesi del DNA a livello del meristema apicale (Romagni *et al.*, 2000; Nishida *et al.*, 2005); alterare la permeabilità delle membrane mitocondriali, nucleari e plasmatiche, causandone la distruzione (Asplund, 1968; Fischer, 1991; Zygadlo & Juliani, 2000); destrutturare i tessuti (Lorber & Muller, 1980; Bakkali *et al.*, 2008; Bouajaj *et al.*, 2014); indurre processi di perossidazione lipidica (Scrivanti *et al.*, 2003); danneggiare la parete cellulare (Lambert *et al.*, 2001); ridurre il contenuto in clorofilla (Romagni *et al.*, 2000).

La loro selettività sulle diverse specie vegetali, tuttavia, non è stata ancora adeguatamente valutata. Tra l'altro, non tutti gli oli essenziali esercitano la stessa specificità e manifestano un'ampiezza d'azione che differisce in relazione alla composizione chimica e alle concentrazioni applicate (Dudai *et al.*, 1999; Tworkoski, 2002; Mao *et al.*, 2004; Bakkali *et al.*, 2008; Verdeguer *et al.*, 2009; Cavalieri & Caporali, 2010).

La presente ricerca, alla luce di quanto noto, ha inteso approfondire gli effetti degli oli essenziali di *taxa* spontanei del genere *Thymus* sulla germinazione e sull'accrescimento delle plantule in cinque specie infestanti: *A. blitum*, *A. retroflexus*, *P. oleracea* s.l., *A. fatua*, *E. crus-galli*.

Le suddette specie hanno manifestato differenti gradi di inibizione, relativamente a germinazione, lunghezza della radichetta e ipocotile/germoglio; positivamente correlati alla dose applicata. *P. oleracea* s.l. è stata la specie che più ha risentito dell'effetto fitotossico degli oli essenziali. *Echinocloa crus-galli*, di contro, è stata la specie più tollerante. In generale, le dicotiledoni (*A. retroflexus*, *A. blitum*, *P. oleracea* s.l.) hanno mostrato una più alta suscettibilità rispetto alle monocotiledoni (*A. fatua*, *E. crus-galli*), in accordo con quanto descritto da altri Autori (Synowiec *et al.*, 2016; Synowiec & Drozdek, 2016).

Le differenziate risposte delle specie target possono essere correlate alla composizione chimica degli oli testati, al differente livello di tolleranza di ciascuna specie target e ai diversi meccanismi di detossificazione espressi da ognuna di esse (Coleman *et al.*, 1997; Dudai *et al.*, 2004), nonché al diverso grado di permeabilità del tegumento dei semi (Williams & Hoagland, 1982).

In relazione alla composizione chimica, alcuni oli essenziali possono esplicare un elevato effetto fitotossico a basse concentrazioni, come osservato ad esempio per *Satureja montana* L. (Angelini *et al.*, 2003), altri possono manifestare un'attività a concentrazioni elevate o essere inefficaci. Queste risposte sono state riscontrate, ad esempio, con gli oli essenziali di *Lantana camara* L. ed *Eriocephalus africanus* L. sulla germinazione e crescita di plantule di *P. oleracea* (Verdeguer *et al.*, 2009).

I nostri risultati hanno evidenziato che, tra gli oli essenziali testati, la più alta fitotossicità è stata espressa da quelli di: *Thymus vulgaris* subsp. *vulgaris*, *Thymus praecox* subsp. *parvulus* e *Thymus longicaulis* subsp. *longicaulis*. L'azione inibente indotta dall'olio essenziale di *Thymus vulgaris* sulla germinazione è stata descritta anche da altri Autori su varie specie infestanti e coltivate, quali *P. oleracea*, *Lactuca sativa* L., *Conyza canadensis* (L.) Cronq., *Capsicum annuum* L., *Chenopodium album* L., *E. crus-galli*, *Xanthium strumarium* L., *Avena sterilis* L. e *Raphanus sativus* L. (Angelini *et al.*, 2003; Arminante *et al.*, 2006; Uremis *et al.*, 2009; Grosso *et al.*, 2010; Rolim de Almeida *et al.*, 2010; Verdeguer, 2011).

In accordo a quanto già descritto da altri Autori (Abraham *et al.*, 2000; Tworkoski, 2002; Scrivanti *et al.*, 2003; Vokou *et al.* 2003; Singh *et al.* 2006; Arminante *et al.*, 2006; Kordali *et al.*, 2007; De Martino *et al.*, 2010a), l'effetto fitotossico riscontrato sulla germinazione dei semi e sull'accrescimento delle plantule delle specie infestanti saggiate, può essere relazionato alla elevata concentrazione in monoterpeni (idrocarburi e ossigenati), che rappresentano la classe chimica prevalente negli oli testati.

I composti ossigenati e i monoterpeni, in particolare, come è stato documentato (Singh *et al.*, 2002; Vokou *et al.*, 2003; Dudai *et al.*, 2004; Kordali *et al.*, 2007; De Martino *et al.*, 2010a), agiscono da inibitori della germinazione e della crescita in maniera più efficace rispetto agli idrocarburi, anche in relazione alla loro maggiore solubilità in acqua (Fischer *et al.*, 1994).

Negli oli essenziali delle specie spontanee di *Thymus* allo studio è stata riscontrata una prevalenza di componenti ossigenati in quelli che hanno espresso il più alto grado di inibizione: il carvacrolo in *Thymus vulgaris* subsp. *vulgaris* (18.57% della composizione totale), il timolo in *Thymus praecox* subsp. *parvulus* (44.9% della composizione totale) e in *Thymus longicaulis* subsp. *longicaulis* (31.7% della composizione totale). Quest'ultimo (accessione TL-FAGO 2017), si contraddistingue, rispetto agli altri oli saggiati, anche per l'elevata concentrazione in 1,8-cineolo (8.4% della composizione totale). A tali composti prevalenti potrebbe essere attribuita la fitotossicità da noi riscontrata, in accordo con altri studi riguardanti l'attività di oli essenziali su piante sia infestanti sia coltivate (Koitabashi *et al.*, 1997; Romagni *et al.*, 2000; Vokou *et al.*, 2003; Dudai *et al.*, 2004; Arminante *et al.*,

2006; Azirak & Karaman, 2008; Kordali *et al.*, 2008; De Martino *et al.*, 2010a; Verdeguer, 2011; Taban *et al.*, 2013).

In relazione alle suddette valutazioni, la più bassa fitotossicità degli oli essenziali di *T. paronychioides* (accessioni TP-VENT e TP-CAMM 2017), sulla germinazione dei semi e sul successivo accrescimento delle plantule, potrebbe essere correlata al loro minore contenuto in composti ossigenati (13.3–24.5% i monoterpeni, 11.4–9.4% i sesquiterpeni) rispetto agli idrocarburi (37.6–57.3% i monoterpeni, 20.7–26% i sesquiterpeni). Un certo grado di efficacia è stato comunque rilevato su *A. retroflexus*, alla dose di 0.5µL/mL, in cui sono stati ridotti sia la percentuale di semi germinati sia l'accrescimento delle plantule, rispetto al controllo. Di contro, l'olio essenziale dell'accessione TP-VENT ha determinato in *E. crus-galli*, alla concentrazione di 0.125µL/mL, una stimolazione della germinazione. Tale risultato è in accordo con quanto riportato da altri Autori (Stebbing, 1982; Rice, 1984; Putnam & Tang, 1986; Kordali *et al.*, 2007), secondo i quali le sostanze allelopatiche in grado di inibire la germinazione e/o la crescita di una specie, a una certa concentrazione, possono avere effetti stimolanti sulla stessa o su un'altra specie, a una concentrazione inferiore (*Amaranthus retroflexus*, *Chenopodium album* e *Rumex crispus*).

Sebbene le caratteristiche biofisiche e biologiche degli oli essenziali siano generalmente attribuite ai componenti quantitativamente più abbondanti, tuttavia, trattandosi di miscele complesse, è importante non trascurare il potenziale effetto sinergico e/o antagonistico modulato dai molteplici composti presenti a più basse concentrazioni o in tracce (Vokou *et al.*, 1999; Santana-Rios *et al.*, 2001; Vokou *et al.*, 2003; Hoet *et al.*, 2006). Quindi, per valutare la bioattività, è più significativo studiare un olio essenziale nel suo complesso piuttosto che i singoli componenti.

Comparando l'azione esercitata dagli oli essenziali di timo sulla crescita dei due organi della plantula monitorati (radichetta e ipocotile/germoglio) è emerso che la radichetta è l'organo più sensibile. Tale osservazione trova conferma in altri studi (Dudai *et al.*, 1999), nei quali sono stati testati anche singoli componenti, come ad esempio l'eugenolo (Ahuja *et al.*, 2014; 2015). Il differente grado di inibizione osservato sulla crescita dei due organi può essere imputato alla più alta permeabilità della radichetta ai monoterpeni, rispetto all'ipocotile (Yoshimura *et al.*, 2011), e alle peculiari modalità di accrescimento di ciascuno. Ovvero, la crescita dell'ipocotile dipende in gran parte dalla distensione cellulare, meno sensibile all'effetto dei suddetti composti che, invece, inibiscono la divisione cellulare da cui dipende, insieme alla distensione, la crescita radicale (Nishida *et al.*, 2005).

Per quanto riguarda le nanoemulsioni e le nanoparticelle di zeina con olio essenziale di *T. spinulosus*, i risultati dei test sono stati piuttosto interessanti. Alla più alta dose saggiata

(0.03%) infatti, tutte le formulazioni testate hanno soppresso parzialmente o totalmente la germinazione in quasi tutte le specie target, riducendo sensibilmente anche la crescita della radichetta. Le nanoparticelle di zeina, hanno determinato il più alto effetto fitotossico, rispetto alle altre formulazioni, inibendo significativamente o sopprimendo la germinazione.

Un effetto inibitorio dose-dipendente sulla crescita delle piante di *Zea mays* L., *E. crus-galli* e *Chenopodium album* L., trattate con oli essenziali di *Mentha×piperita* L., *Carum carvi* L. e *Acorus calamus* L. microincapsulati con maltodestrine e gomma arabica come agenti carrier, è stato descritto nel recente lavoro di Synowiec *et al.* (2016). Gli stessi Autori hanno evidenziato, altresì, la peculiare attività inibente esercitata dalle sole maltodestrine.

Analogo risultato, è stato da noi riscontrato saggiando l'attività degli oli essenziali di *T. longicaulis* subsp. *longicaulis* e *T. spinulosus*, incapsulati con zeina, zeina/maltodestrine e zeina/gomma arabica, sul processo germinativo dei semi di differenti specie infestanti (dati non riportati). Questa preliminare sperimentazione ha sottolineato, infatti, un'azione fitotossica amplificata rispetto agli oli essenziali *tal quali*. Altro elemento significativo, emerso da questi saggi, è stato il marcato effetto inibitorio espresso dai bianchi di controllo sempre sulla germinazione dei semi, in tutte le specie target.

Pertanto, la potenziale azione inibitoria espressa dagli agenti impiegati come emulsionanti e/o carrier, necessita di ricerche più approfondite per meglio caratterizzare la loro tossicità, la reversibilità dell'effetto, la minima/massima dose inibente, la selettività su diversi organismi (Fraceto *et al.*, 2016), etc.

Il lavoro di ricerca ha messo in evidenza le promettenti potenzialità degli oli essenziali di *Thymus* (*tal quali*, in nanoemulsione e in nanoparticelle) in termini di attività erbicida, ciò fa presupporre a un loro eventuale impiego in agricoltura biologica e in sistemi di gestione integrata per una lotta sostenibile alle piante infestanti.

5. CONCLUSIONI

Il presente lavoro di ricerca focalizzato sull'analisi della composizione chimica e dell'attività biologica degli oli essenziali di molteplici accessioni e *taxa* di *Thymus*, presenti in Sicilia e Calabria, finora mai indagati dai suddetti punti di vista; ha fornito interessanti risultati e molteplici spunti per possibili risvolti applicativi.

In Sicilia, il genere *Thymus* è rappresentato da cinque differenti *taxa*. Tre di questi, *T. paronychioides*, *T. praecox* subsp. *parvulus* e *T. richardii* subsp. *nitidus*, sono endemici, ad areale puntiforme e distribuiti entro specifici piani altitudinali. *T. longicaulis* subsp. *longicaulis* e *T. spinulosus* hanno, invece, una più ampia distribuzione essendo rappresentati il primo in molte regioni italiane (eccetto Sardegna, Liguria, Piemonte, Valle d'Aosta, Lombardia, Trentino Alto Adige), il secondo solo nell'Italia meridionale (Calabria, Puglia, Basilicata, Campania) e Sicilia. Gli altri *taxa* studiati, *T. striatus* subsp. *striatus* e *T. vulgaris* subsp. *vulgaris* sono presenti, allo stato spontaneo, solo in alcune regioni dell'Italia centrale (Calabria, Basilicata, Campania) e settentrionale (Valle d'Aosta, Piemonte, Liguria, Emilia Romagna, Toscana, Umbria, Lazio, Abruzzo), rispettivamente.

I risultati ottenuti hanno evidenziato un'apprezzabile variabilità intra- e inter-specifica nei *taxa* di *Thymus* indagati sia in termini composizionali sia nei tratti morfologici e hanno contribuito a consolidare e ampliare, per le entità distribuite in Sicilia, le relative conoscenze tassonomiche.

I profili chimici degli oli essenziali dei *taxa* studiati sono stati utili a definire la posizione tassonomica dell'accessione campionata a M.te Cammarata, consentendoci di attribuirla a *T. paronychioides*. Per tale località era nota la specie *T. pedicellatus* Lojac., successivamente inclusa all'interno della variabilità di *T. spinulosus* (Bartolucci & Domina, 2015). Questi risultati confermano che i metaboliti secondari, quali gli oli essenziali, costituiscono un valido strumento per la discriminazione di popolazioni spontanee di *taxa* caratterizzati da un'elevata variabilità morfologica e a distribuzione frammentaria (Maggio *et al.*, 2016).

Dalla caratterizzazione chimica e dai risultati ottenuti relativamente all'attività biologica degli oli nel controllo delle infestanti è emerso che alcune accessioni, per il peculiare profilo e l'elevata fitotossicità espressa (*T. longicaulis* subsp. *longicaulis* e *T. praecox* subsp. *parvulus*, *T. spinulosus*, *T. vulgaris* subsp. *vulgaris*), si configurano potenzialmente interessanti per la messa a punto di strategie eco-compatibili finalizzate al controllo della flora infestante e quindi, per applicazioni in ambito agronomico. Pertanto, è auspicabile valutare ulteriori genotipi spontanei e avviare una coltivazione in pieno campo per disporre di sufficiente materiale vegetale e dei corrispettivi oli per saggi su una più ampia gamma di infestanti. La

coltivazione in campo su larga scala, inoltre, eviterebbe la raccolta da piante allo stato spontaneo salvaguardando la stabilità delle popolazioni naturali.

BIBLIOGRAFIA

- ABDELMAJEED, N., DANIAL, E.N., AYAD, H.S. (2013) The effect of environmental stress on qualitative and quantitative essential oils of aromatic and medicinal plants. *Archives des Sciences*, 66(4), 100–120.
- ABRAHIM, D., BRAGUINI, W.L., KELMER-BRACHT, A.M., ISHII-IWAMOTO, E.L. (2000). Effects of four monoterpenes on germination, primary root growth and mitochondrial respiration of maize. *Journal of Chemical Ecology*, 26, 611–624.
- ADAMS, R.P. (2007). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th ed.; Allured Publishing: Carol Stream, IL, USA.
- ADZET, T., GRANGER, R., PASSET, J., SAN MARTIN, R. (1977). Le polymorphisme chimique dans le genre *Thymus*: sa Signification taxonomique. *Biochemical Systematics and Ecology*, 5, 269–272.
- AHUJA, N., BATISH, D.R, SINGH, H.P., KOHLI, R.K. (2014). Herbicidal activity of eugenol towards some grassy and broad-leaved weeds. *Journal of Pest Science*, 88, 209–218.
- AHUJA, N., SINGH, H., BATISH, D., KOHLI, R. (2015). Eugenol-inhibited root growth in *Avena fatua* involves ROS-mediated oxidative damage. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 118, 64–70.
- ALTIERI, M.A. (1999). The ecological role of biodiversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 74, 19–31.
- AMRI, I., HAMROUNI, L., HANANA, M., JAMOSSI, B. (2013). Review on phytotoxic effects of essential oil and their individual components: news approach for weeds management. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 4, 96–114.
- ANGELINI, L.G., CARPANESE, G., CIONI, P.L., MORELLI, I., MACCHIA, M., FLAMINI, G., (2003). Essential oils from Mediterranean Lamiaceaeas weed germination inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6158–6164.
- APAT (2004). Proposta di Guida tecnica su metodi di analisi per il suolo e i siti contaminati. Utilizzo di indicatori biologici ed ecotossicologici. Report RTI CTN_TES, 1/2004. Eds. Agenzia per la Protezione dell’Ambiente e per i Servizi Tecnici (APAT), Roma, 161.
- ARMINANTE, F., DE FALCO, E., DE FEO, V., DE MARTINO, L., MANCINI, E., QUARANTA, E. (2006). Allelopathic activity of essential oils from Mediterranean *Labiatae*. *Acta Horticulturae*, 723, 347–352.
- ASPLUND, R.O. (1968). Monoterpenes: relationship between structure and inhibition of germination. *Phytochemistry*, 7, 1995–1997.

- AYTAS, T. (2003). Morphological and anatomical studies on some species of *Thymus* L. (Labiatae) distributed in Karadeniz region. *Ot Sist Bot Derg.*, 10(1), 31–56.
- AZIRAK, S. & KARAMAN, S. (2008). Allelopathic effect of some essential oils and components on germination of weed species. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science*, 58, 88–92.
- AZIZ, E.E., HENDAWY, S.F., EZZ EL-DIN, A.A., OMER, E.A. (2008). Effect of soil type and irrigation intervals on plant growth, essential oil yield and constituents of *Thymus vulgaris* plant. *American-Euroasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 4, 443–450.
- AZIZ, S., HABIB-UR-REHMAN, IRSHAD, M., ASGHAR, S.F., HUSSAIN, H., ISHTIAQ, H. (2010). Phytotoxic and Antifungal Activities of Essential Oils of *Thymus serpyllum* Grown in the State of Jammu and Kashmir. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 13(2), 224–229.
- BADER, A., FLAMINI, G., CIONI, P.L, MORELLI, I. (2001). *Thymus richardii* Pers. subsp. *nitidus* (Guss.) Jalas: A New *Thymus* Type Rich in β -Bisabolene. *Journal of Essential Oil Research*, 13, 8–10.
- BAJALAN, I. & PIRBALOUTI, A.G. (2015). Variation in chemical composition of essential oil of populations of *Lavandula x intermedia* collected from Western Iran. *Industrial Crops and Products*, 69, 344–347.
- BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M. (2008). Biological effects of essential oils—A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446–475.
- BARBERO, F. & MAFFEI, M. (2016). Biodiversity and chemotaxonomic significance of specialized metabolites, In *Plant Specialized Metabolism: Genomics, Biochemistry, and Biological Functions*, Chapter 3. Arimura G. & Maffei M. E. (eds). by CRC Press.
- BARINAGA, M. (1990). Where have all the froggies gone? *Science*, 247, 1033-1034.
- BARTOLUCCI, F. (2010). Verso una revisione biosistemica del genere *Thymus* L. in Italia: Considerazioni nomenclaturali, sistematiche e criticità tassonomica. *Annali di Botanica (Roma) Suppl.* 2009, 135–148.
- BARTOLUCCI, F. & PERUZZI, L. (2013). *Thymus paronychioides* (Lamiaceae), a neglected species from Sicily belonging to section *Hyphodromi*. *Folia Geobotanica*, 49, 83–106.
- BARTOLUCCI, F. & DOMINA, G. (2014). Typification and taxonomic characterization of *Thymus longicaulis* C. Presl (Lamiaceae). *Annales Botanici Fennici*, 51(1-2), 54–62.
- BARTOLUCCI, F., PERUZZI, L., PASSALACQUA, N. (2014). Taxonomic notes and typification of names within the genus *Thymus* L. (Lamiaceae). *Taxon*, 62, 1308–1314.

- BARTOLUCCI, F. & DOMINA, G. (2015). The genus *Thymus* (Lamiaceae) in Sicily. *Plant Biosystems*, 149, 710–719.
- BARTOLUCCI, F. & WALTER, J. (2015). Typification of names in the genus *Thymus* L. (Lamiaceae). *Phytotaxa*, 221(2), 137–147.
- BARTOLUCCI, F. & MRÁZ, P. (2016). A new combination in the genus *Thymus* and clarification on the type material of *Th. thracicus* (Lamiaceae). *Phytotaxa*, 263(2), 161–164.
- BARTOLUCCI, F. & SCHARFETTER, A. (2015). *Thymus oenipontanus* Heinr. Braun ex Borbás (Lamiaceae). In: Raab-Straube, E von & Raús, Th. (eds.). *Euro+Med-Checklist Notulae*, 5. *Willdenowia*, 45, 455.
- BARTOLUCCI, F. (2018). *Thymus* L.–Timo. In: PIGNATTI, Flora d'Italia 2° ed., 3, 278–290. Edagricole.
- BARZIN, G., MAZOOJI, A., SALIMPOUR, F. (2014). Chemotaxonomy of four varieties of *Mentha longifolia* L. using essential oil composition markers. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*, 5(4), 172–176.
- BASER, K.H.C., ÖZEK, T., KÜRKÇÜOĞLU, M., TÜMEN, G. (1992). Composition of the Essential Oil of *Thymus longicaulis* C. Presl. var. *subisophyllus* (Borbás) Jalas from Turkey. *Journal Essential Oil Research*, 4, 311–312.
- BASER, K.H.C.; ÖZEK, T.; KIRIMER, N.; TÜMEN, G. (1993). The occurrence of three chemotypes of *Thymus longicaulis* C. Presl. subsp. *longicaulis* in the same population. *Journal Essential Oil Research*, 5, 291–295.
- BASER, K.H.C. & KOYUNCU, M. (1994). Composition of the essential oils of two varieties of *Thymus longicaulis* C. Presl. subsp. *chaubardii* (Boiss. et Heldr. ex Reichb. fil.) Jalas. *Journal Essential Oil Research*, 6, 207–209.
- BASER, K.H.C., KIRIMER, N., ERMIN, N., ÖZEK, T. (1996). Composition of essential oils from three varieties of *Thymus praecox* Opiz growing in Turkey. *Journal Essential Oil Research*, 8, 319–321.
- BATISH, D.R., SINGH, H.P., SETIA, N., KOHLI, R.K., YADAV, S.S. (2007). Alternative control of little seed canary grass using eucalypt oil. *Agronomy for Sustainable Development*, 27, 171–177.
- BATISH, D.R., SINGH, H.P., KAUR, M., KOHLI, R.K., SINGH, S. (2012). Chemical characterization and phytotoxicity of volatile essential oil from leaves of *Anisomeles indica* (Lamiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 41, 104–109.

- BEKER, R., DAFNI, A., EISIKOWITCH, D., RAVID, U. (1989). Volatiles of two chemotypes of *Majorana syriaca* L. (Labiatae) as olfactory cues for the honeybee. *Oecologia*, 79, 446–451.
- BELLOMARIA, B., HRUSKA, K., VALENTINI, G. (1981). Essential oils of *Thymus longicaulis* C. Presl from different localities of central Italy. *Giorn. Bot. Ital.* 115, 17–27. In Stahl-Biskup, E. (2002). Essential oil chemistry of the genus *Thymus* a global view, 75–124.
- BENTHAM, G. (1832-1836). *Labiatarum Genera et Species*. London.
- BENVENUTI, S., CIONI, P.L., FLAMINI, G., PARDOSSI, A. (2017). Weeds for weed control: Asteraceae essential oils as natural herbicides. *Weed Research*, 57, 342–353.
- BERGSTROM, G. (1978). Role of volatile chemicals in *Ophrys*–pollinator interactions, in *Biochemical Aspects of Plant and Animal Coevolution*, Harborne J.B. (ed.). New York: Academic Press, 8, 207–231.
- BEWLEY, D. & BLACK, M. (1985). Seeds. In *Physiology of Development and Germination*, 1st Edition. New York: Plenum Press, NY, USA.
- BHARGAVA, V.V., PATEL, S.C., DESAI, K.S. (2013). Importance of terpenoids and essential oils in chemotaxonomic approach. *International Journal of Herbal Medicine*, 1, 14–21.
- BINI MALECI, L., CIONI, P.L., FLAMINI, G., SPINELLI, G., SERVETTAZ, O. (1997). Comparative observation on *Thymus striatus* Vahl and *T. striatus* var. *ophiolicus* Laicata in central Italy. *Lagascalia*, 19(1-2), 857–864.
- BINI MALECI, L., GENTILI, L., PINETTI, A., BELLESIA, F., SERVETTAZ, O. (1999). Morphological and phytochemical characters of *Thymus striatus* Vahl growing in Italy. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology: Official Journal of the Societa Botanica Italiana*, 133(2), 137–144.
- BLANCO, J., VAZQUES PARDO, F.M., RUIZ TELLEZ, T. (2007). Revision de los generos *Thymbra* L. y *Thymus* L. (Lamiaceae) en Extremadura (Espana). *Folia Botanica Extremadurensis*, 1, 27–53.
- BLANCO, J., PÉREZ-ALONSO, M.J., RUIZ, T., VÁZQUEZ, F.M. (2010). Chemotaxonomic study on *Thymus xtoletanus* Ladero and its parental species. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 79(1), 125–128.
- BLANCO, J., RUIZ, T., VAZQUEZ, F.M., PÉREZ, J., CASES, M.A. (2012). The essential oil of the protected species: *Thymus praecox* ssp. *penyhalarensis*. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 81, 23–27.
- BLANQUER, A., BOIRA, H., SOLER, V., PEREZ, I. (1998). Variability of the essential oil of *Thymus piperella*. *Phytochemistry*, 47, 1271–1276.

- BOHM, B.A. & STUESSY, T.F. (2001). Biology and Distribution. In: Flavonoids of the Sunflower Family (Asteraceae). Springer, Vienna, 1, 3–17.
- BOIRA, H. & BLANQUER, A. (1998). Environmental factors affecting chemical variability of essential oils in *Thymus piperella* L. Biochemical Systematics and Ecology, 26, 811–822.
- BOISSIER, E. (1839-1845). Voyage botanique dans le Midi de l'Espagne. Paris.
- BOUAJAJ, S., ROMANE, A., BENYAMNA, A., AMRI, I., HANANA, M., HAMROUNI, L., ROMDHANE, M. (2014). Essential oil composition, phytotoxic and antifungal activities of *Ruta chalepensis* L. leaves from High Atlas Mountains (Morocco). Natural Product Research, 28, 1910–1914.
- BRAUN, H. (1888). *Thymus*. In: Formánek E.: Mährische *Thymus*-Formen. Österreichische botanische Zeitschrift, 38, 186–190.
- BRAUN, H. (1889). Systematische Uebersicht und Verbreitung der Gattung *Thymus* L. in Nieder-Oesterreich. Österreichische botanische Zeitschrift, 39, 187–188.
- BRAUN, H. (1891). Uebersicht der in Tirol bisher beobachteten Arten und Formen der Gattung *Thymus*. Österreichische botanische Zeitschrift, 41, 295–298.
- BRAUN, H. (1912). *Thymus*. In: Dalla Torre K. W.V. and Sarntheim L.V.: Die Farn und Blütempflanzen von Tirol, Voralberg und Lichtenstein, 6 (3), 201–209.
- BRIQUET, J. (1897). Labiatae. In: Engler and Prantl (eds.): Die natürlichen Pflanzefamilien, 4(3a), 311–313.
- BROTERO, F.A. (1804). Flora Lusitana. Olisipone.
- BRULLO, S., MINISALE, P., SPAMPINATO, G. (1995). Considerazioni fitogeografiche sulla flora della Sicilia. Ecologia Mediterranea XXI (1/2), 99–117.
- BRUNO, M., ROSSELLI, S., BONDI, M.L., GEDRIS, T.E., HERZ, W. (2002). Sesquiterpene lactones of *Anthemis alpestris*. Biochemical Systematics and Ecology, 30, 891–895.
- BRYANT, J.P., PROVENZA, F.D., PASTOR, J., REICHARD, P.B., CLAUSEN, T.P., DU TOIT, J.T. (1991). Interactions between woody plants and browsing mammals mediated by secondary metabolites. Annual Review of Ecology and Systematics, 22, 431–446.
- BUHAGIAR, J.A., CAMILLERI-PODESTA, M.T., CIONI, P., FLAMINI, G., PISTELLI, L. (2015). Essential oil composition of summer and winter foliage of *Chiliadenus bocconei*. Natural product communications. 10, 1323–1324.
- CAVALIERI, A. & CAPORALI, F. (2010). Effects of essential oils of cinnamon, lavender and peppermint on germination of Mediterranean weeds. Allelopathy Journal, 25(2), 1–11.
- ČELAKOVSKY, L. (1882). Diagnosen einiger neuen *Thymus*-Arten. Flora, 65, 563–565.

- ČELAKOVSKY, L., (1883). Über einige Arten resp. Rassen der Gattung *Thymus*. Flora, 66, 120–128, 145–160.
- CHEN, H., ZHANG, Y., ZHONG, Q. (2015). Physical and antimicrobial properties of spray-dried zein–casein nanocapsules with co-encapsulated eugenol and thymol. Journal of Food Engineering, 144, 93–102.
- CHENG, H.N., KLASSON, K. T., ASAKURA, T., WU, Q. (2016). Nanotechnology in Agriculture. In Nanotechnology: Delivering on the Promise Vol. 2; ACS Symposium Series; American Chemical Society, 1224, 233 – 242.
- CHON, S-UKIM, Y-M, LEE, J-C. (2003). Herbicidal potential and quantification of causative allelochemicals from several *Compositae* weeds. Weed Research, 43, 444–450.
- CHORIANOPOULOS, N., KALPOUTZAKIS, E., ALIGIANNIS, N., MITAKU, S., NYCHAS, G.J., HAROUTOUNIAN, S.A. (2004). Essential Oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* Species: Chemical Composition and Antibacterial Activities Against Foodborne Pathogens. Journal Agricultural and Food Chemistry, 52, 8261–8267.
- CHOU, C.H., CHANG, Y.C., KAO, C.I. (1978). Impact of water pollution of crop growth in Taiwan. II Phytotoxic natures of six rivers and twenty-seven industrial waste waters in Kaohsiung area, Taiwan. Botanical Bulletin-Academia Sinica, 19, 107–124.
- COLEMAN, J.O.D., BLAKE-KALFF, M.M.A., DAVIES, T.G.E. (1997). Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. Trends in Plant Science, 2, 144–151.
- CORTICCHIATO, M., TOMI, F., BERNARDINI, A.F.; CASANOVA, J. (1998). Composition and infraspecific variability of essential oil from *Thymus herba barona* Lois. Biochemical Systematics and Ecology, 26, 915–932.
- CRISTAUDO, A., GRESTA, F., CATARA, S., MINGO, A. (2014). Assessment of daily heat pulse regimes on the germination of six *Amaranthus* species. Weed Research, 54, 366–376.
- CRISTAUDO, A., GRESTA, F., RESTUCCIA, A., CATARA, S., ONOFRI, A. (2016). Germinative response of redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus* L.) to environmental conditions: Is there a seasonal pattern? Plant Biosystems, 150(3), 583–591.
- DA COSTA, S.B., DUARTE, C., BOURBON, A.I., PINHEIRO, A.C., SERRA, A.T., MOLDÃO MARTINS, M., NUNES JANUÁRIO, M.I., VICENTE, A.A., DELGADILLO, I., DUARTE C., DA COSTA, B.M.L. (2012). Effect of the matrix system in the delivery and in vitro bioactivity of microencapsulated oregano essential oil. Journal of Food Engineering, 110(2), 190–199.
- DARWIN, C.F. (1877). The different forms of flowers on plants of the same species. London: John Murray.

- DAVIDOV-PARDO, G., JOYE, I.J., MCCLEMENTS, D.J. (2015) Encapsulation of resveratrol in biopolymer particles produced using liquid antisolvent precipitation. Part 1: preparation and characterization Food Hydrocolloids, 45, 309–316.
- DAYAN, F., ROMAGNI, J., TELLEZ, M., ROMANO, A., DUKE, S. (1999). Managing weeds with natural products harnessing the power of natural products in weed management. Pesticide Outlook, 10, 185–188.
- DAYAN, F.E., CANTRELL, C.L, DUKE, S.O. (2009). Natural products in crop protection. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 17(12), 4022–4034.
- DAYAN, F.E. & Duke, S.O. (2010). Natural Products for weed management in organic farming in the USA. Outlooks on Pest Management, 21(4), 156–160.
- DE BOUCHBERG, S.M., ALLEGRI, J., BESSIERE, C., ATTISO, M., PASSET, J., GRANGER, R. (1976). Propriétés microbiologiques des huiles essentielles de chimiotypes de *Thymus vulgaris* Linnaeus. Rivista Italiana EPPOS, 58, 527–36.
- DE FEO, V., DE SIMONE, F., SENATORE, F. (2002). Potential allelochemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*. Phytochemistry, 61, 573–578.
- DE FEO, V., BRUNO, M., TAHIRI, B., NAPOLITANO F., SENATORE, F. (2003). Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils from *Thymus spinulosus* Ten. (Lamiaceae). Journal of Agricultural Food Chemistry, 51, 3849–3853.
- DE LA TORRE, A. & PAYA, J., (2001). Una nueva subespecie en el genero *Thymus* L. (A new subspecies in the genus *Thymus* L.). Anales de Biología, (Univ. Murcia), 23 (1998), 99–102.
- DE LISI, A., TEDONE. L., MONTESANO, V., SARLI, G., NEGRO, D. (2011). Chemical characterisation of *Thymus* populations belonging from Southern Italy. Food Chemistry, 125, 1284–1286.
- DE MARTINO, L., BRUNO, M., FORMISANO, C., DE FEO, V., NAPOLITANO, F., ROSSELLI, S., SENATORE, F. (2009). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils from Two Species of *Thymus* Growing Wild in Southern Italy. Molecules, 14, 4614–4624.
- DE MARTINO, L., MANCINI, E., ROLIM DE ALMEIDA, L.F., DE FEO, V. (2010a). The antigerminative activity of twenty-seven monoterpenes. Molecules, 15, 6630–6637.
- DE MARTINO L, ROSCIGNO G, MANCINI E, DE FALCO E, DE FEO V. (2010b) Chemical composition and antigerminative activity of the essential oils from five *Salvia* species. Molecules, 15, 735–746.
- DE OLIVEIRA, J.L., CAMPOS, E.V.R., PEREIRA, A.E.S., PASQUOTO, T., LIMA, R., GRILLO, R., DE ANDRADE, D.J., APARECIDO DOS SANTOS, F., FRACETO, L.F. (2018). Zein

- Nanoparticles as Eco-Friendly Carrier Systems for Botanical Repellents Aiming Sustainable Agriculture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66, 1330–1340.
- DEL TORO-SANCHEZ, C.L., AYALA-ZAVALA, J.F., MACHI, L., SANTACRUZ, H., VILLEGAS-OCHOA, M.A., ALVAREZ-PARRILLA, E., GONZALEZ-AGUILAR, G.A. (2010). Controlled release of antifungal volatiles of thyme essential oil from β -cyclodextrin capsules. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 67 (3–4), 431–441.
- DELAZAR, A., BAHMANI, M., HEKMAT-SHOAR, H., TABATABAEI-RAISI, A., ASNAASHARI, S., NAHAR, L., SARKER, S.D. (2011). Effect of altitude, temperature and soil on essential oil production in *Thymus fedtschenkoi* flowers in Osko and surrounding areas in Iran. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 14, 23–29.
- DELGADO, T., MARINERO, P., ASENSIO-S.-MANZANERA, M.C., ASENSIO, C., HERRERO, B., PEREIRA, J.A., RAMALHOSA, E. (2014). Antioxidant activity of twenty wild Spanish *Thymus mastichina* L. populations and its relation with their chemical composition. *Food Science and Technology*, 57, 412–418.
- DIZAJEYKAN, Y.I., HAGHIGHI, A.R., GAJOTI, T.E. (2016). Regional Altitude and Soil Physicochemical Factors Influence the Essential Oil of *Thymus pubescens* (Lamiales: *Lamiaceae*). *Journal of Biology Environmental Science*, 10(29), 45–51.
- DOB, T., DAHMANE, D., BENABDELKADER, T., CHELGHOU, C. (2006). Studies on the essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. *International Journal of Aromatherapy*, 16, 95–100.
- DONSÌ, F., SESSA, M., FERRARI, G. (2012). Effect of emulsifier type and disruption chamber geometry on the fabrication of food nanoemulsions by high pressure homogenization. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 51(22), 7606–7618.
- DONSÌ, F. & FERRARI, G. (2016). Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. *Journal of Biotechnology*, 233, 106–120.
- DONSÌ, F., VOUDOURIS, P., VEEN, S.J., VELIKOV, K.V. (2017). Zein-based colloidal particles for encapsulation and delivery of epigallo catechin gallate. *Food Hydrocolloids*, 63, 508–517.
- DUDAI, N., POLJAKOFF-MAYBER A., MAYER A. M., PUTIEVSKY E., LERNER H.R. (1999). Essential oils as allelochemicals and their potential use as bioherbicides. *Journal of Chemical Ecology*, 25, 1079–1089.
- DUDAI, N., BEN-AMI, M., CHAIMOVICH, R., CHAIMOVITSH, D. (2004). Essential oils as allelopathic agents: bioconversion of monoterpenes by germinating wheat seeds. *Acta Horticulturae*, 629, 505–508.

- DUKE, S.O. (1986). Naturally occurring chemical compounds as herbicides. *Rev. Weed Science*, 2, 15–44.
- DUKE, S.O., DAYAN, F.E., ROMANGNI, J.G., RIMANDO, A.M. (1999). Natural products as sources of herbicides: current status and future trends. *Weed Research*, 40, 99–111.
- DUKE, S.O., ROMANGNI, J.G., DAYAN, F.E. (2000). Natural products as sources for new mechanisms of herbicidal action. *Crop Protection*, 19, 583–589.
- ELAKOVICH, S.D. (1988). Terpenoids as models for new agrochemicals, en: Cutler, H.G. (ed.), *Biologically active natural products-potential use in agriculture*. American Chemical Society, Washington, D.C., 250–261.
- ELAMRANI, A., ZRIRA, S., BENJILAL, B., BERRADA, M. (2000). A study of Moroccan rosemary oils. *Journal Essential Oil Research*, 12, 487–495.
- EMERENCIANO, V.R., BARBOSA, K.O., SCOTTI, M.T., FERREIRA, M.J.R. (2007). Self organizing maps in chemotaxonomic studies of *Asteraceae*: A classification of tribes using flavonoid data. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18, 891–899.
- FARMACOPEA UFFICIALE DELLA REPUBBLICA ITALIANA XII ed. (2008). Editore: Istituto Poligrafico dello Stato.
- FATTA DEL BOSCO, S., NAPOLI, E., MERCAT, F., ABBATE, L., CARIMI, F., RUBERTO, G. (2017). Somatic cybridization for *Citrus*: polyphenols distribution in juices and peel essential oil composition of a diploid cybrid from Cleopatra mandarin (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.) and sour orange (*Citrus aurantium* L.). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 64, 261–275.
- FEDERICI, S., GALIMBERTI, A., BARTOLUCCI, F., BRUNI, I., DE MATTIA, F. CORTIS, P., LABRA, M. (2013). DNA barcoding to analyse taxonomically complex groups in plants: The case of *Thymus* (*Lamiaceae*). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 171, 687–699.
- FERNANDES, C.P., MASCARENHAS, M.P., ZIBETTI, F.M., LIMA, B.G., OLIVEIRA, R.P.R.F., ROCHA, L., FALCÃO, D.Q. (2013). HLB value, an important parameter for the development of essential oil phytopharmaceuticals. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23, 108–114.
- FIGUEIREDO, A.C., BARROSO, J.G., PEDRO, L.G., SCHEFFER, J.J.C. (2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 23, 213–226.
- FISCHER, N.H. (1986). The function of mono and sesquiterpenes as plant germination and growth regulators. In Putnam, A.R., Tang, C.S. (eds.), *The Science of Allelopathy*. Wiley, New York, 203–218.

- FISCHER, N. H. (1991). Plant terpenoids as allelopathic agents, 377–398. In Harborne J.B. and Tomas-Barberan F.A. (eds.). Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.
- FISCHER, N.H., WILLIAMSON, G.B., WEIDENHAMER, J.D., RICHARDSON, D.R. (1994). In search of allelopathy in the Florida scrub D the role of terpenoids. Journal of Chemical Ecology, 20, 1355–1380.
- FRACETO, L. F.; GRILLO, R.; MEDEIROS, D.; A, G.; SCOGNAMIGLIO, V.; REA, G.; BARTOLUCCI, C. (2016). Nanotechnology in Agriculture: Which Innovation Potential Does It Have? Frontiers in Environmental Science, 4(20), 1–5.
- FRIEDMAN, J. & WALLER, G.R. (1983). Seeds as allelopathic agents. Journal of Chemical Ecology, 9, 1107–1117.
- GALASSO, S., PACIFICO, S., KRETSCHMER, N., PAN, S.P., MARCIANO, S., PICCOLELLA, S., MONACO, P., BAUER, R. (2014). Influence of seasonal variation on *Thymus longicaulis* C. Presl chemical composition and its antioxidant and anti-inflammatory properties. Phytochemistry, 107, 80–90.
- GEIGERA, F., BENGTTSSON, J., FRANK BERENDSE, WEISSER, W.W., EMMERSON, M., MORALES, M.B., CERYNGIER, P., LIIRA, J., TSCHARNTKE, T., WINQVIST, C., EGGERS, S., BOMMARCO, R., PÄRT, T., BRETAGNOLLEJ, V., PLANTEGENEST, M., CLEMENT, L.W., DENNIS, C., PALMERD, C., ONATE, J.J., GUERRERO, I., HAWRO, V., AAVIK, T., THIES, C., FLOHRE, A., HÄNKE, S., FISCHER, C., GOEDHART, P.W., INCHAUSTI, P. (2010). Persistent negative effects of pesticides on biodiversity and biological control potential on European farmland. Basic and Applied Ecology, 11, 97–105.
- GHOSH, V., MUKHERJEE, A., CHANDRASEKARAN, N. (2013). Formulation and Characterization of Plant Essential Oil Based Nanoemulsion: Evaluation of its Larvicidal Activity Against *Aedes aegypti*. Asian Journal of Chemistry; Vol. 25, Supplementary Issue, 321–323.
- GOBBO-NETO, L., & LOPES, N.P. (2007) Plantas Medicinais: fatores de influência de metabólitos secundários. Química Nova, 30(2), 374–381.
- GOMES PINTO, C., VÁZQUES PARDO, F.M., PAIVA-FERREIRA, R., RAMOS, S., DONCEL, E. (2006). Biosystematic study of the subsection *Thymastra* (Nyman ex Velen.) R. Morales of the *Thymus* L. genus (Lamiaceae). Acta Botanica Gallica, 153(3), 355–364.
- GONZALES, C.N., SANCHEZ, F., QUINTERO, A., USUBILLAGA, A. (2001). Chemotaxonomic value of essential oil compounds in *Citrus* species. Acta Horticulturae, 576, 49–51.

- GOUYON, P.H., VERNET, PH., GUILLERM, J. L., VALDEYRON, G. (1986). Polymorphisms and environment: the adaptive value of the oil polymorphisms in *Thymus vulgaris* L. *Heredity*, 57, 59–66.
- GRABER, D.R., JONES, W.J., JOHNSON, J.A. (1995). Human and ecosystem health: the environment-agriculture connection in developing countries. *Journal of Agromedicine*, 2, 47–64.
- GRANGER, R., PASSET, J., TEULADE-ARBOUSSET, G. (1963). Diversite des essences de *Thymus vulgaris* L. *La France et ses Parfums*, 6, 225–230.
- GRANGER, R., PASSET, J. (1971). Types chimiques de l'espèce *Thymus vulgaris* L. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 27, 2350–2353.
- GRANGER, R. & PASSET, J. (1973). *Thymus vulgaris* spontane de France: races chimiques et chémotaxonomie. *Phytochemistry*, 12, 1683–1691.
- GRILLO, R., ABHILASH, P. C., FRACETO, L. F. (2016). Nanotechnology Applied to Bio-Encapsulation of Pesticides. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 16(1), 231–1234.
- GROSSO C., JOSÉ A.C., JOSÉ S.U., ANTÓNIO M.F.P., JOSÉ G.B. (2010). Herbicidal Activity of Volatiles from Coriander, Winter Savory, Cotton Lavender, and Thyme Isolated by Hydrodistillation and Supercritical Fluid Extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 11007–11013.
- GRUJIC-JOVANOVIC, S.; MARIN, P.D.; DZAMIC, A.; RISTIC, M. (2009). Essential oil composition of *Thymus longicaulis* from Serbia. *Chemistry of Natural Compounds*, 45, 265–266.
- GULSOY, S. (2012). Evaluation of essential oils and phenolic compounds of some *Origanum* (Labiatae/Lamiaceae) taxonomy. *Asian Journal of Chemistry*, 24, 2479–2483.
- HADACEK, F. (2002). Secondary Metabolites as Plant Traits: Current Assessment and Future Perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21(4), 273–322.
- HARBORNE, J.B. (1971). Distribution of flavonoids in the Leguminosae. In *Chemotaxonomy of the Leguminosae*, Harborne J.B., Boulter D., Turner B.L. (eds.). London: Academic Press, 31–71
- HARTMANN, T. (1996). Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 80, 177–188.
- HAZRATI, A., H., SAHARKHIZB, M.J., NIAKOUSARIC, M., MOEINB, M. (2017). Natural herbicide activity of *Satureja hortensis* L. essential oil nanoemulsion on the seed germination and morphophysiological features of two important weed species. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 142, 423–430.

- HEGNAUER, R. & HEGNAUER, M. (2001). Chemotaxonomie der Pflanzen. Basel: Birkhäuser.
- HENI, S., BENNADJA, S., DJAHOUDI, A. (2015). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Thymus ciliatus* growing wild in North Eastern Algeria. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 5(12), 056–060.
- HOET, S., STÉVIGNY, C., HÉRENT, M.F., QUETIN-LECLERCQ, J. (2006). Antitrypanosomal compounds from leaf essential oil of *Strychnos spinosa*. Planta Medica, 72, 480–482.
- HOFFMANNSEGG & LINK (1809). Flore Portugaise, 1, 123–138. Berlin.
- HÜGIN, G. & SCHMDT, P.A. (2003). *Thymus alpestris* im Schwarzwald und damit erstmals in Deutschland nachgewiesen. Floristische Rundbriefe, 36, 11–13.
- INDERJIT & DUKE S.O. (2003) Ecophysiological aspects of allelopathy. Planta, 217(4), 529–539.
- ISMAN, M.B., MIRESMALLI, S., MACHIAL, C. (2011). Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. Phytochemistry Reviews, 10, 197–204.
- JALAS, J. (1971a). Notes on *Thymus* L. (Labiatae). In: Europe. I. Supraspecific classification and nomenclature. Botanical Journal of the Linnean Society, 64, 199–215.
- JALAS, J. (1971b). Notes on *Thymus* L. (Labiatae). In Europe. II. Comments on species and subspecies. Botanical Journal of the Linnean Society, 64, 247–275.
- JALAS, J. (1972). *Thymus* L. In: Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb, D.A. (eds.). Flora Europaea, 3. Cambridge University Press, Cambridge, 172–182.
- JALAS, J.(1982a). *Thymus* L. In: Rechinger, K.H. (ed.), Flora Iranica. Graz: Akademische Druck-und Verlagsanstalt, 532–551.
- JALAS, J. (1982b). *Thymus* L. In: Davis P.H. (ed.) Flora of Turkey and East Aegean Islands, 7, 349–382. Edinburgh University Press, Edinburgh.
- JENSEN, C.G. & EHLERS, B.K. (2010). Genetic variation for sensitivity to a thyme monoterpene in associated plant species. Oecologia, 162, 1017–1025.
- JUHLER, R.K., SØRENSEN, S.R., LARSEN, L. (2001). Analysing transformation products of herbicide residues in environmental samples. Water Research, 35, 1371–1378.
- JUHLER, R.K., HENRIKSEN, T.H., ERNSTSEN, V., VINTHER, F.P., ROSENBERG, P. (2008). Impact of basic soil parameters on pesticide disappearance investigated by multivariate partial least square regression and statistics. Journal of Environmental Quality, 37, 1719–1732.

- KAH, M.; BEULKE, S.; TIEDE, K.; HOFMANN, T. (2013). Nanopesticides: State of Knowledge, Environmental Fate, and Exposure Modeling. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 43(16), 1823–1867.
- KAMENÍKOVÁ, M., FIALOVÁ, S., ŤAŽKÝ, A., ČIČOVÁ, I. (2015). Polyphenolic compounds and essential oil analysis of selected species of the genus *Thymus*. *Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae* LXII, 12–17.
- KAYA, A., SATIL, F., BASER, K.H.C., TUMEN, G. (2000). *Thymus aznavourii* Velen. (Labiatae) uzerinde morfolojik ve anatomik calismaler. *Ot Sistematiik Botanik Dergisi*, 7(1), 95–105.
- KHADIR, A., SOBEH, M., GAD, H.A., BENBELAID, F., BENDAHO, M., PEIXOTO, H., SPORER, F., ASHOUR, M.L., WINK, M. (2016). Chemical composition and biological activity of the essential oil from *Thymus lanceolatus*. *Zeitschrift für Naturforschung, C.*, 71(5-6), 155–63.
- KOHLI, R.K., BATISH, D.R., SINGH, H.P. (1998). Eucalypt oil for the control of *Parthenium* (*Parthenium hysterophorus* L.). *Crop Protection*, 17, 119–122.
- KOITABASHI, R., SUZUKI, T., KAWAZU, T., SAKAI, A., KUROIWA, H., KUROIWA, T. (1997). 1,8-cineole inhibits root growth and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* L. *Journal of Plant Research*, 110, 1–6.
- KOLPIN, D.W., THURMAN, E.M., LINHART, S.M. (1998). The environmental occurrence of herbicides: the importance of degradates in ground water. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 35, 385–390.
- KORDALI, S., ÇAKIR, A., SUNAY SUTAYA, S. (2007). Inhibitory Effects of Monoterpenes on Seed Germination and Seedling Growth. *Zeitschrift für Naturforschung, C.*, 62c, 207–214.
- KORDALI, S., ÇAKIR, A., ÖZER, H., ÇAKMAKCI, R., KESDEK, M. AND METE, E. (2008). Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. *Bioresource Technology*, 99, 8788–8795.
- KORDALI, S., USANMAZ, A., ÇAKIR, A., KOMAKI, A., ERCISLI, S. (2016). Antifungal and Herbicidal Effects of Fruit Essential Oils of Four *Myrtus communis* Genotypes. *Chemistry & Biodiversity*, 13, 77–84.
- KUŠTRAK, D., MARTINIS, Z., KUFTINEC, J. AND BLAZEVIĆ, N. (1990). Composition of the essential oils of some *Thymus* and *Thymbra* species. *Flavour and Fragrance Journal*, 5(4), 227–231. In Stahl-Biskup, E. (2002). Essential oil chemistry of the genus *Thymus* a global view, 75–124.

- LAMBERT, R.J.W, SKANDAMIS, P.N., COOTE, P.J., NYCHAS, G.J.E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 453–462.
- LINHART, Y.B., GAUTHIER, P., KEEFOVER-RING, K., THOMPSON, J.D. (2015). Variable Phytotoxic Effects of *Thymus vulgaris* (Lamiaceae) Terpenes on Associated Species. *International Journal of Plant Sciences*, 176(1), 20–30.
- LINNAEUS, C. (1753). *Species Plantarum* 2. Salvius, Stockholm, 673 pp.
- LLORENS, L., LLORENS-MOLINA, J.A., AGNELLO, S., BOIRA, H. (2014). Geographical and environment-related variations of essential oils in isolated populations of *Thymus richardii* Pers. in the Mediterranean basin. *Biochemical Systematics and Ecology*, 56, 246–254.
- LLORENS-MOLINA, J.A. & VACAS, S. (2017). Effect of drought stress on essential oil composition of *Thymus vulgaris* L. (Chemotype 1, 8-cineole) from wild populations of Eastern Iberian Peninsula. *Journal of Essential Oil Research*, 29(2), 145–155.
- LOPEZ, P., SANCHEZ, C., BATLLE, R., NERIN, C. (2007). Vapor-phase activities of Cinnamon, Thyme, and Oregano essential oils and key constituents against foodborne microorganisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4348–4356.
- LORBER, P. & MULLER, W.H. (1980). Volatile growth inhibitors produced by *Salvia leucophylla*: effects on cytological activity in mitochondrial suspensions. *Journal of Comparative Physiology*, 5, 68–75.
- LOŽIENE, K. & VENSKUTONIS, P.R. (2005). Influence of environmental and genetic factors on the stability of essential oil composition of *Thymus pulegioides*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 33, 517–525.
- MACCIONI, S., FLAMINI, G., CIONI, P.L. AND TOMEI, P.E. (1992). Phytochemical typology in some *Thymus* populations of *Thymus vulgaris* growing on Caprione's promontory (East Liguria). *Rivista Italiana EPPOS*, 7, 13–18.
- MAFFEI, M. (1988). Environmental Factors Affecting the Oil Composition of Some *Mentha* Species Grown in North West Italy. *Flavour and Fragrance Journal*, 3, 79–84.
- MAFFEI, M., CHIALVA, F., CODIGNOLA, A. (1989). Essential oils and chromosome numbers from Italian *Achillea* species. *Journal Essential Oil Research*, 2, 57–64.
- MAFFEI, M. (1990). Plasticity and genotypic variation in some *Mentha x verticillata* hybrids. *Biochemical Systematics and Ecology*, 18, 493–502.
- MAFFEI, M., MUCCIARELLI, M., SCANNERINI, S. (1993). Environmental factors affecting the lipid metabolism in *Rosmarinus officinalis* L. *Biochemical Systematics and Ecology*, 21(8), 765–794.

- MAGGIO, A., RICCOBONO, L., SPADARO, V., SCIALABBAA, A., BRUNO, M., SENATORE, F. (2014). Chemical Composition of the Essential Oils of Three Endemic Species of *Anthemis* Sect. *Hiorthia* (DC.) R. Fern. Growing Wild in Sicily and Chemotaxonomic Volatile Markers of the Genus *Anthemis* L.: An Update. *Chemistry & Biodiversity*, 11, 652–672.
- MAGGIO, A., BRUNO, M., GUARINO, R., SENATORE, F., ILARDI, V. (2016). Contribution to a Taxonomic Revision of the Sicilian *Helichrysum* Taxa by PCA Analysis of Their Essential-Oil Compositions. *Chemistry & Biodiversity*, 13, 151–159.
- MANCINI, E., DE MARTINO L., MARANDINO, A., SCOGNAMIGLIO, M.R., DE FEO, V. (2011). Chemical Composition and Possible *in vitro* Phytotoxic Activity of *Helichrysum italicum* (Roth) Don ssp. *Italicum*. *Molecules*, 16, 7725–7735.
- MAO, L., HENDERSON, G., LAINE, R.A. (2004). Germination of various weed species in response to vetiver oil and nootkatone. *Weed Technology*, 18, 236–267.
- MARHOLD, K. & MANTORFI, P. (1998). Typification of the name *Thymus serpyllum* L. (Lamiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 128, 271–276.
- MARRS, R.H., FROST, A.J. (1997). A microcosm approach to the detection of the effects of herbicide spray drift in plant communities. *Journal of Environmental Management*, 50, 369–388.
- MARTÓNFI, P., GREJTOVSKÝ, A., REPCÁK, M. (1994). Chemotype Pattern Differentiation of *Thymus pulegioides* on Different Substrates. *Biochemical Systematics and Ecology*, 22(8), 819–825.
- MARTONFI, P. (1997a). Nomenclatural survey of the genus *Thymus* sect. *Serpyllum* from Carpathians and Pannonia. *Thaiszia*, 7, 111–181.
- MARTONFI, P. (1997b). Pollen morphology of *Thymus* sect. *Serpyllum* (Labiatae: Mentheae) in the Carpathians and Pannonia. *Grana*, 36(5), 261–270.
- MCCLEMENTS, D.J. & RAO, J. (2011). Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 285–330.
- MERLE, H., MORÓN, M., BLAZQUEZ, M.A., BOIRA, H. (2004). Taxonomical contribution of essential oils in mandarins cultivars. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32, 491–497.
- MIGUEL, G., SIMÕES, M., FIGUEIREDO, A.C., BARROSO, J.G., PEDRO, L.G., CARVALHO, L. (2004). Composition and antioxidant activities of the essential oils of *Thymus caespititius*, *Thymus camphoratus* and *Thymus mastichina*. *Food Chemistry*, 86, 183–188.

- MOLISCH, H. (1937). Der Einfluss einer Pflanze auf die Andere—Allelopathie. Verlag G. Fischer, Jena.
- MORAIS, L.A.S. (2009) Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. *Horticultura Brasileira*, 27(2), S4050–S4063.
- MORALES, R. (1986a). Taxonomia de los generos *Thymus* (escluida la seccion *Serpyllum*) y *Thymbra* en la peninsula iberica. *Ruizia*, 3, 324 p.
- MORALES, R. (1986b). Notas citotaxonomicas sobre algunos tomillos ibericos y norteafricanos (*Thymus* L., Labiatae). *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 43(1), 35–41.
- MORALES, R. (1989). El genero *Thymus* L. en la region Mediterranea occidental (Lamiaceae). *Biocosme Méditerranéen*, 6, 205–211.
- MORALES, R. (1995). Híbridos de *Thymus* L. (Labiatae) en la Península Ibérica. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 53(2), 199–211.
- MORALES, R. (1997). Synopsis of the genus *Thymus* L. in the Mediterranean area. *Lagascalia*, 19(1–2), 249–262.
- MORALES, R. (2002). The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. In Stahl–Biskup E. and Sáez F. (eds.), *Thyme: The genus Thymus*. London: CRC Press Taylor & Francis Group, 1–43.
- MOTA, K.S.D., PEREIRA, F.D., DE OLIVEIRA, W.A., LIMA, I.O., LIMA, E.D. (2012). Antifungal activity of *Thymus vulgaris* L. essential oil and its constituent phytochemicals against *Rhizopus oryzae*: interaction with ergosterol. *Molecules*, 17, 14418–14433.
- MULLER, C.H., MULLER, W.H., HAINES, B.L. (1964). Volatile Growth Inhibitors Produced by Aromatic Shrubs. *Science*, 143, 471.
- MUSELLI, A., DESJOBERT, J.M., BERNARDINI, A.F., COSTA., J. (2007). Santolina alcohol as component of the essential oil of *Achillea ageratum* L. from Corsica island. *Journal Essential Oil Research*, 19, 319–322.
- NISHIDA, N., TOMOTSU, S., NAGATA, N., SAITO, C., SAKAI, A. (2005). Allelopathic effects of volatile monoterpenoids produced by *Salvia leucophylla*: inhibition of cell proliferation and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* seedlings. *Journal of Chemical Ecology*, 31(5), 1187–1203.
- ORELLANA, M.R., ROVIRA, A.M., BLANCHÉ, C., BOSCH, M. (2005). Pollination and reproductive success in the gynodioecious endemic *Thymus loscosii* (Lamiaceae). *Canadian Journal of Botany*, 83(2), 183–193.
- PALIWAL, R. & PALAKURTHI, S. (2014). Zein in controlled drug delivery and tissue engineering. *Journal of Controlled Release*, 189, 108–122.

- PALUMBI, S.R. (2001). Humans as the world's greatest evolutionary force. *Science*, 293, 1786–1790.
- PARK, B.S., CHOI, W.S., KIM, J.H., LEE, S.E. (2005). Monoterpenes from thyme (*Thymus vulgaris*) as potential mosquito repellents. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 21, 80–83.
- PARRIS, N., COOKE, P.H., HICKS, K.B. (2005). Encapsulation of Essential Oils in Zein Nanospherical Particles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4788–4792.
- PASCUAL-VILLALOBOS, M.J., CANTÓ-TEJEROA, M., VALLEJO, R., GUIRAO, P., RODRÍGUEZ-ROJOC, S., COCERO, M.J. (2017). Use of nanoemulsions of plant essential oils as aphid repellents. *Industrial Crops & Products*, 110, 45–57.
- PASSET, J. (1971). *Thymus vulgaris* L.: Chémotaxonomie et biogénèse monoterpénique. Thèse d'État, Faculte de Pharmacie, Université de Montpellier, Montpellier, France.
- PATEL, A.R., BOUWENS, E.C.M., VELIKOV, K.P. (2010). Sodium caseinate stabilized zein colloidal particles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(23), 12497–12503.
- PAVIA, J. & SALGUEIRO, L. (1994). Novedades corológicas, taxonómicas y nomenclaturales de tomillos portugueses (*Thymus* L., Labiatae). *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 52(1), 114–117.
- PAWLOWSKI, B. (1966). Observationes ad Thymos polonicos et nonnullos ucrainicos pertinentes. *Fragmenta Floristica et Geobotanica*, 12, 387–412.
- PAWLOWSKI, B. (1967). Distributio geographica nonnullorum taxorum generis *Thymus* L. in Polonia et Ucraina. *Fragmenta Floristica et Geobotanica*, 13, 15–50.
- PAWLOWSKI, B. (1968). Die von Boleslaus Kotula von 1894 bis 1898 in Tirol gesammelten *Thymus*-Sippen. *Phyton (Horn)*, 13, 63–77.
- PEREZ, I., BLAZQUEZ, M.A., BOIRA, H. (2000). Chemotaxonomic value of the essential oil compounds in species of *Teucrium pumilum* aggregate. *Phytochemistry*, 55, 397–401.
- PETROVIĆ V.N., PETROVIĆ S.S., JOVIČIĆ, D., FRANCIŠKOVIĆ M. (2015). Essential oil and extract from *Thymus praecox* ssp. *polytrichus* as natural antioxidants. *Archives for Technical Sciences*, 13(1), 51–57.
- PICCAGLIA, R. & MAROTTI, M. (1991). Composition of the essential oil of an Italian *Thymus vulgaris* L. ecotype. *Flavour and Fragrance Journal*, 6, 241–244.
- PICCAGLIA, R. & MAROTTI, M. (1993). Characterization of several aromatic plants grown in northern Italy. *Flavour and Fragrance Journal*, 8, 115–122.
- PIGNATTI, S. (1982). *Thymus* L. *Flora d'Italia*, 2, 488–493. Edagricole.

- PIRBALOUTI, A.G., HASHEMIB, M., GHAFAROKHIC, F.T. (2013). Essential oil and chemical compositions of wild and cultivated *Thymus daenensis* Celak and *Thymus vulgaris* L. *Industrial Crops and Products*, 48, 43–48.
- PITAROKILI, D., CONSTANTINIDIS, T., SAITANIS, C., TZAKOU, O. (2014). Volatile compounds in *Thymus* sect. *Teucrioides* (Lamiaceae): Intraspecific and interspecific diversity, chemotaxonomic significance and exploitation potential. *Chemistry & Biodiversity*, 11, 593–618.
- PLUHAR, Z., HETHELYI, E., KUTTA, G., KAMONDY, L. (2007). Evaluation of Environmental factors influencing essential oil quality of *Thymus pannonicus* All., and *Thymus praecox* Opiz. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 13, 23–43.
- PRASAD, R., BHATTACHARYYA, A., NGUYEN, Q.D. (2017). Nanotechnology in sustainable agriculture: recent developments, challenges, and perspectives. *Frontiers in microbiology*, 8, 1014.
- PRATHER, T.S., DITOMASO, J.M., HOLT, J.S. (2000). History, Mechanisms, and Strategies for Prevention and Management of Herbicide Resistant Weeds. *Proceedings of the California Weed Science Society*, 52, 1–14.
- PUTNAM, A.R. & DUKE W.O. (1978). Allelopathy in agroecosystems. *Annual Review of Phytopathology*, 16, 431–451.
- PUTNAM, A.R. & TANG, C.S. (1986). The Science of Allelopathy. In Putnam, A.R. & Tang, C.S. (eds.). New York, Wiley, pp. 317.
- PUTNAM, A.R. (1988). Allelopathy: problems and opportunities in weed management. In: Altieri, M.A. & Liebman, M. (eds.), *Weed management in agroecosystems: ecological approaches*. CRC Press, Boca Ratón, Florida, 77–88.
- RADULOVIC, N., DEKIC, M., JOKSOVIC, M., VUKICEVIC., R. (2012). Chemotaxonomy of Serbian *Teucrium* species inferred from essential oil chemical composition: The case of *Teucrium scordium* L. ssp. *scordioides*. *Chemistry & Biodiversity*, 9, 106–122.
- RAHIMI, A.R., MOUSAVIZADEH, S.J., MOHAMMADI, H., ROKHZADI, A., MAJIDI, M., AMINI, S. (2013). Allelopathic effect of some essential oils on seed germination of *Lathyrus annuus* and *Vicia villosa*. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*, 3, 67–73.
- SUSANDARINI, R., RUGAYAH, NUGROHO, L.H., SUBANDIYAH, S. (2016). Chemotaxonomy of Indonesian *Citrus maxima* based on Leaf Essential Oils. *Journal of Biological Sciences*, 16(1), 26–33.

- REDDY, V.P. RAVI V.K., VARSHA PV., SATYAM S. (2014). Review on *Thymus vulgaris* Traditional Uses and Pharmacological Properties. Medicinal & Aromatic Plants, 3, 164.
- REN, R., WANG, Y., ZHANG, R., GAO, S., ZHANG, H., YU, A. (2010). Solvent (ionic liquid) impregnated resin-based extraction coupled with dynamic ultrasonic desorption for separation and concentration of four herbicides in environmental water. Talanta, 83, 1392–1400.
- RICE, E.L. (1984). Allelopathy, second ed. Academic Press, Orlando, Florida.
- RIERA, J, GÜMES J. & ELENA ROSELLÓ, J.A. (2007). *Thymus richardii* (Lamiaceae) in the Iberian Peninsula. Flora Montiberica, 37, 77–80.
- ROLIM DE ALMEIDA, L.F., FREI, F., MANCINI, E., DE MARTINO, L., DE FEO, V. (2010). Phytotoxic activities of Mediterranean essential oils. Molecules, 15, 4309–4323.
- ROLLI, E., MARIESCHI, M., MAIETTI, S., SACCHETTI, G., BRUNI, R. (2014). Comparative phytotoxicity of 25 essential oils on pre- and post-emergence development of *Solanum lycopersicum* L.: A multivariate approach. Industrial Crops and Products, 60, 280–290.
- ROMAGNI, J.G.; ALLEN, S.N.; DAYAN, F.E. (2000). Allelopathic effects of volatile cineoles on two weedy plant species. Journal of Chemical Ecology, 26, 303–313.
- RONNINGER, K. (1924). Beiträge zur Kenntnis der *Thymus*-Flora der Balkan-halbinsel. Feddes Repertorium, 20, 334–336, 385–390.
- RONNINGER, K. (1925). Über einige kritische *Thymus*-Formen. Allg. Bot. Z., 26/27, 14–19.
- RONNINGER, K. (1927). Über die Systematik und Nomenclatur einiger ungarischer *Thymus*-Arten. Ann. Soc. Cult. Comit. Castrif. Civit. Sabariae Mus. Comit. Castrif., 2, 238–243.
- RONNINGER, K. (1930). *Thymus* L. In: Hayek A., Prodrum Florae Peninsulae Balcanicae, 2. Feddes Repertorium, Beih., 30(2), 337–382.
- RONNINGER, K. (1932). Bestimmungs-Schüssel für die *Thymus*-Arten der Flora von Württemberg. Feddes Repertorium, 31(3), 124–135.
- RONNINGER, K. (1942). Beiträge zur Kenntnis der Gattung *Thymus*. Feddes Repertorium, 20, 32–332.
- RONNINGER, K. (1944). Bestimmungstabelle für die *Thymus*-Arten des Deutschen Reiches. Deutsche Heilpflanze, Stollberg i. E., 18, 1–24.
- ROSS, J.D. & SOMBRERO, C. (1991) Environmental control of essential oil production in Mediterranean plants. In Harborne J.B. and Barberin F.A.T. (eds), Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids. Clarendon Press, Oxford, 83–94.

- SÁEZ, F. (1999). Essential oil variability of *Thymus baeticus* growing wild in south-eastern Spain. *Biochemical Systematics and Ecology*, 27, 269–276.
- SALGUEIRO, L.R., PROENÇA DA CUNHA, A., PAIVA, J. (1993). Chemotaxonomic characterization of a *Thymus* hybrid from Portugal. *Flavour Fragrance Journal*, 8, 325–330.
- SALGUEIRO, L.R., VILA, R., TOMAS, X., TOMI, F., CANIGUER, S., CASANOVA, J., PROENÇA DA CUNHA, A., ADZET, T. (1995). Chemical Polymorphism of the essential oil of *Thymus carnosus* from Portugal. *Phytochemistry*, 38, 391–396.
- SALGUEIRO, L., VILA, R., TOMI, F., TOMAS, X., CAÑIGUER, S., CASANOVA, J., PROENÇA DA CUNHA, A., ADZET, T. (1997a). Composition and infraspecific variability of essential oil from *Thymus camphoratus*. *Phytochemistry*, 45(1), 177–1183.
- SALGUEIRO, L.R., PROENÇA DA CUNHA, A., TOMAS, X., CANIGUER, S., ADZET, T., VILA, R. (1997b). The essential oil of *Thymus villosus* L. ssp. *villosus* and its chemical polymorphism. *Flavour Fragrance Journal*, 12, 117–122.
- SALGUEIRO, L.R., VILA, R., TOMAS, X., CAÑIGUER, S., PAIVA, J., PROENÇA, A., DA CUNHA, ADZET, T. (2000). Chemotaxonomic study on *Thymus villosus* from Portugal. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28, 471–482.
- SANTANA-RIOS, G., ORNER, G.A., AMANTANA, A., PROVOST, C., WU, S.Y., DASHWOOD, R.H. (2001). Potent antimutagenic activity of white tea in comparison with green tea in the Salmonella assay. *Mutation Research*. 495, 61–74.
- SATIL F., KAYA A., BİÇAKCI A., ÖZATLI S., TUMEN G. (2005). Comparative morphological anatomical and palynological studies on *Thymus migricus* Klokov & Des.-Shost and *T. fedtschenkoi* Ronniger var. *handelii* (Ronniger) Jalas grown in east Anatolia. *Pakistan Journal of Botany*, 37(3), 531–549.
- SAWAMURA, M., SONG, H.S., CHOI, H.S., SAGAWA, K., UKEDA, H. (2001). Characteristic aroma components of Tosa-buntan (*Citrus grandis* Osbeck forma *Tosa*) fruit. *Food Science and Technology Research*, 7, 45–49.
- SCARFATO, P., AVALLONE, E., LANNELLI, P., DE FEO, V., ACIERNO, D. (2007). Synthesis and characterization of polyurea microcapsules containing essential oils with anti-germinative activity. *Journal of Applied Polymer Science*, 105, 3568–3577.
- SCHRATZ, E. & HORSTER, H. (1970). Zusammensetzung des ätherischen Öls von *Thymus vulgaris* und *Thymus marschallianus* in Abhängigkeit von Blattalter und Jahreszeit. *Planta Medica*, 19, 160–176.
- SCHUMMER, J. (2004). Multidisciplinary, Interdisciplinarity and Patterns of research collaboration in nanoscience and nanotechnology. *Scientometrics*, 59, 425–465.

- SCRIVANTI, R.L., ZUNINO, M.P., ZYGADLO, J.A. (2003). *Tagetes minuta* and *Schinus areira* essential oils as allelopathic agents. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31, 563–572.
- SEELIGMABB, P. (1994). Flavonoids of the *Compositae* as evolutionary parameters in the tribes which synthesize them: a critical approach. In Hind D.J.N. & Beentje H.J. (eds.). *Compositae: Systematics. Proceedings of the International Compositae Conference*, Kew: Royal Botanic Gardens, 1, 159–167.
- ŠEGVIC, K., M., KOSALEC, I., MASTELIC, J., PIECKOVA, E., PEPELJNAK, S. (2007). Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. *Letters in Applied Microbiology*, 44, 36–42.
- SETIA, N., BATISH, D.R., SINGH, H.P., KOHLI, R.K. (2007). Phytotoxicity of volatile oil from *Eucalyptus citriodora* against some weedy species. *Journal of Environmental Biology*, 28(1), 63–66.
- SEUFERT, G., KOTZIAS, D., SPARTÀ, C., VERSINO, B. (1995). Volatile organics in Mediterranean shrubs and their potential role in a changing environment. In Moreno J.M. and Oechel, W.C. (eds.). *Global Change and Mediterranean Type Ecosystems*. Springer, New York, 343–370.
- SHARAFZADEH, S., ALIZADEH, O., VAKILI, M. (2011). Effect of nitrogen sources and levels on essential oil components of *Thymus vulgaris* L. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5, 885–889.
- SHARAFZADEH, S. & ZARE, M. (2011). Effect of Drought Stress on Qualitative and Quantitative Characteristics of Some Medicinal Plants from Lamiaceae Family: A Review. *Advances in Environmental Biology*, 5(8), 2058–2062.
- SILVA, C., HYACIENTH, D., FERREIRA, A., VILHENA, J., FLORENTINO, A., CRUZ, R., BEREAU, D., ROBINSON, J., CARVALHO, J., FERNANDES, C. (2015). Development of nanoemulsions with tucumã (*Astrocaryum vulgare*) fruits oil. *Nanomedicine Research Journal*, 2, 10–13.
- SINGH, H.P., BATISH, D.R., KOHLI, R.K., (1999). Autotoxicity: Concept, Organisms, and Ecological Significance. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18, 257–272.
- SINGH, H.P., BATISH, D.R., KAUR, S., RAMEZANI, H., KOHLI, R.K. (2002). Allelopathic effects of two volatile monoterpenes against bill-goat weed (*Ageratum conyzoides* L.). *Crop Protection*, 21, 347–350.
- SINGH, H.P., BATISH, D.R., KOHLI, R.K. (2003). Allelopathic Interactions and Allelochemicals: New Possibilities for Sustainable Weed Management. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22(3&4), 239–311.

- SINGH, H.P., BATISH, D.R., SETIA, N., KOHLI, R.K., (2005). Herbicidal activity of volatile oils from *Eucalyptus citriodora* against *Parthenium hysterophorus*. *Annals of Applied Biology*, 146, 89–94.
- SINGH H.P., BATISH, D.R., KAUR S., KOHLI, R.K., ARORA, K. (2006). Phytotoxicity of the volatile monoterpene citronellal against some weeds. *Zeitschrift für Naturforschung, C.*, 61, 334–340.
- SINGH, R. (2016). Chemotaxonomy: A Tool for Plant Classification. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 4(2), 90–93.
- SKAL TSA, H., GEORGAKOPOULOS, P., LAZARI, D., KARIOTI, A., HEILMANN, J., STICHER, O., CONSTANTINIDIS, T. (2007). Flavonoids as chemotaxonomic markers in the polymorphic *Stachys swainsonii* (Lamiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 35, 317–320.
- SKOULA, M., GOTSIOU, P., NAXAKIS, G., JOHNSON, C.B. (1999). A chemosystematic investigation on the mono and sesquiterpenoids in the genus *Origanum* (Labiatae). *Phytochemistry*, 52, 649–657.
- SLAVKOVSKA, V., COULADIS, M., BOJOVIC, S., TZAKOU, O., PAVLOVIC, M., LAKUSIC, B., JANCIC, R. (2005). Essential oil and its systematic significance in species of *Micromeria* Benth from Serbia & Montenegro. *Plant Systematics and Evolution*, 255, 1–15
- SMITH, P.M. (1976). *The Chemotaxonomy of plants* London, Edward Arnold.
- SOKOVIĆ, M.D., VUKOJEVIĆ, J., MARIN, P.D., BRKIĆ, D.D., VAJS, V., VAN GRIENSVEN, L.J. L. D. (2009). Chemical Composition of Essential Oils of *Thymus* and *Mentha* Species and Their Antifungal Activities. *Molecules*, 14, 238–249.
- SOULE, J., CARRE, D., JACKSON, W., CARROLL, C., VANDERMEER, J., ROSSET, P. (1990). Ecological impact of modern agriculture. *Agroecology*, 165–188.
- STAHL, E. (1984). Chemical polymorphism of essential oil in *Thymus praecox* ssp. *arcticus* (Lamiaceae) from Greenland. *Nordic Journal of Botany*, 4, 597–600.
- STAHL-BISKUP, E. (2002). Essential oil chemistry of the genus *Thymus* a global view. In Stahl-Biskup E. & Sáez F. (eds.), *Thyme: The genus Thymus*. London: CRC Press Taylor & Francis Group, 75–124.
- STANEVA, J.D., TODOROVA, M.N., EVSTATIEVA, L.N. (2008). Sesquiterpene lactones as chemotaxonomic markers in genus *Anthemis*. *Phytochemistry*, 69, 607–618.
- STEBBING, A.R.D. (1982). Hormesis-the stimulation of growth by low levels. *Science of The Total Environment*, 22(3), 213–234.

- STOATE, C., BALDI, A., BEJA, P., BOATMAN, N.D., HERZON, I., VAN DOORN, A., DE SNOO, G.R., RAKOSY, L., RAMWELL, C. (2009). Ecological impacts of early 21st century agricultural change in Europe. A review. *Journal of Environmental Management*, 91, 22–46.
- SUN, H., ZHANG, T., FAN, Q., QI, X., ZHANG, F., FANG, W., JIANG, J., CHEN, F., CHEN, S. (2015). Identification of floral scent in *Chrysanthemum* cultivars and wild relatives by gas chromatography-mass spectrometry. *Phytochemistry*, 20, 5346–5359.
- SYNOWIEC, A. & DROZDEK, E. (2016). Physicochemical and herbicidal properties of emulsions of essential oils against *Avena fatua* L. and *Chenopodium album* L. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 123(2), 65–74.
- SYNOWIEC, A., SMĘDA, A., ADAMIEC, J., KALEMBA, D. (2016). The effect of microencapsulated essential oils on the initial growth of maize (*Zea mays*) and common weeds (*Echinochloa crus-galli* and *Chenopodium album*). *Progress in Plant Protection*, 56(3), 372–378.
- SYNOWIEC, A., KALEMBA, D., DROZDEK, E., BOCIANOWSKI, J. (2017). Phytotoxic potential of essential oils from temperate climate plants against the germination of selected weeds and crops. *Journal of Pest Science*, 90, 407–419.
- TABAN, A., SAHARKHIZ, M.J., HADIAN, J. (2013). Allelopathic potential of essential oils from four *Satureja* spp. *Biological Agriculture and Horticulture*, 29, 244–257.
- TAO, N.G, LIU, Y.J., ZHANG, J.H., ZENG, H.Y., TANG, Y.F. AND ZHANG, M.L. (2008). Chemical composition of essential oil from the peel of Satsuma Mandarin. *African Journal of Biotechnology*, 7, 1261–1264.
- TEBAA, L., DOUMA, M., TAZART, Z., MANAUT, N., MOUHRI, K.H., LOUDIKI, M. (2017). Assessment of the potentially algicidal effects of *Thymus satureioides* Coss. and *Artemisia herba alba* L. against *Microcystis aeruginosa*. *Applied Ecology and Environmental Research*, 16(1), 903–912.
- TEPE, B., DAFERERA, D., SÖKMEN, M., POLISSIOU, M., SÖKMEN, A. (2004). In vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of *Thymus eigii* M Zohary et P.H. Davis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1132–1137.
- THOMPSON, J.D., MANICACCI, D., TARAYRE, M. (1998). Thirty-Five Years of Thyme: A Tale of Two Polymorphisms. Why so many females? Why so many chemotypes. *BioScience*, 48(10), 805–815.

- THOMPSON, J.D. (2002). Population structure and the spatial dynamics of genetic polymorphism in thyme. In: Stahl-Biskup E. & Sáez F. (eds.), *Thyme: The genus Thymus*. London: CRC Press Taylor & Francis Group, 44–74.
- THOMPSON, J.D., CHALCHAT, J.C., MICHET, A., LINHART, Y.B., EHLERS, B. (2003). Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *Journal of Chemical Ecology*, 29(4), 1261–1264.
- TOMÁS-BARBERÁN, F.A. & WOLLENWEBER, E. (1990). Flavonoid aglycones from the leaf surfaces of some Labiatae species. *Plant Systematics and Evolution*, 173, 109–118.
- TOUHAMI, A., CHEFROUR, A., KHELLAF, N., BUKHARI, A., FADEL, I. (2017). Phytochemical Characterization of the Essential Oils Obtained from Mediterranean *Thymus* spp. (Lamiaceae) Harvested at Different Stages of Growth. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5, 37–45.
- TRINDADE, H., COSTA, M.M., SOFIA, B.L.A., PEDRO, L.G., FIGUEIREDO, A.C., BARROSO, J.G. (2008). Genetic diversity and chemical polymorphism of *Thymus caespititius* from Pico, São Jorge and Terceira islands (Azores). *Biochemical Systematics and Ecology*, 36, 790–797.
- TWORKOSKI, T. (2002). Herbicide effects of essential oils. *Weeds Science*, 50, 425–432.
- TZAKOU, O. & CONSTANTINIDIS, T. (2005). Chemotaxonomic significance of volatile compounds in *Thymus samius* and its related species *Thymus atticus* and *Thymus parnassicus*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 33, 1131–1140.
- UREMIS, I., ARSLAN, M., SANGUN, M.K. (2009). Herbicidal Activity of Essential Oils on the Germination of Some Problem Weeds. *Asian Journal of Chemistry*, 21(4), 3199–3210.
- VAIČIULYTĖ, V., LOŽIENĖ, K., TARAŠKEVIČIUS, R., BUTKIENĖ, R. (2017). Variation of essential oil composition of *Thymus pulegioides* in relation to soil chemistry. *Industrial Crops and Products*, 95, 422–433.
- VALANT-VETSCHERA, K.M., ROITMAN, J.N., WOLLENWEBER, E. (2003). Chemodiversity of exudate flavonoids in some members of the Lamiaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31, 1279–1289.
- VELENOVSKÝ, J. (1904). Nachträge Zur Flora von Bulgarien. *Sber. Ber. Böhm. Ges. Wiss.*, 28 (1903), 1–28.
- VELENOVSKÝ, J. (1906). Vorstudien zu einer Monographie der Gattung *Thymus* L. Beihefte zum Botanischen Centralblatt, Abteilung, 2, 271–287.

- VERDEGUER M., AMPARO BLÁZQUEZ M., BOIRA H. (2009). Phytotoxic effects of *Lantana camara*, *Eucalyptus camaldulensis* and *Eriocephalus africanus* essential oils in weeds of Mediterranean summer crops. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37, 362–369.
- VERDEGUER M., (2011). Fitotoxicidad de aceites esenciales y extractos acuosos de plantas mediterráneas para el control de arvenses. Tesis doctoral. Universitat Politècnica de València, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural.
- VERDEGUER M., AMPARO BLÁZQUEZ M., BOIRA, H. (2012). Chemical composition and herbicidal activity of the essential oil from a *Cistus ladanifer* L. population from Spain. *Natural Product Research*, 26(17), 1602–1609.
- VERNET, PH., GOUYON, P.H., VALDEYRON, G. (1986). Genetic control of the oil content in *Thymus vulgaris* L.: a case of polymorphism in a biosynthetic chain. *Genetica*, 69, 227–231.
- VOKOU D (1999). Essential oils as allelochemicals: research advances in Greece. In: Narwal SS (ed) *Allelopathy Update (Vol 2) Basic and Applied Aspects*. Science, New York, 47–63.
- VOKOU, D.; DOUVLI, P.; BLIONIS, G.J.; HALLEY, J.M. (2003). Effects of monoterpenoids, acting alone or in pairs, on seed germination and subsequent seedling growth. *Journal of Chemical Ecology*, 29, 2281–2301.
- VYVYAN, J.R. (2002). Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. *Tetrahedron*, 58, 1631–1646.
- WALLER, G.R. (1989). Allelochemical action of some natural products. In Chou, C.H. & Waller, G.R. (eds.). *Phytochemical Ecology: allelochemicals, mycotoxins and insect pheromones and allomones*. Institute of Botany, Academia Sinica Monograph Series, 9, Taipei, Taiwan, 129–154.
- WATKINSON, A.R., FRECKLETON, R.P., ROBINSON, R.A., SUTHERLAND, W.J. (2000). Predictions of biodiversity response to genetically modified herbicide-tolerant crops. *Science*, 289, 1554–1557.
- WEIR, T.L., SANG-WOOK PARK, VIVANCO, J.M. (2004). Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. *Current Opinion in Plant Biology*, 7, 472–479.
- WEISENBURGER, D.D. (1993). Human health effects of agrichemical use. *Human Pathology*, 24, 571–576.
- WESTON, L. A. (1996). Utilization of allelopathy for weed management in agroecosystems. *Agronomy Journal*, 88, 860–866.

- WILLIAMS, R.D. & HOAGLAND, R.E. (1982). The effects of naturally occurring phenolic compounds on seed germination. *Weed Science*, 30, 206–212.
- WU, Y.B., NI, Z.Y., SHI, Q.W., DONG, M., KIYOTA, H., GU, Y.C., CONG, B. (2012a). Constituents from *Salvia* species and their biological activities. *Chemical Reviews*, 112, 5967–6026.
- WU, Y., LUO, Y., WANG, Q. (2012b). Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid–liquid dispersion method. *LWT-Journal of Food Science and Technology*, 48(2), 283–290.
- YOSHIMURA, H., SAWAJ, Y., TOMATSU, S., SAKAI, A. (2011). 1,8-cineole inhibits both proliferation and elongation of BY-2 culture tobacco cells. *Journal of Chemical Ecology*, 37, 320–328.
- ZYGADLO, J.A. & JULIANI, H.R. (2000). Bioactivity of essential oil components. Mini Review. *Current Topics in Phytochemistry*, 3, 203–208.

RINGRAZIAMENTI

Giunta al termine di questo lungo e impegnativo lavoro di ricerca, che per me ha rappresentato un'importante occasione di crescita non limitata al solo campo scientifico e professionale, desidero esprimere la mia profonda gratitudine a tutte le persone che mi hanno sostenuto e aiutato, contribuendo alla stesura di questa tesi e a rendere produttivi e piacevoli questi tre anni.

In primo luogo ringrazio il mio Tutor, la Prof.ssa Antonia Cristaudo, per il fondamentale supporto scientifico, l'incommensurabile aiuto e per i preziosi insegnamenti e consigli, di cui farò tesoro.

Ringrazio, per la grande disponibilità, per la pazienza e l'apporto scientifico, i miei co-tutors: il Dr. Giuseppe Ruberto (Istituto di Chimica Biomolecolare del CNR di Catania) per avermi fornito i fondamentali strumenti di analisi e interpretazione chimica degli oli essenziali, e il Prof. Andrea Onofri (Università degli Studi di Perugia) per l'indispensabile aiuto nell'elaborazione dei dati.

Ringrazio altresì la Prof.ssa Agata Di Stefano, Coordinatore del Dottorato di Ricerca, per la disponibilità e per l'impegno profuso.

Ringrazio il Prof. Giannantonio Domina (Università degli Studi di Palermo) per il supporto tassonomico nell'identificazione dei campioni.

Un ringraziamento particolare va al Dr. Rosario Galesi per la sua infinita pazienza e per avermi aiutato nell'impegnativa attività di reperimento, raccolta e identificazione del materiale vegetale.

Un sincero ringraziamento va anche al Prof. Francesco Donsì (Università degli Studi di Salerno) che con grande disponibilità ha apportato il suo prezioso contributo nella preparazione delle formulazioni impiegate per i saggi biologici, e alla Prof.ssa Mercedes Verdeguer Sancho (Università Politécnica di Valencia) che, accogliendomi con grande gentilezza, mi ha trasmesso parte delle sue conoscenze relative alla bioattività degli oli essenziali.

Ringrazio tutto lo staff dell'Istituto di Chimica Biomolecolare del CNR di Catania per la cordialità e, in particolare, la Sig.ra Tonia Strano per l'assistenza tecnica e per l'indispensabile aiuto nell'estrazione, analisi e caratterizzazione degli oli essenziali.

Un sentito e sincero ringraziamento va al personale della sezione di Biologia vegetale del Dipartimento di Scienze biologiche, geologiche e ambientali, con il quale ho condiviso questi anni e che mi ha sostenuto con affetto.

Ringrazio, inoltre, il Dott. Alessandro Marletta per il grande aiuto ricevuto nella stesura della tesi e per i tanti suggerimenti.

Un ringraziamento speciale va a Francesco Del Bo per il prezioso supporto fornito nel reperimento e campionamento del materiale in Calabria.

Infine, ringrazio immensamente la mia famiglia e tutti i miei amici più cari per esserci stati sempre, per avermi sostenuto nei momenti più difficili e per aver contribuito, direttamente o indirettamente, al raggiungimento di questo importante traguardo.

Grazie di cuore a tutti!



Carmen

Novembre 2018