

ALMA MATER STUDIORUM-UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE,
AMBIENTALI E ALIMENTARI**

XXVIII CICLO

Settore Concorsuale di afferenza: 07/D1

Settore Scientifico disciplinare: AGR11

**ATTIVITA' BIOLOGICA DI ALCUNI OLI ESSENZIALI E LORO
COMPONENTI NEI CONFRONTI DI *MYZUS PERSICAE*.**

Presentata da: Giulio Marianacci

**COORDINATORE DEL DOTTORATO
Chiar.mo Prof. Giovanni Dinelli**

**RELATORE
Chiar.mo Prof. Stefano Maini**

Esame Finale anno 2017

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	3
2. GLI OLI ESSENZIALI.....	6
2.1. Brevi cenni storici sull'uso degli oli essenziali.....	6
2.2. Metodi di estrazione e caratteristiche degli oli essenziali.....	7
2.3. Biosintesi degli oli essenziali.....	10
2.4. Effetti biologici degli oli essenziali.....	12
2.5. Impiego degli oli essenziali come insetticidi.....	14
2.6. L'afide verde del pesco: ciclo biologico, danni provocati e strategie di difesa.....	17
3. MATERIALI E METODI.....	21
3.1. Scopo della ricerca.....	21
3.2. Prove preliminari.....	21
3.2.1. Allevamento di <i>Myzus persicae</i> Sulzer su <i>Pisum</i> <i>sativum</i> L.....	23
3.2.2. Principi attivi e oli essenziali utilizzati.....	28
3.3. Emulsionanti ed insetticidi di sintesi utilizzati.....	32
3.4. Metodi.....	32
3.5. Analisi statistica.....	37
4. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	38
4.1. Risultati.....	38
4.2. Discussione.....	69
5. CONCLUSIONI.....	73
6. BIBLIOGRAFIA CITATA.....	74

1. INTRODUZIONE

Uno dei principali problemi dell'agricoltura, sin dalla sua nascita, è il controllo degli insetti dannosi per le piante coltivate. Nell'ultimo secolo la lotta è stata condotta mediante l'utilizzo di composti organici di sintesi. Questi, in un primo momento, hanno rappresentato un sistema di controllo efficace e lasciato intravedere una risoluzione definitiva del problema. Ma le straordinarie capacità di sopravvivenza e adattamento degli insetti hanno rivelato i limiti di queste tecniche di difesa e, con il tempo, sono emersi ulteriori problemi direttamente collegati all'utilizzo degli insetticidi di sintesi. L'inquinamento dell'ambiente soprattutto ad opera dei composti più persistenti, l'instabilità dovuta alla estrema semplificazione degli agroecosistemi e i danni alla salute dei lavoratori del settore e dei consumatori sono gli aspetti più evidenti degli effetti collaterali dell'uso di queste tecniche di lotta. La consapevolezza di dover trovare delle strategie alternative si è fatta strada a partire dagli anni sessanta del secolo scorso e nell'arco di qualche decennio ha portato alla definizione di tecniche di difesa più rispettose dell'ambiente e della salute pubblica. Hanno contribuito a ciò anche l'introduzione di norme più restrittive all'impiego delle sostanze di sintesi e la sempre maggiore attenzione dei consumatori verso prodotti biologici. Anche l'attenzione verso i processi produttivi rispettosi dell'ambiente e della dignità dei lavoratori è aumentata nel tempo e insieme alle problematiche relative alla sicurezza alimentare hanno determinato, nel nuovo millennio, un incremento delle forme di agricoltura alternative alla grande agricoltura industrializzata.

L'agricoltura urbana e le varie forme di agricoltura biologica ne sono un esempio.

Secondo la Federazione Internazionale dei Movimenti per l'Agricoltura Biologica (IFOAM) alla fine del 2015 circa 60 milioni di ettari nel mondo erano coltivati secondo i metodi dell'agricoltura biologica, 6,5 milioni di ettari in più rispetto al 2014. Una crescita, secondo l'IFOAM, mai registrata prima. Anche l'agricoltura urbana è destinata a diventare una realtà stabile di molte città dei paesi poveri e ricchi (Gianquinto e Tei, 2010). Secondo gli autori essa contribuirà alla sicurezza alimentare dei cittadini soprattutto nei paesi più poveri e al miglioramento delle loro condizioni di salute. Il potenziale produttivo dell'agricoltura urbana e i benefici che essa può apportare in termini di incremento della biodiversità e diminuzione delle emissioni dei gas serra sono oggetto di studi sempre più numerosi. Uno di questi ha riguardato la città di Bologna ed ha dimostrato che se venissero coltivati tutti i terrazzi e i tetti piani si avrebbe a disposizione una superficie di 80 ettari che produrrebbe circa 12,495 t di vegetali freschi l'anno, ossia il 77% del fabbisogno annuo della città (Orsini *et al.*, 2014).

L'agricoltura urbana e più in generale le questioni riguardanti l'ecologia in ambiente urbano hanno assunto negli ultimi anni un rilievo maggiore che in passato. Ma ad una crescita di interesse su questi temi non è corrisposto una adeguata attività di ricerca riguardante la gestione, dal punto di vista fitosanitario, di sistemi di piccole dimensioni e in ambienti fortemente antropizzati. Le problematiche e le possibili soluzioni relative alla lotta biologica agli insetti dannosi in piccoli sistemi sono infatti diverse da quelle relative alle aziende agricole di medie e grandi dimensioni e vanno indagati in modo specifico.

L'agricoltura urbana, quindi, non è esente da rischi e tra questi sicuramente vanno annoverati quelli legati ad un uso improprio dei fitofarmaci.

L'uso degli estratti vegetali con proprietà insetticide, se efficaci, potrebbe rappresentare una valida alternativa ai prodotti organici di sintesi. Tra questi meritano di essere studiati gli oli essenziali.

2. GLI OLI ESSENZIALI.

2.1 Brevi cenni storici sull'uso degli oli essenziali

Sebbene il processo di distillazione come metodo per produrre gli oli essenziali sia stato usato in Egitto, India e Persia più di 2000 anni fa e sia stato migliorato ad opera degli Arabi durante il IX secolo, la prima testimonianza scritta sulle modalità di estrazione dagli organi vegetali risale al XIII secolo ed è dovuta all'opera del fisico catalano Villanova (Guenther, 1948). Durante il basso medioevo gli oli essenziali erano prodotti dai farmacisti e i loro effetti farmacologici erano descritti dalla farmacopea dell'epoca (Bauer *et al.*, 2001). Ciò nonostante, il loro uso in Europa rimase limitato fino al XVI secolo, quando cominciarono ad essere commercializzati nella City di Londra (Crosthwaite, 1998). Nel corso del XVII secolo la produzione degli oli essenziali era un procedimento ben conosciuto e le farmacie potevano averne a disposizione anche 15-20 diversi (Gaunther, 1948). Bisogna attendere però la fine del XVIII secolo per avere notizie certe sull'uso di un olio essenziale per scopi medici (Carson e Riley, 1993) e la fine del secolo successivo per i primi esperimenti sulle proprietà battericide di queste essenze (Boyle, 1955). Nel corso degli ultimi due secoli, comunque, l'uso degli oli essenziali a scopo medico diventa secondario rispetto al loro uso come aromi nell'industria alimentare e come fragranze nell'industria dei profumi (Guenther, 1948).

Nell'ultimo mezzo secolo, inoltre, si è andato via via affermando l'interesse per l'uso degli oli essenziali come prodotti naturali per il controllo degli insetti dannosi; l'attenzione per questo nuovo campo d'impiego è dimostrato dalle migliaia di lavori scientifici pubblicati sulle riviste specializzate di tutto il mondo (Regnault-Roger *et al.*, 2012).

2.2 Metodi di estrazione e caratteristiche degli oli essenziali

Gli oli essenziali sono composti naturali di natura complessa ottenuti mediante distillazione in corrente di vapore, idrodistillazione, distillazione a secco o spremitura a freddo di organi vegetali. (European Pharmacopoeia, 2008). Il metodo classico di estrazione è quello basato sulla distillazione in corrente di vapore. Usato anche su scala industriale, il metodo richiede apparati di grandi dimensioni per contenere la biomassa vegetale da cui estrarre gli oli essenziali ed è molto costoso perché la distillazione richiede elevate temperature. Le essenze estratte dagli agrumi rappresentano una eccezione a questo metodo: grandi quantità di prodotto possono essere ottenuti mediante la spremitura a freddo degli esocarpi dei frutti (Regnault-Roger *et al.*, 2012). Una variante della distillazione in corrente di vapore è l'idrodistillazione nella quale il materiale vegetale è immerso in acqua che viene scaldata fino ad ebollizione. Si genera in questo caso un flusso di vapore che trasporta l'olio essenziale nel condensatore e poi nel sistema di decantazione. Metodi più moderni di estrazione prevedono l'uso di microonde e di fluidi come l'anidride carbonica supercritica che trovandosi ad uno stadio intermedio tra quello gassoso e quello liquido ha elevate capacità solvatanti (Regnault-Roger *et al.*, 2012).

I differenti metodi di estrazione incidono sulle caratteristiche finali del prodotto (Chiasson *et al.*, 2001). Gli autori hanno comparato le caratteristiche chimiche e le proprietà acaricide degli oli essenziali di *Artemisia absinthium* L. e *Tanacetum vulgare* L. estratti mediante l'uso di microonde, idrodistillazione e distillazione in corrente di vapore. La diversa composizione chimica, rilevata mediante gascromatografia, degli oli essenziali estratti in corrente di vapore rispetto agli altri due metodi di estrazione era all'origine, secondo gli autori, della loro maggiore efficacia acaricida.

Gli oli essenziali vengono estratti da decine di migliaia di piante diverse appartenenti soprattutto alle famiglie delle Myrtaceae, Lauraceae, Lamiaceae e Asteraceae (Regnault-Roger *et al.*, 2012). La sintesi e l'accumulo di queste essenze avviene all'interno di strutture secretorie diverse nelle varie famiglie: cavità secretrici nelle Myrtaceae e Rutaceae, tricomi ghiandolari nelle Lamiaceae e condotti resiniferi nelle Asteraceae e Apiaceae (Rodriguez *et al.*, 1984). Gli oli essenziali inoltre vengono immagazzinati in organi diversi nelle diverse specie di piante: nei fiori [bergamotto, *Citrus aurantium* L. spp *bergamia* (Risso & Poit) Wight & Arn], nelle foglie (citronella, *Citronella* spp., eucalipto *Eucalyptus* spp), nel legno (sandalò, *Sandalus* spp.), nelle radici (vetiver, *Chrysopogon zizanioides*(L.) Roberty), nei rizomi (zenzero, *Zingiber officinale* Roscoe; curcuma, *Curcuma longa* L.), nei frutti (anice, *Pimpinella anisum*L.) e nei semi (noce moscata, *Myristica fragrans* Houtt.) (Regnault-Roger *et al.*, 2012).

La composizione degli oli essenziali è molto variabile e dipende da numerosissimi fattori tra cui, come abbiamo visto sopra, anche i metodi di estrazione. Anche quando il metodo di estrazione è lo stesso, le variazioni nella composizione degli estratti vegetali sono la norma. D'altra parte la variabilità nella composizione chimica di una merce proveniente da estratti vegetali non dovrebbe essere una sorpresa per tutti gli operatori del settore, come non lo è per tutti coloro che apprezzano il caffè, il tè, il vino o il cioccolato (Isman, 2006). La composizione chimica degli oli essenziali estratti da piante della famiglia delle Lamiaceae, per esempio, dipende dall'ambiente di coltivazione, dai metodi di coltivazione e dalle condizioni di stress delle piante (Delfine *et al.*, 2005; Russo *et al.*, 2013). Quella degli oli provenienti dalle specie del genere *Lavandula* cambiano a secondo delle parti della pianta analizzata (Skoula *et al.*, 1996; Gonzàles-Coloma *et al.*, 2011), dei fattori ambientali (Munoz-Bertomeu *et al.*, 2007), del metodo di

estrazione (Kim e Lee, 2002; Fakhari *et al.*, 2005) e delle specie utilizzate (Touati *et al.*, 2011). Anche il suolo di coltivazione può influire in maniera significativa sulla composizione di un olio essenziale. Flamini *et al.* (2011) hanno eseguito uno studio sulla composizione chimica degli oli essenziali estratti da due popolazioni di *Teucrium flavum* L. subsp. *flavum* presenti su calcare sul promontorio del Caprione (Liguria orientale) e su ofioliti fra Nebbia e Gabbro (Colline livornesi). L'olio essenziale ottenuto dalle piante raccolte su calcare aveva una percentuale di monoterpeni del 47,7% mentre quelle raccolte su ofioliti del 61,2%; i sesquiterpeni invece erano più abbondanti nelle piante raccolte su calcare (42,6%) rispetto alle piante raccolte su ofioliti (22,7%). E ancora, l'olio essenziale estratto dall'*Artemisia vulgaris* L. presenta differenze qualitative e quantitative in funzione del paese di coltivazione (Govindaraj and Kumari, 2013). La composizione di quello di Eucalipto dipende dalla specie, dall'ambiente di coltivazione, dal clima, dalla stagione, dall'età delle foglie, dal tipo di suolo e non ultimo dai metodi di disidratazione del materiale e di estrazione dell'olio essenziale (Batish *et al.*, 2008). L'olio essenziale di rosmarino estratto da piante raccolte in due zone diverse dell'Italia contengono concentrazioni di 1,8-Cineolo che variano dal 7% al 55% e di α -pinene dall'11% al 36% (Isman *et al.*, 2007). La grande variabilità nella composizione degli oli essenziali rende necessaria la loro caratterizzazione mediante gascromatografia (GC) associata a un rivelatore di spettrometria di massa (MS) o, molto diffuso, ad un rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID-Flame Ionization Detector) che consentono di determinare le varie miscele di composti organici. Naturalmente questa variabilità ha importanti conseguenze sull'attività biologica di queste essenze tanto che la produzione e la standardizzazione dei vari prodotti rappresentano una sfida per questo settore (Regnault-Roger *et al.*, 2012).

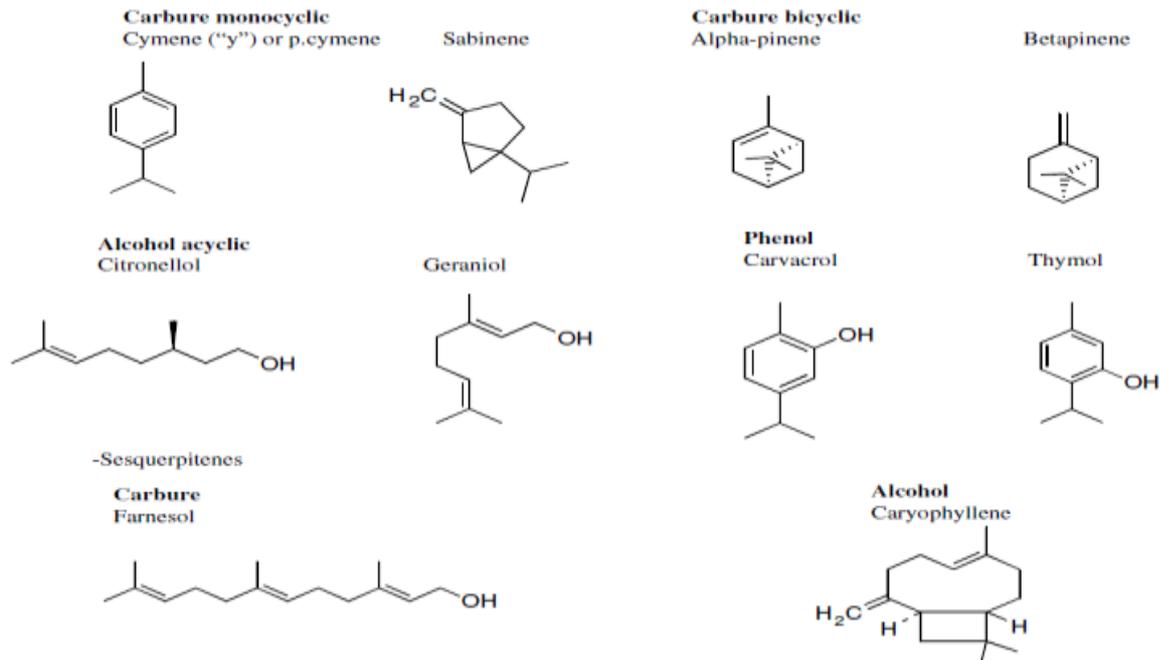
2.3 Biosintesi degli oli essenziali.

Gli oli essenziali sono un miscuglio eterogeneo di numerosi composti chimici prodotti dal metabolismo secondario delle piante. In genere sono costituiti da 20-60 composti a differente concentrazione di cui due o tre rappresentano il 20-70% dell'essenza mentre gli altri sono presenti in tracce (Bakkali *et al.*, 2008). I principali costituenti, tutti caratterizzati dall'aver un basso peso molecolare, sono molecole appartenenti alla famiglia dei terpeni, dei terpenoidi, ossia terpeni contenenti ossigeno, e in minor misura dei fenilpropanoidi (Regnault-Roger *et al.*, 2012; Pichersky *et al.*, 2006). Terpeni e terpenoidi sono i prodotti naturali più abbondanti e più ampiamente diffusi nelle piante (Capasso e Violante, 2003). Sono composti caratterizzati da una notevole varietà strutturale costituiti da una o più unità isopreniche a cinque atomi di carbonio (C_5), legate tra loro secondo un sistema detto *testa-coda* (Capasso e Violante, 2003). Possono essere distinti in *emiterpeni* (C_5) costituiti da una singola unità isoprenica, *monoterpeni* (C_{10}) costituiti da due unità isopreniche, *sesquiterpeni* (C_{15}) da tre unità isopreniche, *diterpeni* (C_{20}) da quattro unità isopreniche, *sesterterpeni* (C_{25}) da cinque unità isopreniche diffusi nei microrganismi e i *triterpeni* (C_{30}) costituiti da sei unità isopreniche. Negli oli essenziali sono presenti i composti più volatili e profumati, soprattutto monoterpeni e sesquiterpeni e in minore misura i composti aromatici derivati dal fenilpropano (**fig.2.1**). I monoterpeni possono essere regolari, molto più comuni, e irregolari e comprendono composti lineari o ciclici. Dalla struttura base dei monoterpeni regolari attraverso reazioni di ossidoriduzione si possono formare gruppi funzionali tipici degli

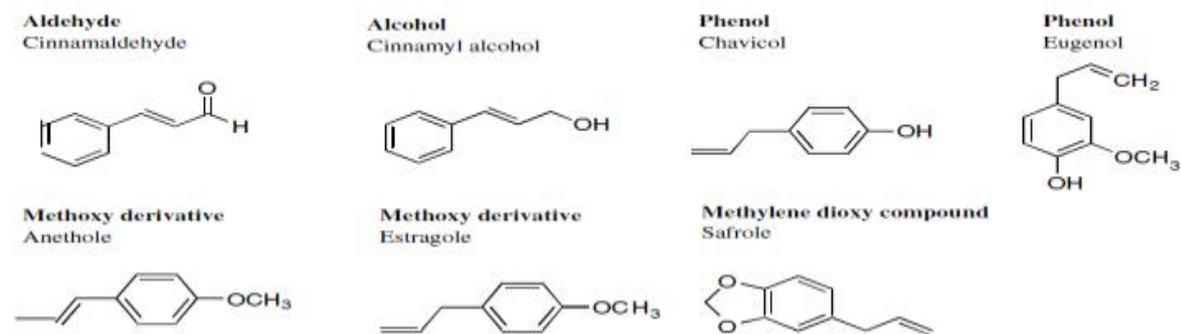
alcoli, delle aldeidi, dei chetoni, degli esteri ed degli eteri. Anche i sesquiterpeni possono essere distinti in lineari e ciclici e a seguito di reazioni di ossidoriduzione si possono formare gruppi funzionali come per i monoterpeni.

1. Terpenes

-Monoterpenes



2. Aromatic compounds



3. Terpenoides (Isoprenoides)

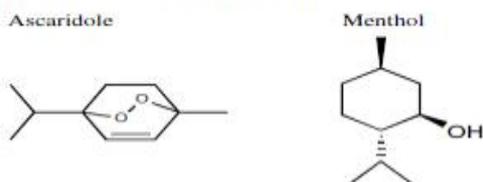


Figura 2.1. Struttura chimica di alcuni componenti degli oli essenziali. Immagine tratta da Bakkali *et al.*, 2008.

La biosintesi dei terpeni ha origine dall'acido mevalonico (AMV), presente nelle cellule nella sua forma dissociata il mevalonato (MVL), un composto a sei atomi di carbonio che si forma dalla sintesi di tre molecole di acetil-CoA provenienti dal piruvato. Il mevalonato poi è trasformato in isopentenil pirofosfato (IPP) e questo infine mediante una reazione reversibile in dimetilallil pirofosfato (DMAPP). La condensazione del DMAPP con l'IPP mediante il sistema *testa-coda* dà origine al geranil pirofosfato che è il precursore aciclico dei monoterpeni, mentre la successiva condensazione di una ulteriore unità di IPP dà origine al farnesil pirofosfato che è il precursore dei sesquiterpeni (Capasso e Violante, 2003). I composti aromatici invece vengono prodotti da una via biosintetica diversa che ha come intermedio l'acido shikimico (Regnaul-Roger *et al.*, 2012). I monoterpeni sono i costituenti più abbondanti presenti negli oli essenziali (Bakkali *et al.*, 2008).

2.4 Effetti biologici degli oli essenziali.

A causa del loro elevato numero di costituenti, gli oli essenziali sembrano non avere bersagli cellulari specifici (Carson *et al.*, 2002). Nei batteri i meccanismi che portano alla morte cellulare possono essere i più disparati. La citotossicità può essere dovuta alla capacità di queste essenze di alterare la permeabilità della parete cellulare e della membrana citoplasmatica in seguito alla distruzione degli strati di polisaccaridi e fosfolipidi che le costituiscono (Bakkali *et al.*, 2008). Altre volte la morte cellulare può essere causata dalla coagulazione del citoplasma (Gustafson

et al., 1998) o avvenire in seguito ai danni riportati dalle molecole lipidiche e proteiche (Burt, 2004). Nelle cellule degli eucarioti gli oli essenziali possono provocare danni alle membrane mitocondriali che diventano permeabili in modo anormale; ciò conduce alla morte della cellula in seguito a necrosi o per apoptosi (Yoon *et al.*, 2000; Armstrong, 2006). Alcuni studiosi hanno messo in evidenza la capacità di molti monoterpeni di raggiungere ed essere incorporati all'interno delle membrane biologiche per alterarne la funzionalità dinamica (Turina *et al.*, 2006), mentre altri hanno studiato i cambiamenti nella composizione degli acidi grassi delle membrane quando vengono attuate colture cellulari in terreni di crescita contenenti sostanze presenti negli oli essenziali (Di Pasqua *et al.*, 2006). Le proprietà citotossiche dei componenti degli oli essenziali rendono queste essenze potenzialmente efficaci per combattere non solo organismi unicellulari procarioti come i batteri, ma anche protozoi (Monzote *et al.*, 2006), funghi (Hammer *et al.*, 2002) acari (Rim e Jee, 2006) e insetti (Regnault *et al.*, 2012; Masetti, 2016). L'attività insetticida degli oli essenziali è dovuta a meccanismi d'azione diversi a causa della enorme varietà di molecole presenti in queste essenze e ciò conferma quanto già detto a proposito dell'attività citotossica. Kostyukovsky *et al.*, (2002) hanno studiato i meccanismi d'azione di due oli essenziali estratti da piante aromatiche coltivate in Israele efficaci per combattere insetti dannosi alle derrate immagazzinate. Gli autori hanno dimostrato che i due costituenti più abbondanti hanno una attività inibitoria sull'enzima acetilcolinesterasi solo ad elevate concentrazioni. Essi inoltre svolgono un ruolo chiave nell'attivazione dei recettori dell'octopamina, un neurotrasmettitore, che probabilmente in questi insetti determina la distensione addominale fondamentale per i movimenti respiratori e la muta. Gli autori, inoltre, hanno dimostrato il ruolo degli oli essenziali sul sistema octopaminergico studiando anche

gli effetti che questi hanno su culture di cellule epidermiche addominali di *Helicoverpa armigera* (Hubner 1808). Il ruolo di alcuni componenti degli oli essenziali di legarsi ai recettori dell'octopamina impedendo al neurotrasmettitore di svolgere correttamente la propria funzione è stato dimostrato in uno studio condotto sugli insetti *Periplaneta americana* (Linnaeus 1758), *Camponotus pennsylvanicus* De Geer e *Blattella germanica* (Linnaeus 1776) (Enan, 2001). Alcuni oli essenziali sono noti per inibire i citocromi P450, una super famiglia di enzimi che svolgono un ruolo fondamentale nel processo di detossicazione dell'organismo da agenti esogeni ed endogeni e che in molti casi sono coinvolti nell'insorgenza di resistenza agli insetticidi (Regnault-Roger *et al.*, 2012). Altri ricercatori hanno individuato numerosi recettori implicati nella trasmissione degli impulsi nervosi che rappresentano siti target per numerosi monoterpeni presenti negli oli essenziali (Hiugnard *et al.*, 2008). Infine altri costituenti di queste essenze come per esempio il terpinen-4-ol e il 1,8-cineolo inibiscono l'enzima acetilcolinesterasi (Regnault-Roger *et al.*, 2012). I meccanismi d'azione quindi sono molto diversificati e ciò dovrebbe ritardare l'insorgenza del fenomeno della resistenza che invece è molto frequente quando si usano gli insetticidi di sintesi (Koul *et al.*, 2008).

2.5 Impiego degli oli essenziali come insetticidi.

Gli insetticidi di origine vegetale giocano ancora un ruolo marginale nel controllo degli insetti dannosi alle derrate immagazzinate e nella protezione delle colture in campo. Solo una manciata di prodotti hanno raggiunto il mercato in Europa e negli Stati Uniti negli ultimi venti anni (Isman, 2008). Tuttavia la sempre

maggior attenzione per la salute dei cittadini e l'inquinamento dell'ambiente stanno creando nuove opportunità per l'uso degli insetticidi botanici. Gli oli essenziali e i loro costituenti potrebbero essere utilizzati come mezzo di difesa delle derrate alimentari e delle piante coltivate in tutte quelle situazioni in cui la salute e il benessere dei cittadini e degli animali hanno un ruolo di primaria importanza. Nei paesi ricchi potrebbero svolgere un ruolo fondamentale nella produzione degli alimenti biologici e nel controllo dei parassiti che provocano danni nei giardini, negli orti familiari e urbani o che infestano gli animali domestici. Nei paesi poveri potrebbero giocare un ruolo anche superiore ai prodotti chimici di sintesi dato l'enorme patrimonio vegetale da cui queste essenze possono essere estratte e il contributo che la conoscenza indigena e la pratica tradizionale possono dare per la produzione alimentare locale (Isman, 2008). Naturalmente l'uso di queste sostanze andrebbe supportato da studi scientifici rigorosi che dovrebbero riguardare la loro efficacia e la tossicità verso l'uomo e gli organismi non target. Nonostante gli studi siano nel complesso ancora pochi e sono svolti soprattutto da ricercatori di paesi poveri alcuni di essi confermano la potenzialità che questi prodotti possono ricoprire in un prossimo futuro nella protezione delle piante coltivate e delle derrate alimentari. Kesdek *et al.*, (2015) hanno testato la tossicità acuta di alcuni oli essenziali ottenuti da 14 piante diverse appartenenti ai generi *Achillea*, *Origanum*, *Artemisia* e *Thymus* su *Leptinotarsa decemlineata* Say e hanno riscontrato un tasso di mortalità che va dal 2% al 100%. Wang *et al.*, (2006) in un lavoro condotto sulla repellenza e sull'efficacia fumigante dell'olio essenziale estratto da *Artemisia vulgaris* contro *Tribolium castaneum* (Herbst), un insetto dannoso alle derrate immagazzinate, hanno riscontrato che la mortalità può raggiungere il 100% degli insetti se si aumenta il tempo di esposizione e la concentrazione del trattamento. Batish *et*

al.,(2008) affermano che gli oli essenziali estratti dal genere *Eucalyptus* sono conosciuti da centinaia di anni per la loro proprietà battericide, fungicide e antisettiche. Gli autori, pur ammettendo un'azione sinergica tra i vari composti che formano queste essenze, individuano nel 1,8-Cineolo la molecola che li caratterizza e che conferisce loro le proprietà biocide. Kumar *et al.*, (2012) hanno condotto uno studio sull'attività insetticida per contatto e sull'efficacia fumigante dell'olio essenziale estratto dall'*Eucalyptus globulus* Labill. contro la mosca domestica (*Musca domestica* Linnaeus 1758). Gli autori, pur ottenendo buoni risultati in tutti i saggi, hanno riscontrato sia sulle larve che sulle pupe una maggiore efficacia fumigante dell'olio essenziale rispetto alla sua tossicità per contatto. Ko *et al.*,(2009) dopo aver valutato la tossicità per contatto e l'efficacia fumigante dell'olio essenziale estratto dalla *Melaleuca cajuputi* Powell contro *Sitophilus zeamais* Motschulsky e *Tribolium castaneum* concludono che questo olio essenziale può rappresentare una valida alternativa all'uso dei prodotti chimici di sintesi. Lee *et al.*, (2001) hanno scoperto che anche l'olio essenziale estratto da *Rosmarinus officinalis* L. è tossico contro *Sitophilus oryzae* (L.) e ciò è dovuto alla elevata presenza in questa essenza dell'1,8-Cineolo, caratteristica questa che lo accomuna agli oli essenziali estratti dalle piante del genere *Eucalyptus*. L'efficacia insetticida dell'olio essenziale di rosmarino e l'azione sinergica dei suoi due maggiori costituenti, 1,8 Cineolo e Camphor, su *Trichoplusia ni* (Hubner1803) sono stati studiati da Tak e Isman (2015). Secondo gli autori a volte gli effetti di un olio essenziale dipende da quello dei suoi maggiori costituenti, ma ciò non sempre è vero in quanto anche il contrario è possibile; l'efficacia di un olio essenziale non è la semplice somma dell'efficacia dei singoli costituenti in quanto tra questi possono esserci effetti sinergici e antagonisti. Anche i singoli composti presenti negli oli essenziali sono stati studiati per valutarne

l'efficacia insetticida. Kordali *et al.*,(2007) hanno verificato l'efficacia insetticida di 30 monoterpeni contro le larve e gli adulti di *Leptinotarsa decemlineata*. I ricercatori hanno scoperto che il Myrcene ha una elevata tossicità contro tutti gli stadi larvali del coleottero, che tra i monoterpeni ossigenati l'1,8-Cineolo è uno dei composti più tossici contro gli adulti e che il Limonene causa il 100% di mortalità degli adulti della dorifora dopo 24 ore dall'esposizione.

2.6 L'afide verde del pesco: ciclo biologico, danni provocati e strategie di difesa.

Il *Myzus persicae* Sulzer , un insetto della famiglia Aphididae dell'ordine Hemiptera, è uno degli afidi più importanti in agricoltura se non altro per la sua straordinaria versatilità nel trasmettere virus agli ospiti secondari (Masutti e Zangheri, 2001). È un piccolo insetto di 2-3,5 mm, di colore verde diffuso in gran parte del mondo. Svolge un olociclo eteroico tra l'ospite primario, il pesco, e numerosi ospiti secondari. Sverna come uovo sul pesco, primario privilegiato nei nostri climi, e su rosacee affini, o anche come forma attera su ospiti secondari sopravvissuti al freddo o coltivati in luoghi riparati o perfino su prodotti immagazzinati come le patate (Masutti e Zangheri, 2001). Nell'olociclo, le fondatrici, a partire dal mese di marzo, colonizzano le gemme rigonfie del pesco e danno origine a tre successive generazioni di virginopare. Queste provocano danni a carico delle foglie e dei germogli che risultano completamente accartocciati e in seguito anche a carico dei piccoli frutti che crescono irregolarmente (Pollini *et al.*, 1988). Le forme alate che compaiono sempre più numerose nel corso della primavera sono in grado di diffondere

l'infestazione sugli oltre 400 ospiti secondari. Nell'Italia settentrionale il fogliame del pesco è completamente abbandonato entro il mese di giugno, mentre in quella meridionale e nell'area mediterranea ciò avviene già in aprile-maggio (Masutti e Zangheri, 2001). Sugli ospiti secondari si avvicendano diverse generazioni di virginogenie dapprima attere e poi alate che diffondono l'infestazione. L'ospite primario viene riacquisito a secondo dei climi da settembre a dicembre da maschi alati e ginopare. I danni che l'afide verde del pesco provoca sugli ospiti secondari sono dovuti soprattutto alla trasmissione di oltre 100 virusi diverse; particolarmente gravi sono quelle trasmesse alla patata, alla barbabietola e al tabacco (Masutti e Zangheri, 2001). Anche se i nemici naturali dell'afide verde del pesco sono molto numerosi, (adulti e larve di coleotteri coccinellidi, larve di neurotteri crisopidi ed emerobidi, di ditteri sirfidi e cecidomidi, larve di *Allothrombium fuliginosum* Her. ecc) essi intervengono quando le colonie sono molto sviluppate e hanno già causato i danni (Pollini *et al.*, 1988). A causa dell'elevata pericolosità dell'afide verde del pesco si preferisce intervenire precocemente sulle fondatrici o sulle fondatrigenie quando ancora non hanno causato accartocciamento fogliare e non hanno attirato schiere di predatori e parassiti. Secondo il Disciplinare di Produzione Integrata 2016 della Regione Emilia Romagna la soglia di intervento è:

-3% di germogli infestati in pre e post-fioritura per le nettarine

-3% di germogli infestati in pre-fioritura, 10% di germogli infestati in post-fioritura per le pesche e le percoche

I principi attivi e il numero degli interventi autorizzati dal Disciplinare di Produzione Integrata sono riportati nella tabella seguente (**tab 2.1**).

Tabella 2.1. Sostanze attive e numero di interventi ammessi.

Sostanze attive(s.a.)	(1)	(2)	Limitazioni d'uso e note
Fluvalinate	1 [*]		([*]) Solo in pre fioritura se nell'anno precedente non stiano stati usati acaricidi
Spirotetramat	1 [*]		([*]) A partire dalla scamicatura
Imidacloprid	1([*])	2	(^{**})Ammessi solo contro afide verde
Thiamethoxam	1([*])(^{**})		([*]) Solo dopo fioritura
Acetamiprid	2		
Clothianidin	1([*])(^{**})		
Pirimicarb	([*])		([*]) Si consiglia di sospendere l'uso a 30 giorni dalla raccolta
Flonicamid	1([*])		([*]) Ammesso solo contro afide verde
Sali potassici di acidi grassi			

(1) N. massimo di interventi anno per singola s.a., o per sottogruppo, indipendentemente dall'avversità

(2) N. massimo di interventi per gruppo di s.a., indipendentemente dall'avversità

La lotta all'afide verde del pesco, quindi, fa un largo uso di prodotti chimici di sintesi e tra questi di insetticidi neonicotinoidi come l'Imidacloprid, il Clothianidin, il Thiamethoxam e l'Acetamiprid che hanno mostrato di avere una scarsa selettività verso gli organismi utili presenti negli agroecosistemi (Goulson *et al.*, 2015). Sicuramente questo ha rappresentato uno stimolo per sperimentare nuovi prodotti che all'efficacia abbinassero una

maggiore selettività verso gli organismi utili. Alcuni di questi studi hanno riguardato gli oli essenziali. Ricci *et al.*, (2010) hanno verificato che l'effetto repellente del 1,8-Cineolo su *M. persicae* e *Brevicoryne brassicae* L. poteva raggiungere il 100% quando il composto era usato alla massima concentrazione del 2,5%. Petrakis *et al.*,(2014) hanno verificato che tutti gli oli essenziali estratti da piante della famiglia delle Lamiaceae riducono la longevità e la fecondità dell'afide verde del pesco. Un risultato simile è stato ottenuto da Tomova *et al.*,(2005) usando l'olio essenziale di *Tagetes minuta* L. contro tre specie di afidi tra cui il *M.persicae*. La riduzione della fecondità poteva raggiungere il 100% dopo 5 giorni dall'esposizione. Pinheiro *et al.*,(2013) hanno valutato invece l'efficacia insetticida dell'olio essenziale estratto da *Cymbopogon winterianus* Jowitt nei confronti di *Frankliniella schultzei* (Trybom 1910) e *M. persicae*. La sperimentazione è stata condotta utilizzando ninfe di *M. persicae* poste su foglie di cavolo poste all'interno di capsule Petri che dopo il trattamento venivano chiuse con il proprio coperchio. In questo modo i ricercatori hanno ottenuto una mortalità dell'afide verde del pesco del 96.9%. Faraone *et al.*, (2015), infine, oltre a studiare l'efficacia insetticida di alcuni oli essenziali e loro componenti hanno valutato l'effetto sinergico che queste essenze possono avere se miscelati con insetticidi di sintesi. Hanno scoperto che gli oli essenziali di *Lavandula angustifolia* Mill. e di *Thymus vulgaris* L. hanno un notevole effetto sinergizzante sull'insetticida Imidacloprid mentre diminuiscono l'efficacia dell'insetticida Spirotetramat.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Scopo della ricerca

Il presente lavoro è stato condotto per valutare l'efficacia insetticida per contatto di alcuni oli essenziali e loro componenti. Questi composti rivestono nelle piante un ruolo importante nel limitare gli attacchi di microorganismi fungini e batterici e nella difesa dagli insetti fitofagi (Bakkali *et al.*, 2008; Isman, 2000). Gli oli essenziali inoltre sono poco persistenti nell'ambiente e possiedono una bassa tossicità acuta e cronica verso l'uomo e gli organismi utili che popolano gli agroecosistemi (Koul *et al.*, 2008). I trattamenti sono stati eseguiti per via fogliare su piante di pisello su cui erano allevate neanidi di *Myzus persicae*. L'efficacia insetticida è stata valutata rilevando la mortalità a 24, 48 e 72 ore dal trattamento.

La scelta del *M. persicae* come insetto target è dipesa dal fatto che questo fitofago, estremamente polifago, è uno dei più dannosi e difficili da controllare in agricoltura. Inoltre era particolarmente adatto al tipo di sperimentazione che si era deciso di condurre in quanto l'insetto può essere allevato solo su piante in attiva crescita e non in vitro su substrati ad hoc. Di conseguenza i trattamenti sono stati eseguiti irrorando le piante ospiti con le miscele opportunamente preparate, per simulare il più possibile le condizioni di campo.

3.2 Prove preliminari

Alla fine del primo anno di dottorato, dopo accurata ricerca bibliografica, sono state condotte prove preliminari al fine di mettere a punto una strategia per saggiare adeguatamente la

tossicità degli oli essenziali. Allo scopo gli afidi allevati in camera di crescita venivano trasferiti sulle foglie di piante di *Solanum melongena* L. allevate in serra. Gli insetti venivano confinati all'interno di clip cages da me costruite per consentire il conteggio successivo al trattamento e per evitare perdite di insetti a causa del trattamento stesso (fig3.1).



Figura 3.1. Clip cages con afidi su piante di melanzana.

Questa modalità di condurre la ricerca si è rivelata particolarmente problematica. In primo luogo la melanzana ha un ritmo di crescita molto lento e per ottenere piante idonee ad essere infestate erano necessari oltre due mesi di tempo. Inoltre l'utilizzo delle clip cages limitava la penetrazione del trattamento all'interno delle stesse dove erano presenti gli afidi. Questo rappresentava un problema non trascurabile dovendo saggiare prodotti che agiscono per contatto. Visti i risultati e gli ostacoli incontrati in questa prima fase sperimentale si è deciso, in accordo

con il coordinatore, di trovare una valida alternativa all'uso delle piante di melanzana. La strategia alternativa è stata individuata al mio rientro da un periodo di quattro mesi di studio all'estero presso l'Università di Malta utilizzando le piante di *Pisum sativum* L.

3.2.1 Allevamento di *Myzus persicae* Sulzer su *Pisum sativum* L.

Le piante di pisello, coltivate in due camere di crescita del Dipartimento di Scienze Agrarie dell'Università di Bologna, sono state quindi utilizzate sia per l'allevamento dell'afide verde del pesco sia per ottenere piantine da infestare su cui effettuare i trattamenti.

L'allevamento (**fig3.2**) è stato realizzato in ambiente controllato alla temperatura di 20°C, con una umidità relativa del 50-70% e con un fotoperiodo L:D=16:8.



Figura 3.2. Camera di crescita con contenitori per allevamento dell'afide verde.

Per l'allevamento sono stati utilizzati:

-agriperlite con funzione di substrato

-vaschette di plastica trasparente: altezza 6,5 cm, lunghezza 18,5 cm e larghezza 11,5 cm

-contenitore delle vaschette: altezza 13,5 cm, lunghezza 34,5 cm e larghezza 22 cm

- coperchio del contenitore con rete anti-insetto
- barattolo di vetro con capacità di 600 ml
- cilindro grande in plastica trasparente: altezza 8 cm e diametro di 10cm
- cilindro piccolo in plastica trasparente: altezza 4 cm e diametro 3,2 cm
- semi di *Pisum sativum* L.
- forbici
- pinzetta entomologica

Per ottenere le piante di pisello da infestare con l'afide verde sono state riempite le vaschette di plastica trasparente di agriperlite (un cilindro grande pieno di agriperlite per vaschetta). Sull'agriperlite sono stati distribuiti i semi di pisello (un cilindro piccolo pieno di semi per vaschetta). I semi poi sono stati ricoperti da un piccolo strato di agriperlite (un cilindro grande pieno di agriperlite per tre vaschette). Queste tre vaschette sono state collocate all'interno del contenitore grande, dove, usando il barattolo di vetro, è stata aggiunta l'acqua (600ml). Questa quantità d'acqua era sufficiente per garantire la germinazione e la sopravvivenza delle piantine. A questo punto il contenitore è stato chiuso con il coperchio retato e collocato nella camera di crescita. Dopo quattro giorni, quando i germogli erano appena sviluppati, si è proceduto all'infestazione. Allo scopo sono state prelevate alcune piantine infestate da un allevamento precedente tagliandole alla base e sono state depositate nelle vaschette con i nuovi germogli di pisello. Gli afidi sono migrati sulle nuove piantine dove si sono nutriti e riprodotti. Dopo tre giorni dal trasferimento l'infestazione delle piantine era compiuta(**fig3.3**).



Figura 3.3. Allevamento di *Myzus persicae* su pisello.

Le operazioni sono state ripetute ogni settimana con le modalità sopra descritte per avere sempre afidi a disposizione per infestare le piantine di pisello utilizzate per valutare l'efficacia degli oli essenziali.

Le piantine di pisello da infestare (**fig.3.4**) su cui poi eseguire i trattamenti sono state coltivate nell'altra camera di crescita con i seguenti parametri fisici:

- temperatura di 25°C
- umidità relativa del 50-70%
- fotoperiodo L:D=16:8



Figura 3.4. Pianta di pisello isolata dal substrato.

Per eseguire ogni singola prova sperimentale 150 semi di *P. sativum* sono stati piantati in 75 vasi (quindici in più del necessario) alti 7 cm e con base quadrata di 6 cm di lato, riempiti di agriperlite. I vasi poi sono stati collocati in 5 contenitori grandi in plastica

trasparente la cui dimensione sono riportate sopra. In ogni contenitore sono stati versati 1,2 l di acqua sufficienti a soddisfare le esigenze delle piantine per l'intera durata della prova.

3.2.2 Principi attivi e oli essenziali utilizzati

E' stata valutata l'efficacia insetticida di quattro principi attivi normalmente presenti in numerosi oli essenziali - Limonene , Eucaliptolo (1,8-Cineolo), Myrcene e Canfora (Camphor) - e di otto oli essenziali in cui questi principi attivi sono presenti in elevata concentrazione. L'olio essenziale di Artemisia è stato ricavato da *Artemisia vulgaris* L., una pianta della famiglia delle Asteraceae. L'olio essenziale di Canfora è stato ricavato da *Cinnamomum canphora* (L.) J. Presl., una pianta della famiglia delle Laureaceae. L'olio essenziale di Limone è stato ricavato dagli esocarpi dei frutti di *Citrus limon* (L.) Burm. f. , una pianta della famiglia delle Rutaceae. L'olio essenziale di Eucalipto è stato ricavato da *Eucalyptus globulus* Labill., una pianta della famiglia delle Mirtaceae. L'olio essenziale di Cajeput è stato ricavato dalla *Melaleuca cajuputi* Powell, una pianta della famiglia delle Mirtaceae. L'olio essenziale di Rosmarino è stato ricavato da *Rosmarinus officinalis* L., una pianta della famiglia delle Lamiaceae. La composizione di questi oli essenziali è stata determinata grazie al contributo della Prof.ssa Stefania Benvenuti del Dipartimento di Scienze della Vita dell'Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia che ha eseguito le analisi gascromatografiche (**tab.3.1.**).

Tabella 3.1. Composizione chimica degli oli essenziali%.

Composti	LRI	Artemisia OE	Canfora OE	Limone OE	Eucalipto OE	Cajeput OE	Rosmarino OE
α -Thujene	926	0.06		0.36			0.11
α -pinene	933	0.13	5.44	1.91	4.23	1.84	23.17
camphene	947	2.41	0.08	0.07			9.44
sabinene	973	1.58	2.76	1.92		0.23	
β -pinene	975	0.10		12.11	0.48	0.31	5.09
myrcene	992		0.93	1.51	0.67	0.64	0.88
α -phellandrene	1004		0.52		0.40	0.34	0.09
α -terpinene	1016		0.10	0.14		0.74	
ρ -cymene	1025	0.96	7.30	1.03	5.05	5.35	3.04
limonene	1032	0.47		68.42			
1,8-cineolo	1033		44.67		87.82	73.31	21.45
<i>Cis</i> -ocimene	1038			0.06			
<i>Trans</i> -ocimene	1048		0.36	0.10			
γ -terpinene	1059	0.20	23.26	7.55	1.15	1.53	
terpinolene	1088		3.13	0.32		0.24	0.07
<i>Trans</i> -sabinene hydrate	1100		1.40				
linalool	1101			0.11		1.94	0.99
α -thujone	1110	64.81					
β -thujone	1118	9.98					
<i>Trans</i> -pinocarveol	1139	0.41					
camphor	1147	14.27	0.12				23.85
borneol	1167	0.53	0.23				2.97
Terpinen-4-ol	1178	0.57	3.40			3.07	0.05
α -terpineol	1191		2.70	0.18	0.14	6.13	2.45
myrtenal	1195	0.44					
<i>Cis</i> -carveol	1230	0.07					
neral	1245			0.77			
geranial	1275			1.40			
Bornyl acetate	1289						1.47
carvacrol	1299						0.34
Neryl acetate	1368			0.31			
Geranyl acetate	1386			0.20			
β -caryophyllene	1425			0.17		0.54	0.63
<i>Trans</i> - α -bergamotene	1440			0.34			
α -humulene	1460						0.11
Caryophyllene oxide	1593						0.59
TOTALE		96.98	96.41	98.98	99.93	96.22	96.81

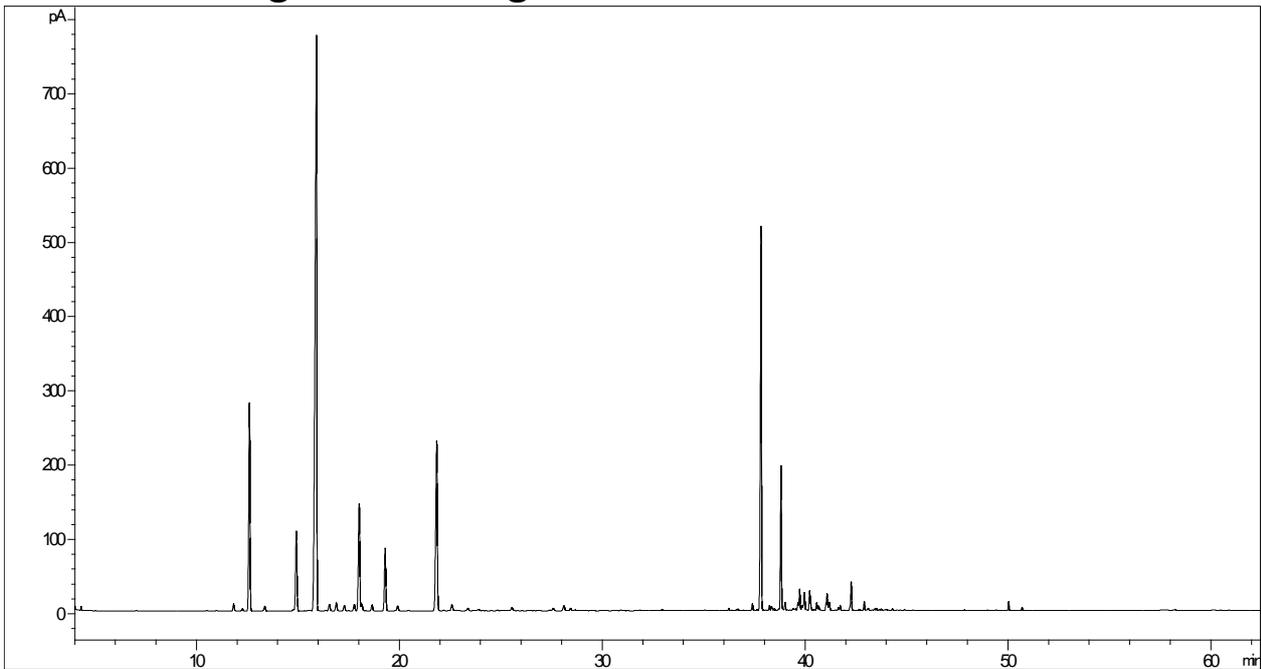
La prof.ssa Stefania Benvenuti, inoltre, ha eseguito anche le analisi che hanno consentito di determinare la composizione chimica degli oli essenziali delle varietà Carmagnola e Felina di *Canapa sativa* L. (tab.3.2).

Tabella 3.2. Composizione chimica degli oli essenziali delle varietà di *Canapa sativa* Carmagnola e Felina.

Composti	LRI	Carmagnola%	Feline%
α -thujene	925	0.10	0.14
α -pinene	932	9.16	19.21
camphene	946	0.21	0.31
β -pinene	974	3.84	6.44
myrcene	992	35.36	31.13
α -phellandrene	1004	0.32	0.46
3-carene	1009	0.38	0.52
α -terpinene	1015	0.27	0.35
Limonene	1027	5.58	2.28
1,8 cineolo	1029	0.31	0.28
<i>Cis</i> -ocimene	1037	0.30	1.07
<i>Trans</i> -ocimene	1047	3.09	7.65
γ -terpinene	1057	0.23	0.32
terpinolene	1087	9.84	12.20
linalool	1099	0.32	0.29
Fenchol	1112	0.15	
Terpinen-4-ol	1177	0.13	0.21
α -terpineol	1190	0.12	
β -caryophyllene	1425	16.07	8.46
α -bergamotene	1440	0.18	0.72
α -humulene	1460	5.41	3.30
alloromadendrene	1467	0.32	0.31
β -selinene	1492	0.78	0.42
α .selinene	1500	0.78	0.35
β -bisabolene	1510	0.93	0.22
γ -cadinene	1524	0.29	
Germacrene B	1566	0.11	
Caryophyllene oxide	1592	1.16	0.62
TOTALE		95.74	97.27

Di queste due varietà si fornisce anche il gascromatogramma(**fig.3.5**)

Cannabis essential oils phytochemical analysis
Gaschromatogram Carmagnola cultivar EO



Gaschromatogram Felina cultivar EO

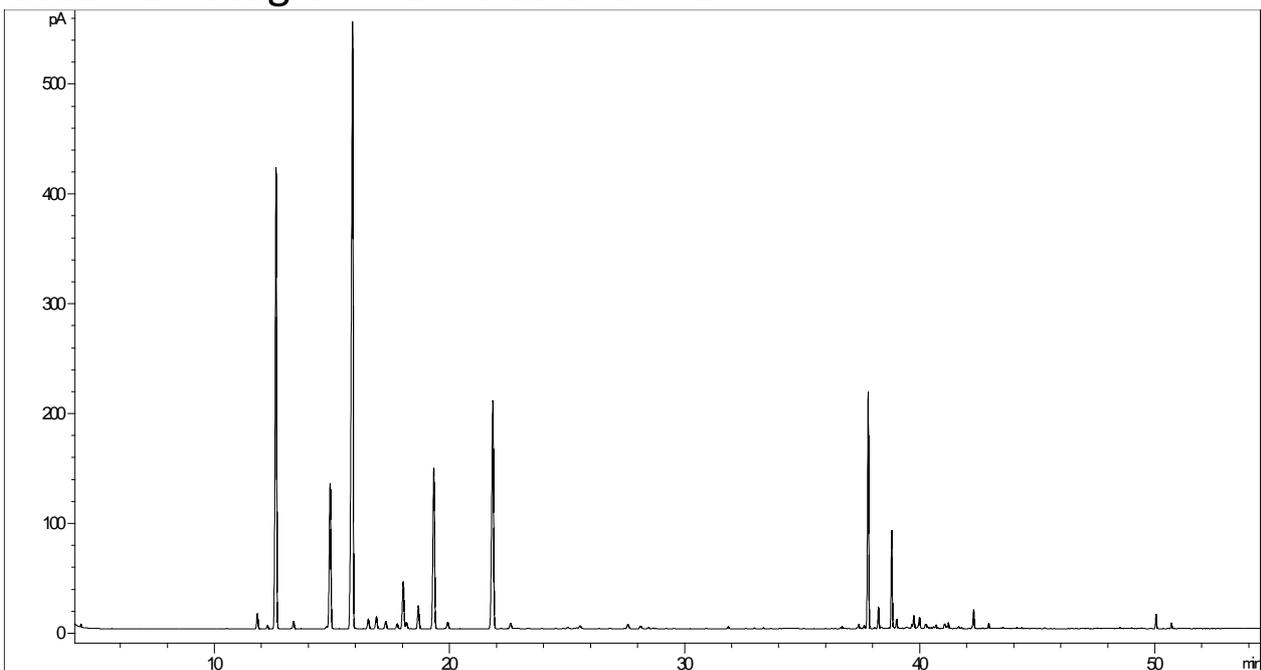


Figura 3.5. Analisi fitochimica degli oli essenziali di Canapa sativa.

3.3 Emulsionanti ed insetticidi di sintesi utilizzati

I singoli principi attivi, ad esclusione della Canfora, e gli oli essenziali sono stati miscelati con emulsionanti non ionici per poter essere dispersi in acqua prima del trattamento. L'emulsionante utilizzato in undici prove è stato il Tween 20 (polyoxyethylene sorbitan monolaureate-E432). In una sola prova sono stati utilizzati altri emulsionanti come il Ricinoleato e L'Emulan. La scelta del Tween 20 è dovuta alla sua bassa tossicità acuta e cronica. Hopper *et al.* (1949) e Bartsch *et al.* (1976) hanno verificato che la dose letale (LD50) nel topo è superiore a 20g/kg di peso corporeo. Molti studi sulla tossicità subacuta e subcronica dimostrano che l'unico effetto sia la diarrea (EFSA,2015). Per quanto riguarda la genotossicità tutti gli studi hanno dato un responso negativo ad eccezione di quello condotto da Odunola *et al.*(1998) sui batteri. Infine per quanto riguarda la tossicità cronica e la carcinogenicità numerosi studi dimostrano che i polysorbati non sono carcinogeni quando sono applicati sulla pelle (EFSA, 2015) Gli emulsionanti sono stati utilizzati sempre in dose doppia rispetto a quella dei principi attivi e degli oli essenziali. In una prova è stato utilizzato come controllo chimico l'insetticida neonicotinoide Imidacloprid (f. c. Confidor 200 SL) alla dose indicata in etichetta.

3.4 Metodi

Dopo aver valutato i tempi di crescita delle piantine nella camera di crescita si è deciso di procedere alla semina dei piselli il lunedì per ottenere piante da infestare sufficientemente sviluppate il

sabato seguente. Il sabato mattina si procedeva alla selezione delle piante ottenute, eliminando la meno adatta da ogni vaso e all'isolamento delle stesse dal substrato di agriperlite mediante un foglio bianco di carta fissato al vaso con nastro adesivo. Questa operazione era necessaria per evitare la caduta degli afidi nel substrato che avrebbe reso impossibile il conteggio (**fig.3.4**).

A questo punto utilizzando gli afidi allevati nell'altra camera di crescita si procedeva all'infestazione delle singole piantine collocando con un pennello entomologico un afide adulto su ognuna di esse. A distanza di circa 48 ore dall'infestazione, l'adulto, che aveva avuto tempo sufficiente per riprodursi, veniva rimosso da ogni singola piantina e si procedeva al conteggio delle neanidi presenti su ognuna di esse (**fig3.6**). Terminato il conteggio e la numerazione delle singole piante si dava inizio ai trattamenti.



Figura.3.6. Neanidi di afide verde del pesco su foglia di pisello.

Questi sono stati effettuati utilizzando gli oli essenziali e alcuni loro principi attivi a concentrazioni differenti sia singolarmente che in combinazione tra loro. La preparazione delle miscele insetticide veniva realizzata la mattina stessa dell'intervento aggiungendo agli oli essenziali o ai singoli principi attivi una dose doppia di tensioattivo non ionico come il Tween 20, e in una prova l'Emulan e il Ricinoleato. Le diverse miscele venivano disperse in acqua e poste in flaconi di polietilene di 100ml dotati di un erogatore orientabile dal dosaggio medio di 0.140ml(**fig.3.7**). Solo la prova con la Canfora non ha richiesto l'uso degli emulsionanti. La Canfora, la cui solubilità in acqua è di circa 1g/L, è stata utilizzata a concentrazioni che vanno dallo 0.01% allo 0.1%.



Figura.3.7. Contenitore ed erogatore per i trattamenti.

Le singole piante venivano trattate con cinque erogazioni, una dall'alto e quattro facendo ruotare il vaso di 90°, in modo da ottenere una uniforme bagnatura.

Ogni singolo esperimento è stato svolto utilizzando 60 piantine infestate, divise in tre blocchi da 20 piante controllate rispettivamente a 24, 48 e 72 ore dal trattamento. Ogni blocco era costituito da 5 tesi con 4 piante per tesi. Le 4 piante delle differenti tesi di ogni singolo blocco sono state poste in 5 vaschette diverse e collocate in ambiente controllato (**fig.3.8**)

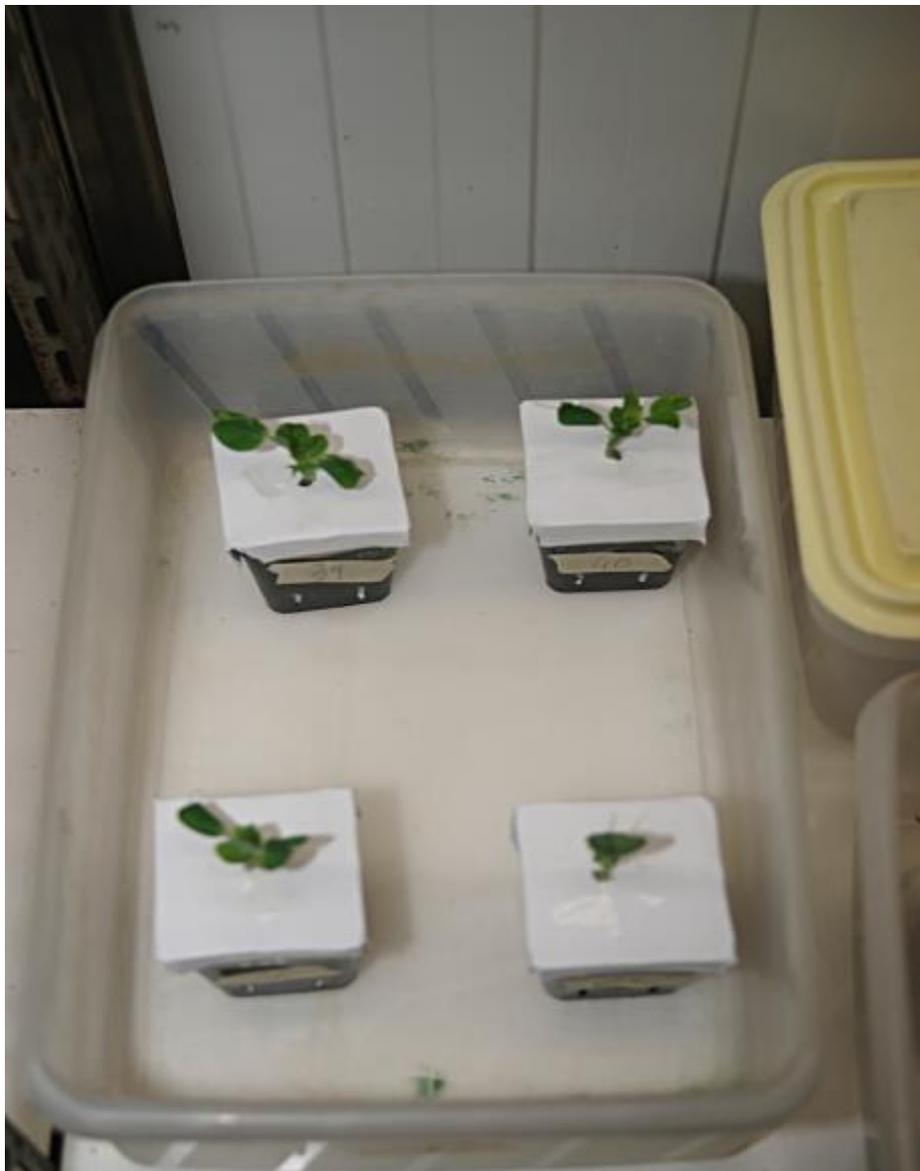


Figura 3.8. Piante infestate per ogni tesi.

Tabella 3.3. Prove effettuate.

Prova	Tesi 1	Tesi 2	Tesi 3	Tesi 4	Tesi 5
1	Controllo Acqua deionizzata	Tween 20%	Limonene1%+ Tween2%	Limonene5%+ Tween10%	Limonene10%+ Tween20%
2		Tween 10%	Mircene0.5%+ Tween1%	Mircene1%+ Tween2%	Mircene5%+ Tween10%
3	Tween 10%	Eucaliptolo0.1%+ Tween0.2%	Eucaliptolo0.5+ Tween1%	Eucaliptolo1%+ Tween2%	Eucaliptolo5%+ Tween10%
4	Limonene1%+Mircene1%+Tween2%	Limonene1%+Eucaliptolo 1%+ Tween2%	Eucaliptolo1%+Mircene 1%+Tween2%	Lim1%+Mir1%+Euc1%+Tween6%	Lim2%+Mir2%+Euc2%+Tween12%
5	Controllo Acqua deionizzata	Lim1%+Mir1%+Euc1%+ Tween6%	Lim2%+Mir2%+Euc2%+ Tween12%	Lim1%+Mir1%+Euc1%+Canfora+Tween6%	Lim2%+Mir2%+Euc2%+Canfora+Tween12%
6	Canfora 0.01%	Canfora 0.025%	Canfora 0.05%	Canfora 0.075%	Canfora 0.1%
7	Emulan 10%	Ricinoleato 10%	Limonene5%+ Ricinoleato10%	Eucaliptolo5%+ Ricinoleato10%	Mircene5%+ Ricinoleato10%
8	Controllo Confidor (Imidacloprid)	Limone OE1%+Tween2%	Limone OE2%+Tween4%	Eucalyptus G.1%+Tween2%	Eucalyptus G.2%+Tween4%
9	Controllo Tween4%	Rosmarino OE1%+Tween2%	Rosmarino OE2%+Tween4%	Cajeput oil1%+Tween2%	Cajeput oil2%+Tween4%
10	Controllo Tween4%	Artemisia 1%+Tween2%	Artemisia2%+Tween4%	CanforaOE1%+Tween2%	CanforaOE2%+Tween4%
11	Controllo Tween4%	Canapa Felina1%+Tween2%	Canapa Felina2%+Tween4%	Canapa Carmagnola 1%+Tween2%	Canapa Carmagnola 2%+Tween4%
12	Controllo Acqua deionizzata	1%(Lim.Mir,euc)+ Tween6%	2%(Lim,Mir,Euc)+ Tween12%	1%(Limone,Rosmarino Artemisia)+Tween6%	1%(Limone,Eucalipto,Artemisia)+ Tween6%

3.5 Analisi statistica

Per ciascun intervallo di esposizione (tempo di contatto) le percentuali di mortalità osservate nei diversi trattamenti sono state trasformate angolarmente e analizzate tramite ANOVA. In caso di differenze significative rilevate dall'ANOVA è stato utilizzato il test HSD di Tukey per i confronti multipli tra i trattamenti.

Qualora anche a seguito della trasformazione angolare permanessero deviazioni dalla normalità o eteroscedasticità, le percentuali di mortalità sono state analizzate con test non parametrico di Kruskal-Wallis seguito, in caso di differenze statisticamente significative, da test di Dunn per i confronti multipli.

Tutte le analisi sono state eseguite con il software Statistica 6 (Statsoft Inc.) fissando il livello di significatività allo 0,05%.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Risultati

La mortalità degli afidi nelle diverse prove è stata determinata conteggiando gli insetti morti rispetto al totale a 24, 48 e 72 ore dal trattamento.

I prova: Limonene

Nella tabella (**tab.4.1.1**) sono riportate le percentuali medie di mortalità riscontrate nelle cinque tesi.

Tabella 4.1.1. Mortalità media di tre emulsioni a diversa concentrazione di Limonene.

Tesi	Trattamento	%Mortalità a 24h	%Mortalità a 48h	%Mortalità a 72h	Media
1	Controllo Acqua deionizzata	5.7 a	20.6	16.1	14.1
2	Controllo Emulsionante Tween 20%	47.4 bc	80.0	58.3	61.9
3	Limonene1%+Tween2%	30.0 b	27.0	17.6	24.9
4	Limonene5%+Tween10%	82.9 d	40.6	50.0	57.8
5	Limonene10%+Tween20%	66.7 cd	57.7	77.5	67.3

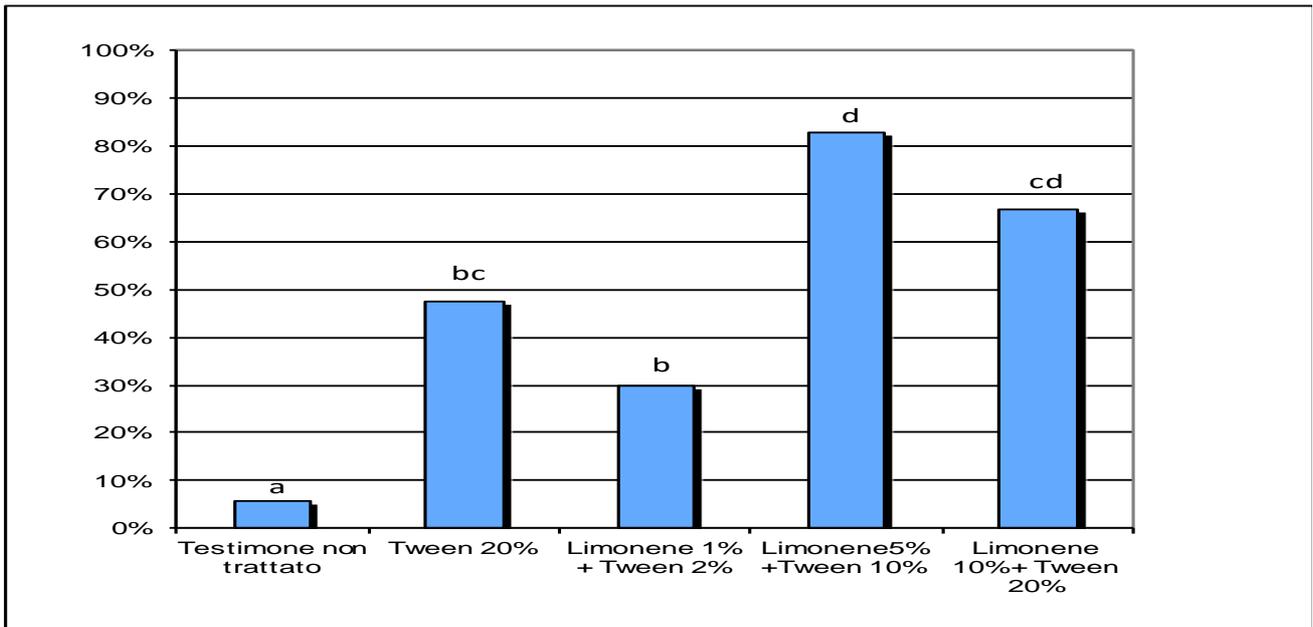


Figura 4.1.1. Mortalità a 24 h dal trattamento di tre emulsioni a diversa concentrazione di Limonene. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative, ANOVA ($F_{4,15}=37,81$; $p<0,0001$) seguita da test HSD di Tukey per i confronti multipli ($p<0,05$).

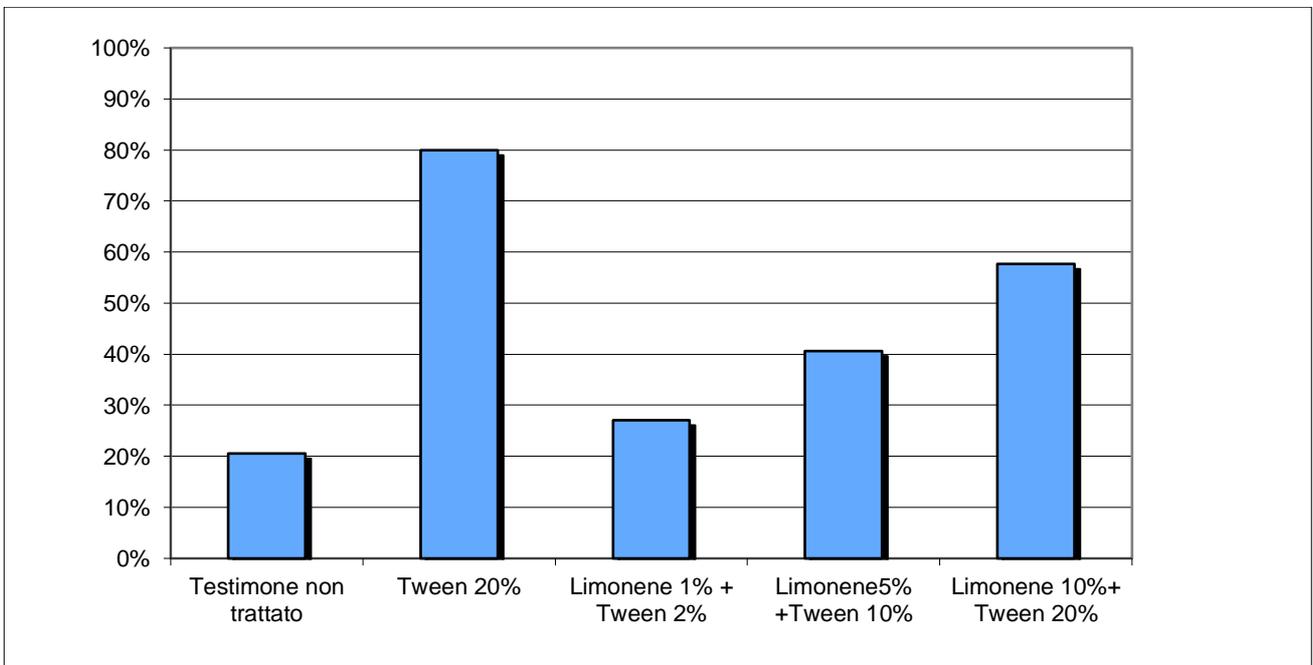


Figura 4.1.2. Mortalità a 48 h dal trattamento di tre emulsioni a diversa concentrazione di Limonene. L'ANOVA ($F_{4,15}=1,08$; $p<0,400$) non ha rilevato differenze statisticamente significativi tra i trattamenti.

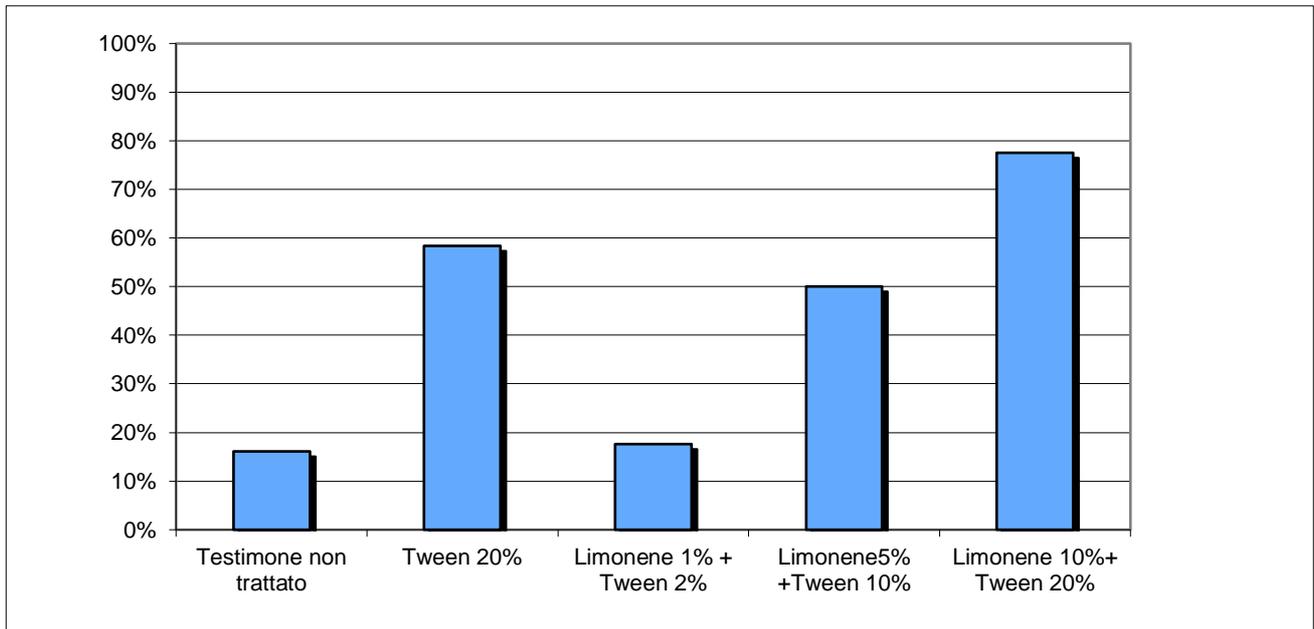


Figura 4.1.3. Mortalità a 72 h dal trattamento di tre emulsioni a diversa concentrazione di Limonene. Il test HSD di Tukey, eseguito dopo l'ANOVA ($F_{4,15}=3,08$; $p=0,049$) non ha rilevato differenze significative ($p<0,05$).

La bassa mortalità (5.7%) riscontrata nel testimone a 24 ore dal trattamento è statisticamente significativa rispetto a tutte le altre tesi. La più alta mortalità osservata nella tesi 4 (Limonene 5% + Tween 10%) risulta statisticamente significativa rispetto alle tesi 1 (Testimone trattato con acqua deionizzata), 2 (Tween al 20%) e 3 (Limonene 1% + Tween 2%). A 48h e a 72h dal trattamento, però, i dati relativi alla mortalità non sono statisticamente significativi. È interessante notare come la mortalità media delle tesi 2 (Tween 20%) e 5 (Limonene 10% + Tween al 20%) abbia valori molto simili.

Il prova: Myrcene

Nella tabella (**tab.4.1.2**) sono riportate le percentuali medie di mortalità riscontrate nelle quattro tesi.

Tabella 4.1.2. Mortalità media di tre emulsioni a diversa concentrazione di Myrcene.

Tesi	Trattamento	%Mortalità a 24h	%Mortalità a 48h	%Mortalità a 72h	Media
1	Testimone Tween 10%	52.1 a	58.6	83.7 b	64.8
2	Mircene 0.5%+Tween 1%	4.4 b	6.3	10.0 a	6.9
3	Mircene 1%+Tween 2%	21.9 ab	15.0	35.7 ab	24.2
4	Mircene 5%+Tween 10%	48.8 a	56.9	58.5 b	54.7

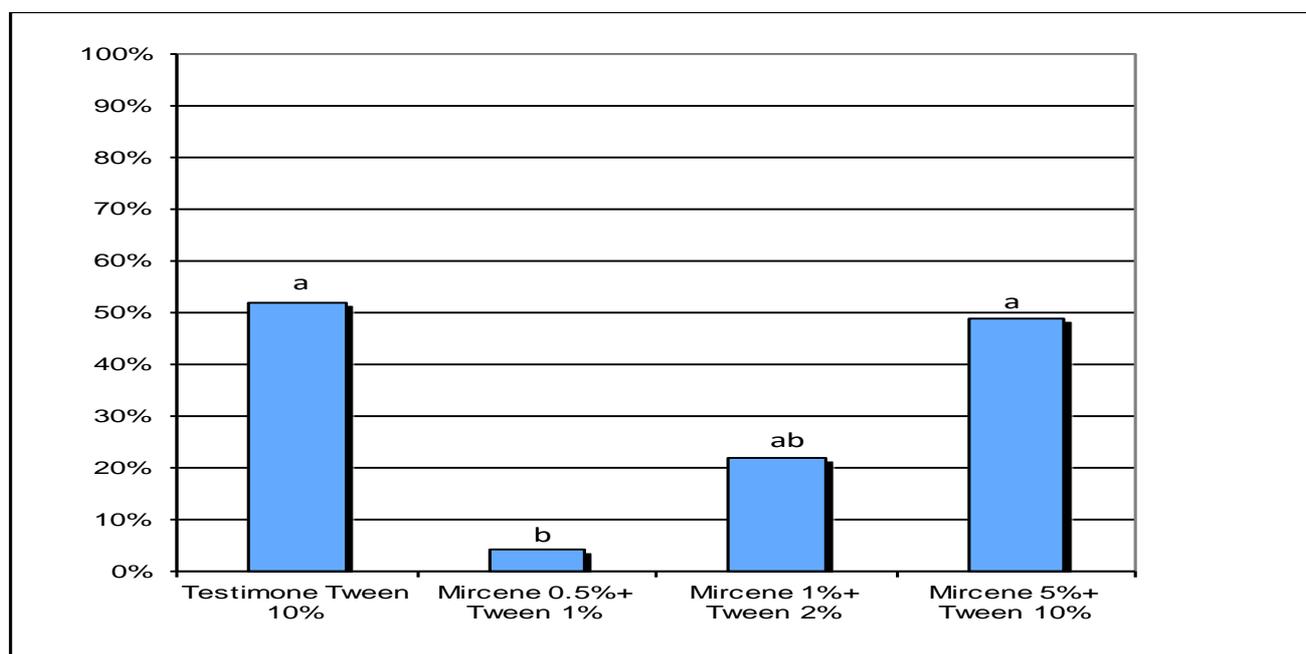


Figura 4.1.4. Mortalità a 24 h dal trattamento di tre emulsioni a diversa concentrazione di Myrcene. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative, ANOVA ($F_{3,12}=8,61$; $p=0,0026$) seguita da test HSD di Tukey per i confronti multipli ($p<0,05$).

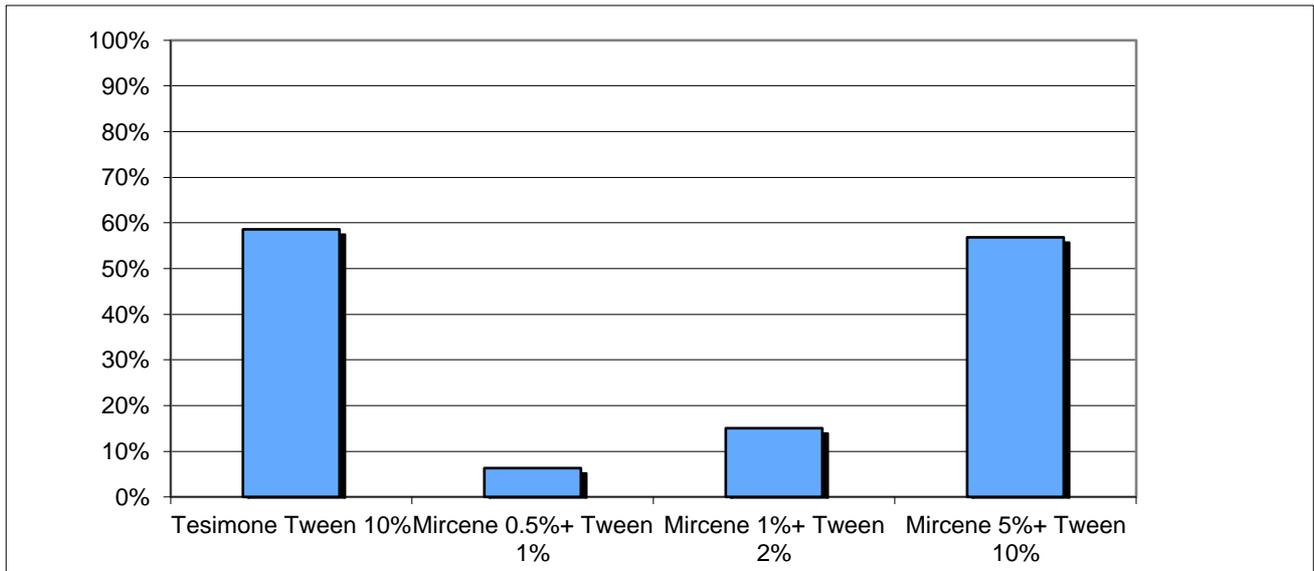


Figura 4.1.5. Mortalità a 48 h dal trattamento di tre emulsioni a diversa concentrazione di Myrcene. Il test di Dunn eseguito dopo il test non parametrico di Kruskal-Wallis ($H_{3,16}=10,92$; $p<0,012$) non ha riscontrato differenze significative tra i trattamenti.

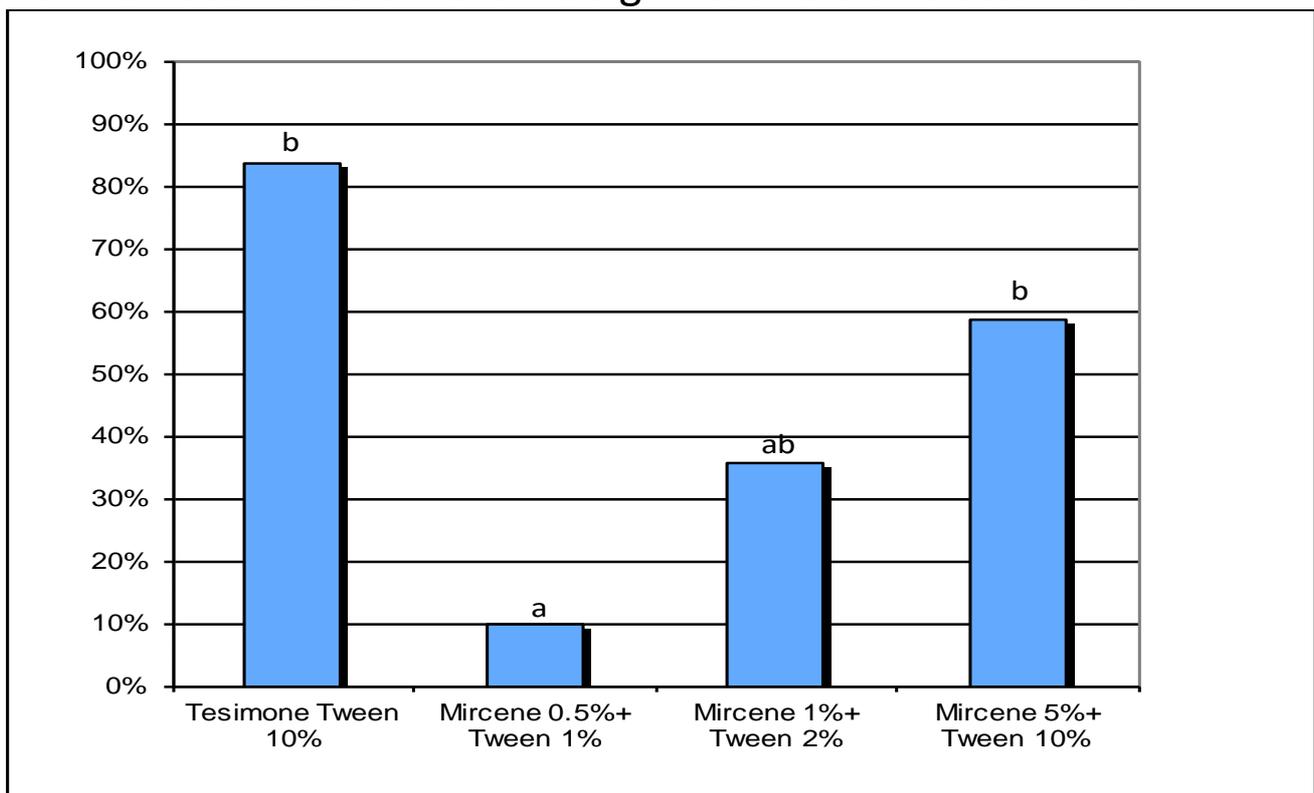


Figura 4.1.6. Mortalità a 72 h dal trattamento di tre emulsioni a diversa concentrazione di Myrcene. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative, ANOVA ($F_{3,15}=8,57$; $p=0,0015$) seguita da test HSD di Tukey per i confronti multipli ($p<0,05$).

La bassa mortalità a 24 ore dal trattamento riscontrata nella tesi 2 (Myrcene 0.5%+ Tween1%) è statisticamente significativa rispetto alle tesi 1 (Tween10%) e 4 (Myrcene 5%+ Tween10%). Il trattamento con Myrcene all'1% della tesi 3 non è statisticamente significativa sia rispetto alla tesi 2 che alle tesi 1 e 4. A 48 ore dal trattamento non si riscontra alcuna significatività mentre a 72 ore si conferma la stessa significatività riscontrata a 24 ore dal trattamento.

III prova: Eucaliptolo

Nella tabella (**tab.4.1.3**) sono riportate le percentuali medie di mortalità riscontrate nelle cinque tesi.

Tabella 4.1.3. Mortalità media di quattro emulsioni a diversa concentrazione di Eucaliptolo.

Tesi	Trattamento	%Mortalità a 24h	%Mortalità a 48h	%Mortalità a 72h	Media
1	Controllo Tween10%	43.8	65.8	72.0 a	60.5
2	Eucaliptolo0.1%+Tween0.2%	0.0	0.0	5.9 b	2.0
3	Eucaliptolo0.5%+Tween1%	1.9	12.1	2.6 b	5.5
4	Eucaliptolo1%+Tween2%	0.0	0.0	13.3 b	4.4
5	Eucaliptolo5%+Tween10%	7.8	18.4	4.2 b	10.1

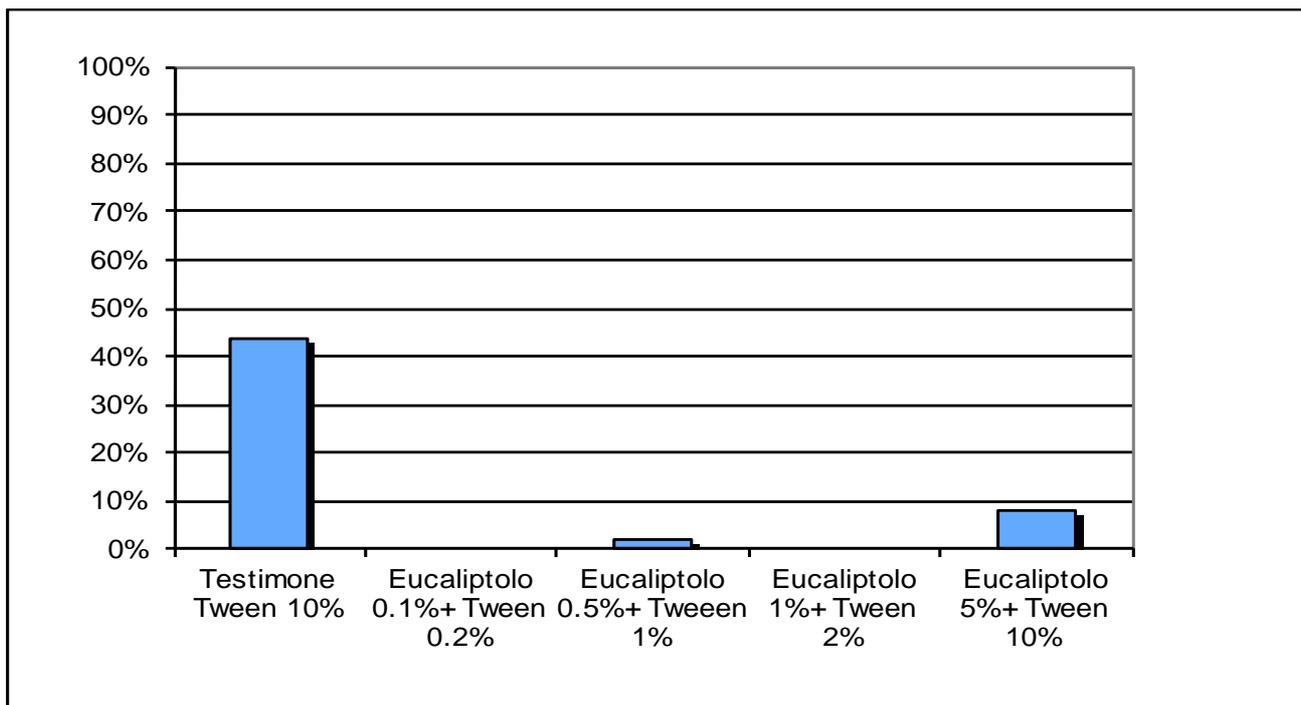


Figura 4.1.7. La mortalità a 24 ore dal trattamento di quattro emulsioni a diversa concentrazione di Eucaliptolo è estremamente ridotta e non è possibile eseguire alcuna analisi statistica.

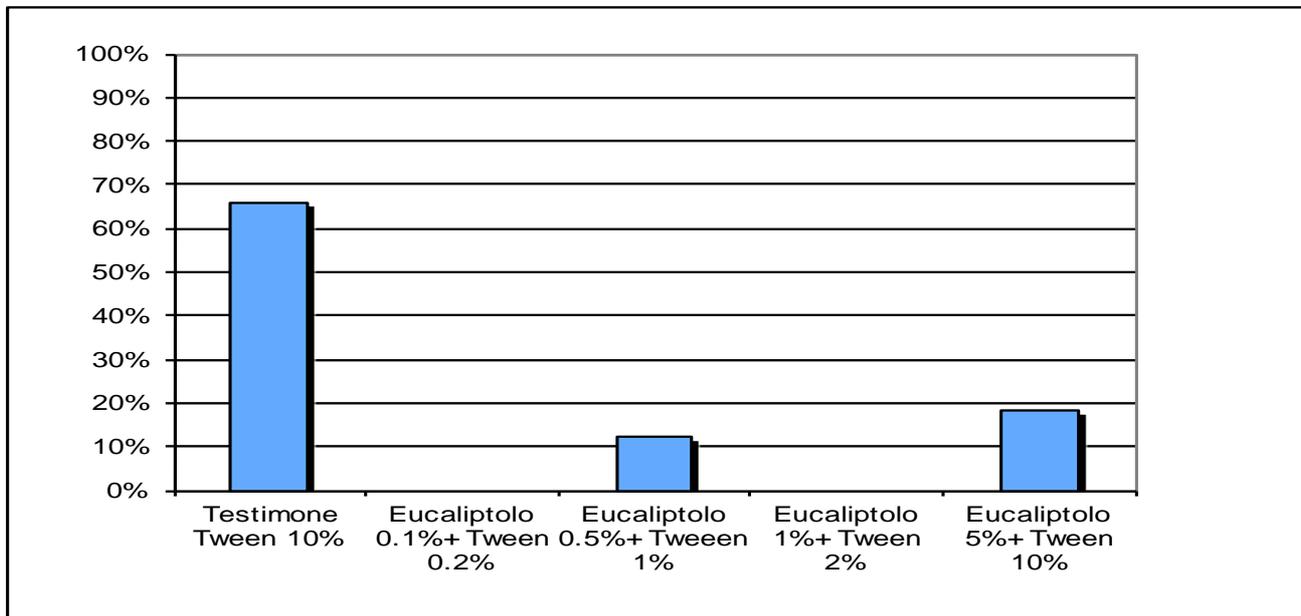


Figura 4.1.8. Mortalità a 48 h dal trattamento di quattro emulsioni a diversa concentrazione di Eucaliptolo. L'ANOVA ($F_{2,9}=1,15$; $p<0,360$) non ha rilevato differenze statisticamente significativi tra i trattamenti.

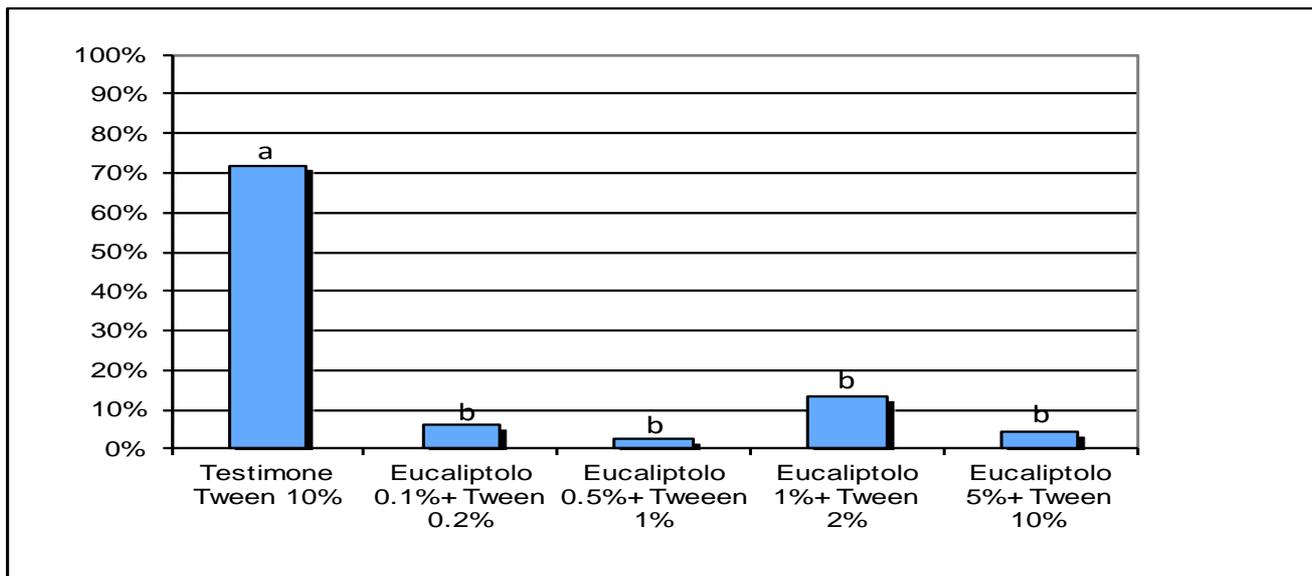


Figura 4.1.9. Mortalità a 24 h dal trattamento di quattro emulsioni a diversa concentrazione dell'Eucaliptolo. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative, ANOVA ($F_{4,15}=11,93$; $p<0,0002$) seguita da test HSD di Tukey per i confronti multipli ($p<0,05$).

In questa prova la mortalità nel controllo è molto più elevata rispetto alle tesi trattate con dosi diverse di Eucaliptolo. Tale mortalità diventa statisticamente significativa a 72 ore dal trattamento. E' interessante notare come la mortalità nella tesi 1 (Tween 10%) sia sempre maggiore di quella della tesi 5 (Eucaliptolo5%+ Tween10%) sia a 24 ore che a 48 e 72 ore dal trattamento.

IV prova: Miscela di principi attivi

Nella tabella (**tab.4.1.4**) sono riportate le percentuali medie di mortalità riscontrate nelle cinque tesi.

Tabella 4.1.4 Mortalità media di cinque differenti emulsioni di principi attivi.

Tesi	Trattamento	%Mortalità a 24h	%Mortalità a 48h	%Mortalità a 72h	Media
1	Limone1%+Mircene1%+Tween2%	16.7	31.3	41.2	29.7
2	Limone1%+Eucaliptolo%+Tween2%	16.7	36.8	38.1	30.5
3	Eucaliptolo1%+Mircene1%+Tween2%	0.0	0.0	44.4	14.8
4	Lim1%+Mir1%+Euc1%+Tween6%	26.7	69.6	66.7	54.3
5	Lim2%+Mir2%+euc2%+Tween12%	17.9	81.1	92.3	63.8

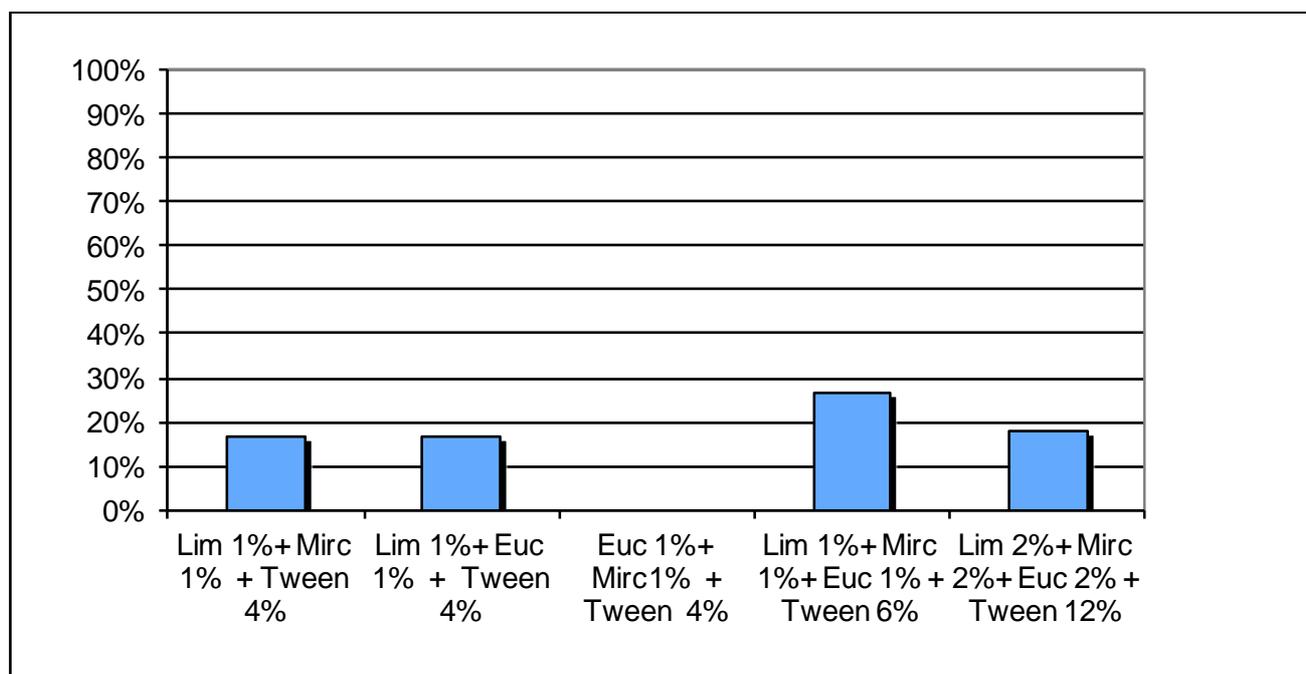


Figura 4.1.10. Mortalità a 24 h dal trattamento di cinque differenti emulsioni di principi attivi. L'ANOVA ($F_{3,12}=0,15$; $p<0,929$) non ha rilevato differenze statisticamente significative tra i trattamenti.

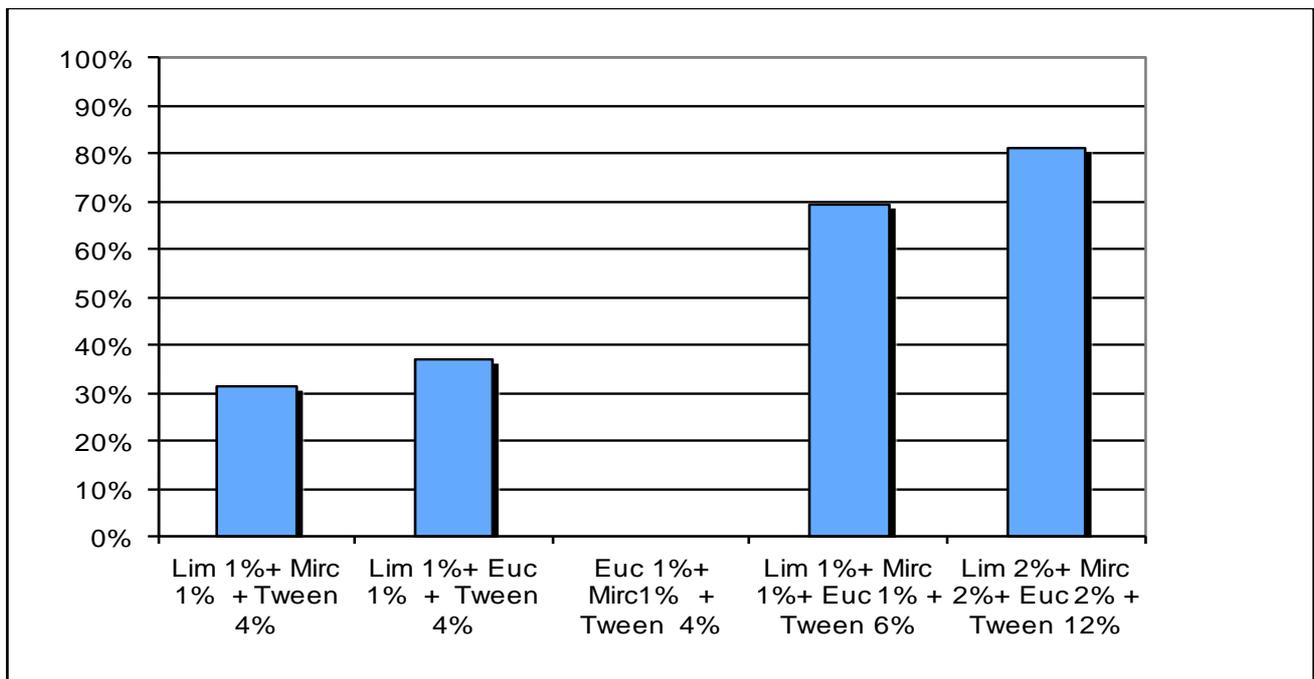


Figura 4.1.11. Mortalità a 48 h dal trattamento di cinque differenti emulsioni di principi attivi. Il test non parametrico di Kruskal-Wallis ($H_{3,16}=7,32$; $p=0,062$) non ha rilevato differenze statisticamente significative tra i trattamenti.

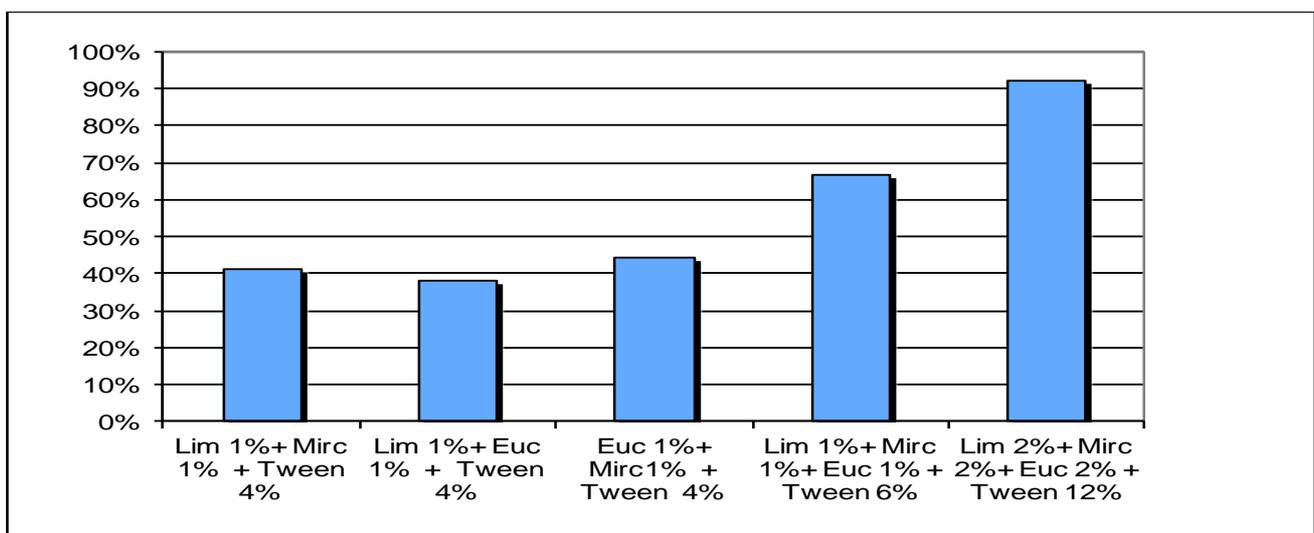


Figura 4.1.12. Mortalità a 72 h dal trattamento di cinque differenti emulsioni di principi attivi. L'ANOVA ($F_{4,15}=1,84$; $p=0,174$) non ha rilevato differenze statisticamente significative tra i trattamenti.

In questa prova non si riscontrano differenze significative tra le tesi a 24,48 e 72 ore dal trattamento. La mortalità delle tesi 4 e 5 però aumenta notevolmente a 48 e a 72 ore dal trattamento e raggiunge il 92.3% nella tesi trattata con la miscela al 2% dei singoli principi attivi.

V prova: Miscela di principi attivi con aggiunta di Canfora

Nella tabella (**tab.4.1.5**) sono riportate le percentuali medie di mortalità riscontrate nelle cinque tesi.

Tabella 4.1.5. Mortalità media di quattro differenti emulsioni di principi attivi e Canfora.

Tesi	Trattamento	%Mortalità a 24h	%Mortalità a 48h	%Mortalità a 72h	Media
1	Controllo Acqua deionizzata	0.0	0.0	0.0	0.0
2	Lim1%+Mirc1%+Euc1%+Tween6%	17.5	7.3 b	10.5	11.8
3	Lim2%+Mir2%+euc2%+Tween12%	19.3	17.6 b	28.3	21.7
4	3%(Lim+Mir+Euc)+Canfora+Tween6%	8.2	13.6 b	14.5	12.1
5	6%(Lim+Mir+Euc)+Canfora+Tween12%	30.0	54.0 a	36.8	40.3

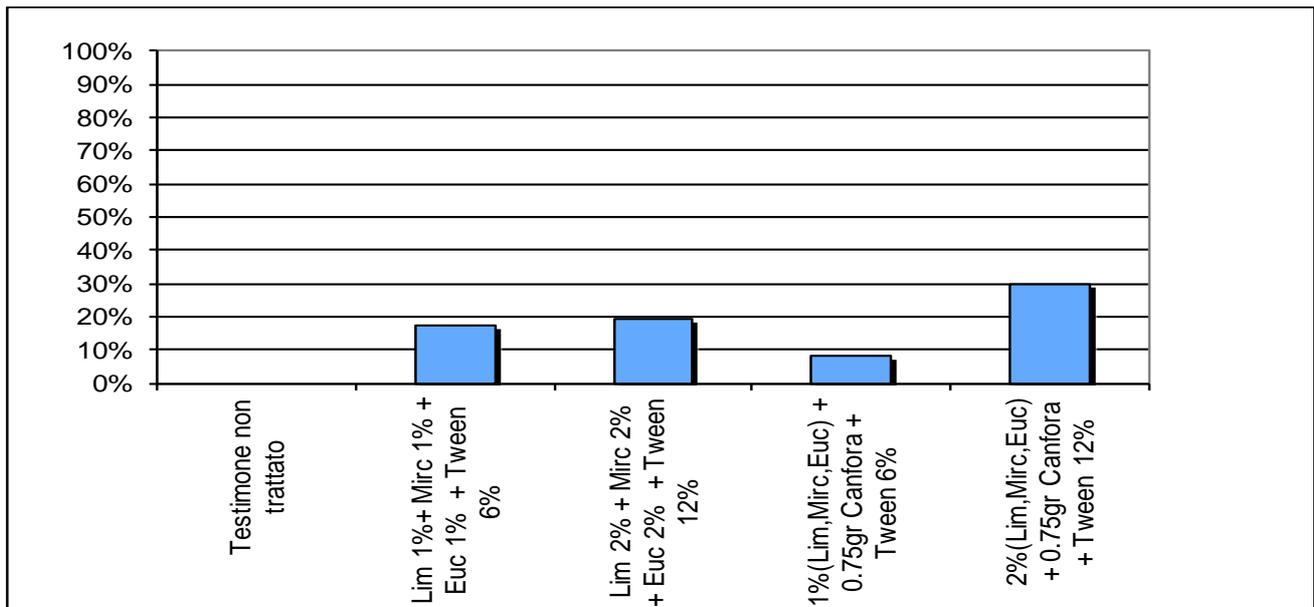


Figura 4.1.13. Mortalità a 24 h dal trattamento di quattro differenti emulsioni di principi attivi e Canfora. Il test non parametrico di Kruskal-Wallis ($H_{3,16}=1,79$; $p=0,617$) non ha rilevato differenze statisticamente significative tra i trattamenti.

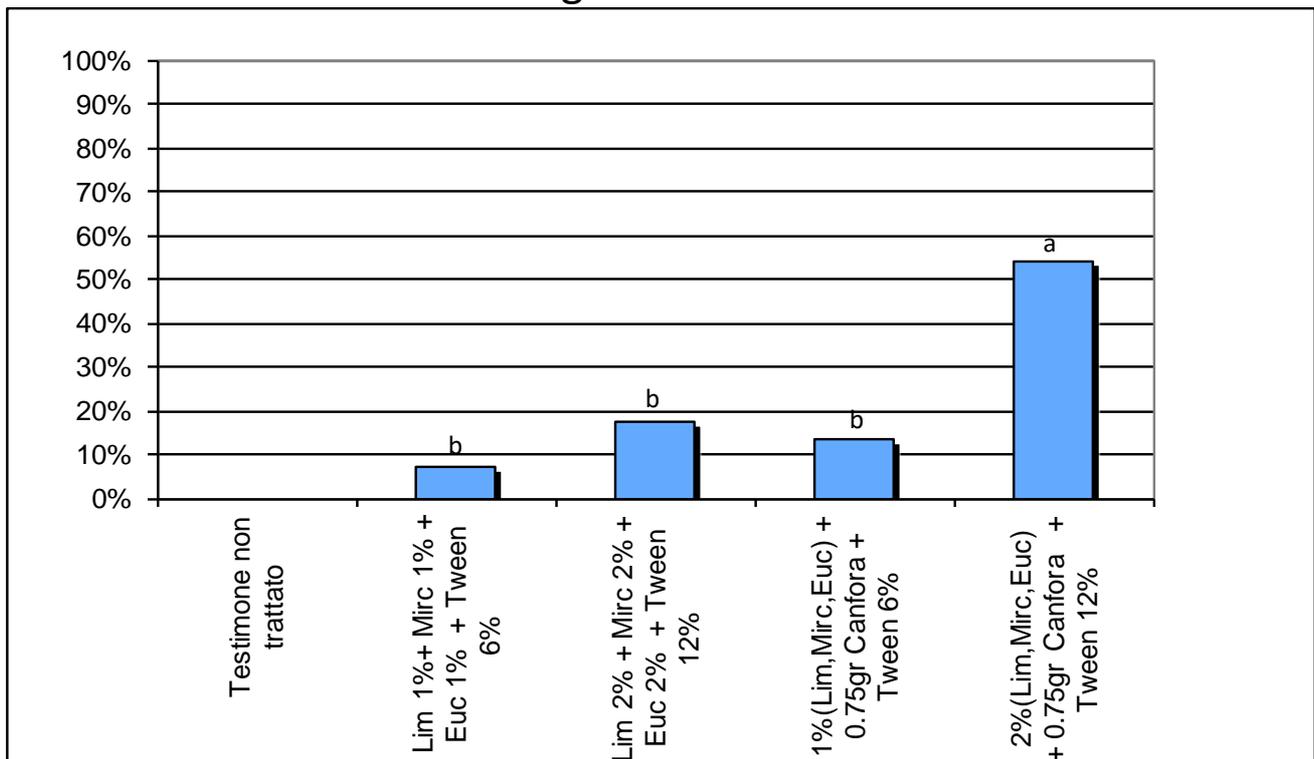


Figura 4.1.14. Mortalità a 48 h dal trattamento di quattro differenti emulsioni di principi attivi e Canfora. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative, ANOVA ($F_{3,12}=10,35$; $p=0,0012$) seguita da test HSD di Tukey per i confronti multipli ($p<0,05$).

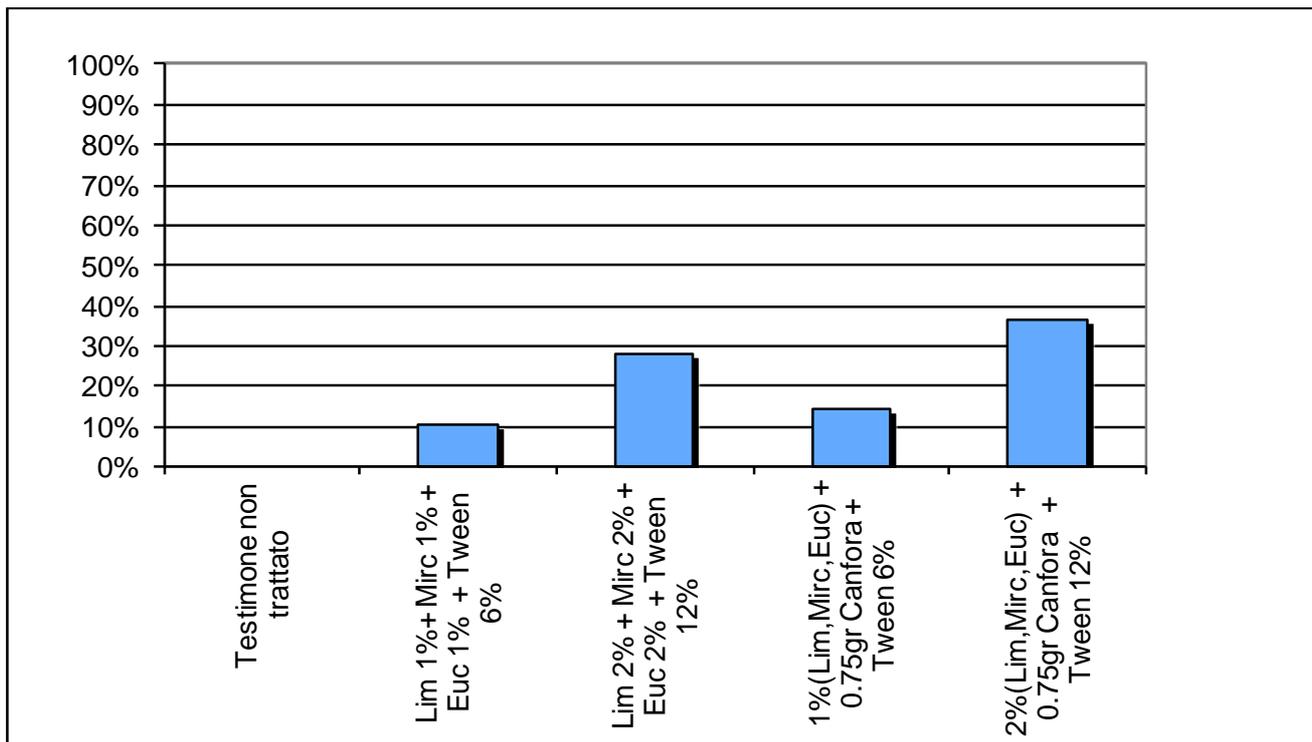


Figura 4.1.15. Mortalità a 72 h dal trattamento di quattro differenti emulsioni di principi attivi e Canfora. L'ANOVA ($F_{3,12}=2,42$; $p=0,117$) non ha rilevato differenze statisticamente significative tra i trattamenti.

In questa prova si riscontra una maggiore mortalità nella tesi 5. Il trattamento con la miscela di principi attivi al 2% con l'aggiunta della Canfora è risultata più efficace e statisticamente significativo rispetto a tutte le altre tesi a 48 ore dall'intervento. Le tesi 2 e 3, inoltre, corrispondono alle tesi 4 e 5 della prova precedente. Come si può notare la mortalità media questa volta è sensibilmente inferiore: 11.8%(Tesi2) e 21.7(Tesi3) rispetto ad un 54.3%(Tesi4) e 63.8%(Tesi5) della IV prova.

VI prova: Canfora

Nella tabella (**tab.4.1.6**) sono riportate le percentuali medie di mortalità riscontrate nelle cinque tesi.

Tabella 4.1.6. Mortalità media di cinque diverse concentrazioni di Canfora

Tesi	Trattamento	%Mortalità a 24h	%Mortalità a 48h	%Mortalità a 72h	Media
1	Canfora 0.01%	0.0	2.2	6.9	3.0
2	Canfora 0.025	0.0	0.0	1.8	0.6
3	Canfora 0.05	0.0	0.0	0.0	0.0
4	Canfora 0.075	3.1	0.0	2.3	1.8
5	Canfora 0.1	0.0	0.0	6.7	2.2

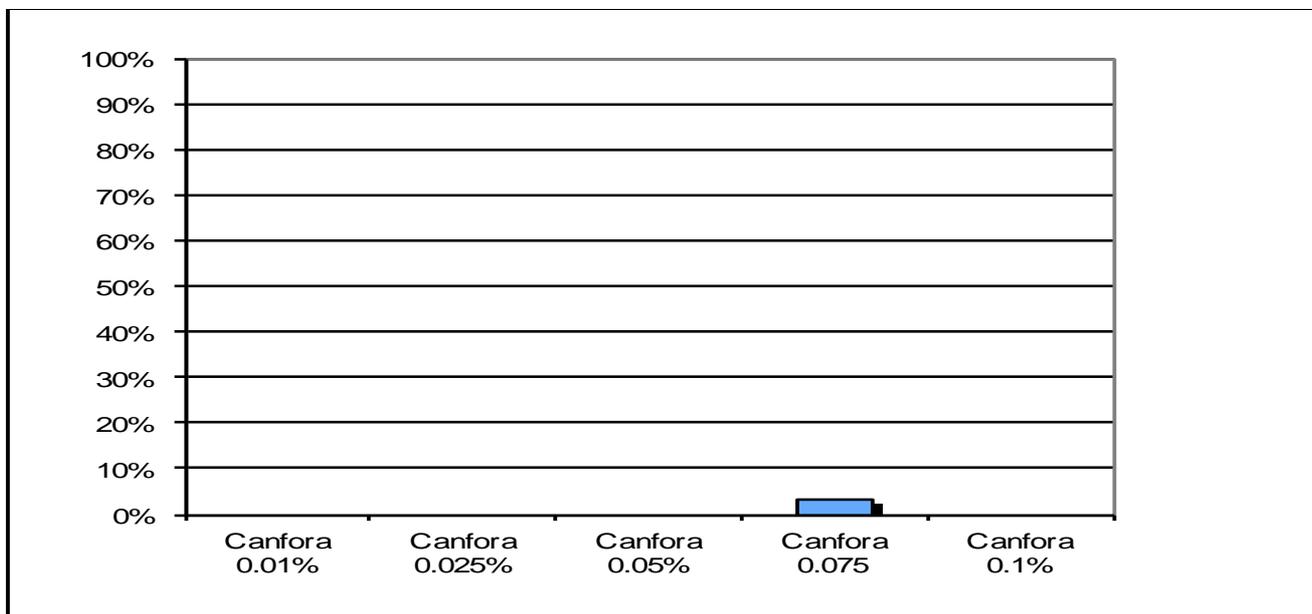


Figura 4.1.16. Mortalità a 24 h dal trattamento di cinque diverse concentrazioni di canfora. La mortalità è estremamente ridotta e non è possibile eseguire alcuna analisi statistica.

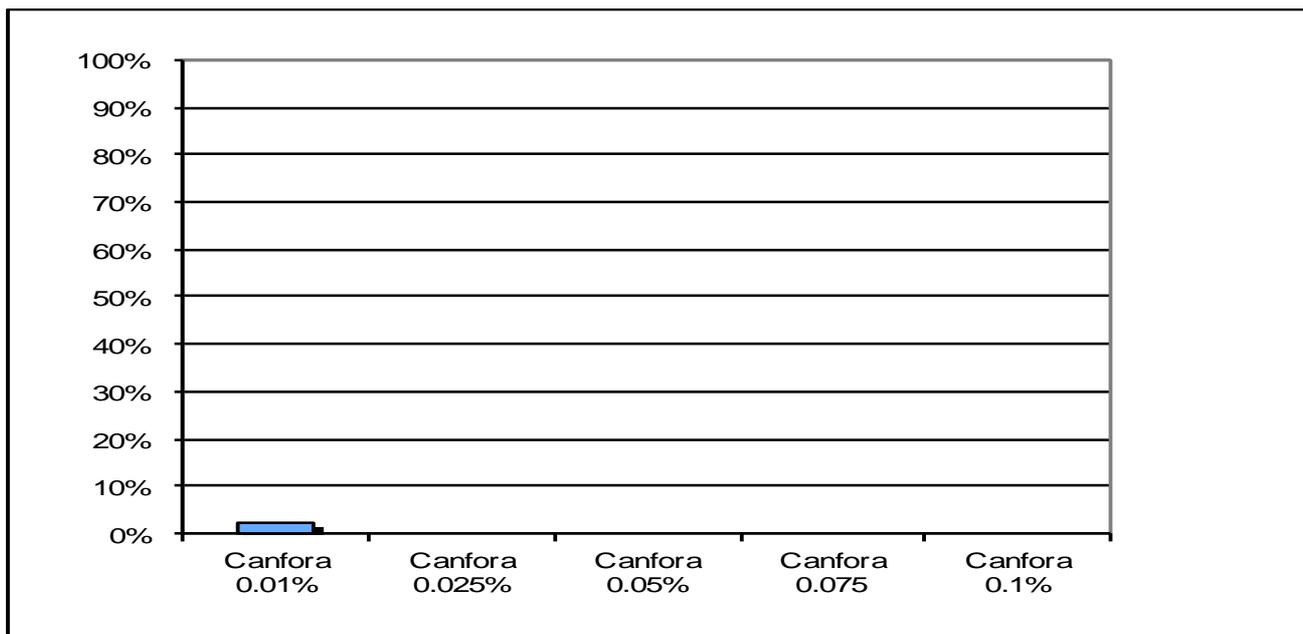


Figura 4.1.17. Mortalità a 48 h dal trattamento di cinque diverse concentrazioni di Canfora. La mortalità è estremamente ridotta e non è possibile eseguire alcuna analisi statistica.

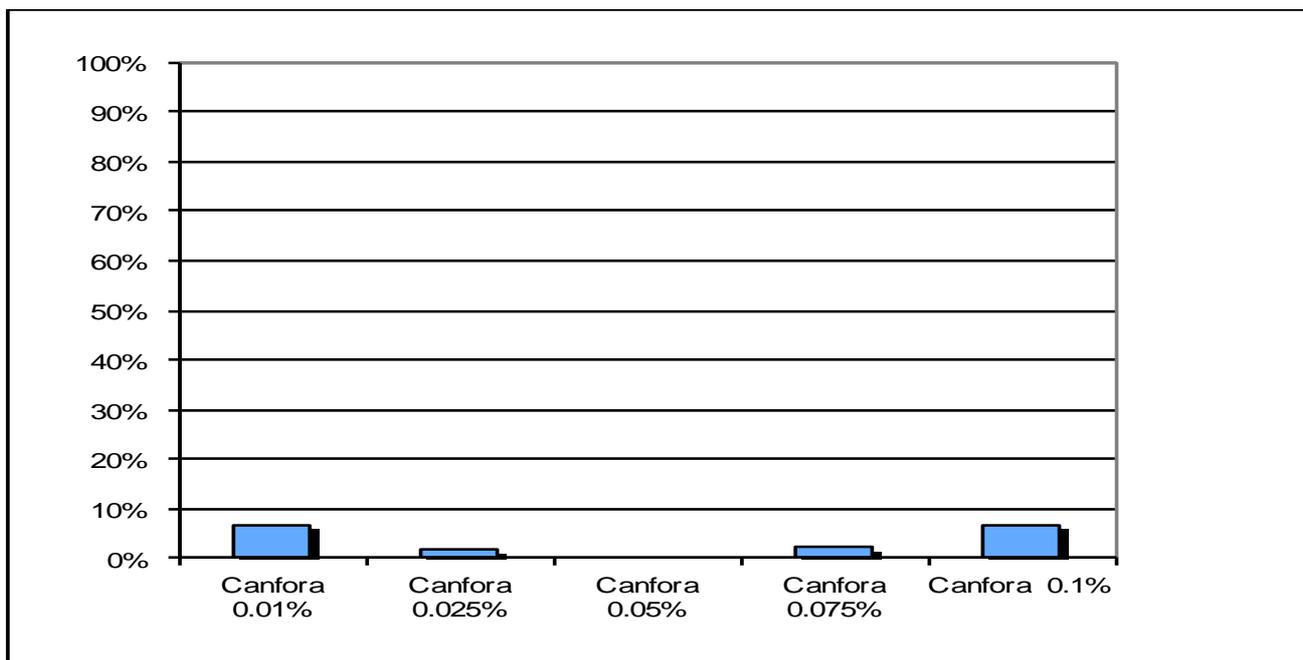


Figura 4.1.18. Mortalità a 72 h dal trattamento di cinque diverse concentrazioni di Canfora. La mortalità è estremamente ridotta e non è possibile eseguire alcuna analisi statistica.

Fra tutte le prove effettuate questa è quella in cui si è riscontrato la più bassa mortalità. Le cinque tesi non hanno evidenziato alcuna

efficacia insetticida e non sono risultate significativamente differenti tra loro.

VII prova: Emulsionanti con principi attivi

Nella tabella (**tab.4.1.7**) sono riportate le percentuali medie di mortalità riscontrate nelle cinque tesi.

Tabella 4.1.7. Mortalità media di due emulsionanti uno dei quali (il Ricinoleato) usato per disperdere tre principi attivi.

Tesi	Trattamento	%Mortalità a 24h	%Mortalità a 48h	%Mortalità a 72h	Media
1	Emulan 10%	59.3	66.7	100.0	75.3
2	Ricinoleato 10%	41.2	23.8	31.9	32.3
3	Limonene5%+ Ricinoleato 10%	11.4	36.2	48.6	32.1
4	Eucaliptolo5%+Ricinoleato 10%	35.3	33.3	14.3	27.6
5	Mircene5%+ Ricinoleato 10%	13.0	27.3	17.6	19.3

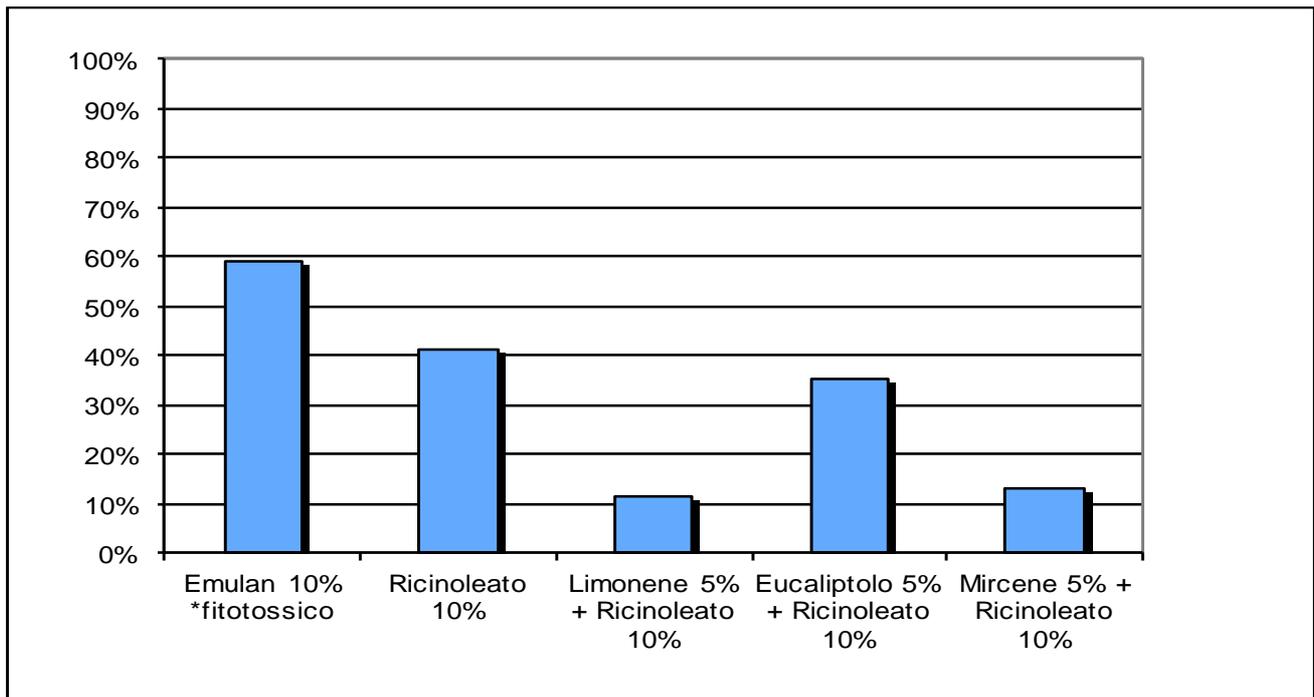


Figura 4.1.19. Mortalità a 24 h dal trattamento di due emulsionanti uno dei quali (il Ricinoleato) usato per disperdere tre principi attivi. Il test non parametrico di Kruskal-Wallis ($H_{4,20}=8,846$; $p=0,0651$) non ha rilevato differenze statisticamente significative tra i trattamenti.

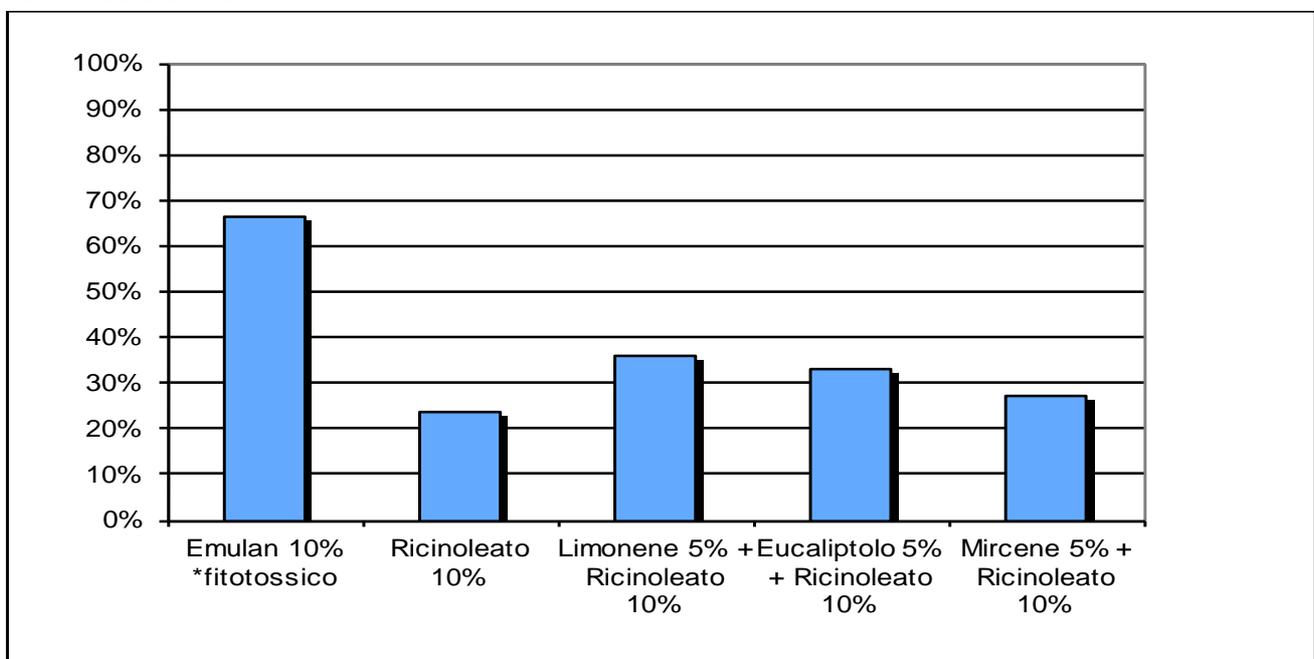


Figura 4.1.20. Mortalità a 48 h dal trattamento di due emulsionanti uno dei quali (il Ricinoleato) usato per disperdere tre principi attivi. L'ANOVA ($F_{4,15}=1,29$; $p=0,318$) non ha rilevato differenze statisticamente significative tra i trattamenti.

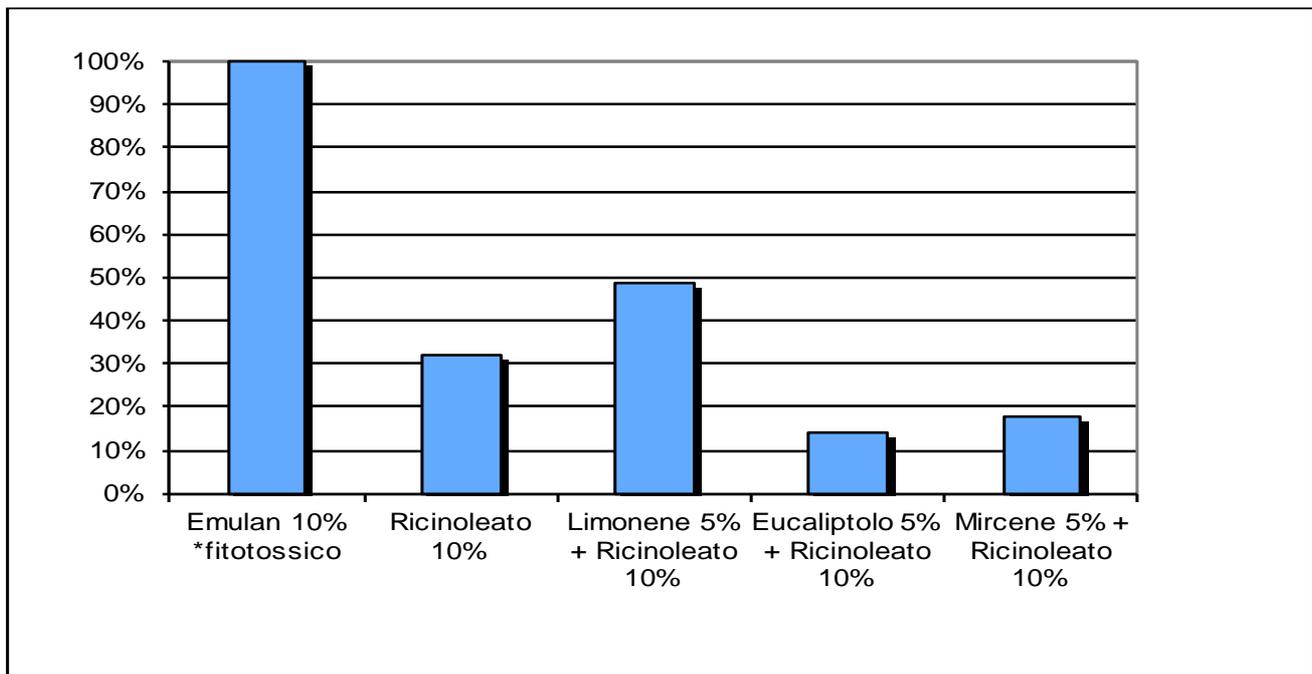


Figura 4.1.21. Mortalità a 72 h dal trattamento di due emulsionanti uno dei quali (il Ricinoleato) usato per disperdere tre principi attivi. L'ANOVA ($F_{3,12}=0,48$; $p=0,703$) non ha rilevato differenze statisticamente significative tra i trattamenti.



Fig. 4.1.22. Fitotossicità dell'emulsionante Emulan.

In questa prova al posto del Tween sono stati saggiati altri due emulsionanti, l'Emulan e il Ricinoleato. Quest'ultimo è stato usato sia tal quale sia come emulsionante del limonene, del mircene e dell'eucaliptolo. La differenza di mortalità tra le varie tesi non è statisticamente significativa. L'elevata mortalità riscontrata nella tesi 1 (Emulan 10%), soprattutto a 72 ore dall'intervento dove raggiungeva il 100%, è stata provocata dalla fitotossicità del prodotto (**fig.4.1.22.**).

VIII prova: Oli essenziali e Confidor

Nella tabella (**tab.4.1.8**) sono riportate le percentuali medie di mortalità riscontrate nelle cinque tesi.

Tabella 4.1.8. Mortalità media degli oli essenziali di Limone e Eucalyptus a due diverse concentrazioni e del neonocotinoide Confidor.

Tesi	Trattamento	%Mortalità a 24h	%Mortalità a 48h	%Mortalità a 72h	Media
1	Controllo Confidor	100.0	100.0	100.0	100.0
2	Limone O.E.1%+Tween2%	24.4 a	40.5 a	22.2 ab	29.0
3	Limone O.E.2%+Tween4%	32.6 a	37.3 a	56.1 b	42.0
4	Eucalyptus G.1%+Tween2%	21.1 ab	26.2 a	16.7 ab	21.3
5	Eucalyptus G.2%+Tween4%	3.9 b	2.6 b	0.0 a	2.2

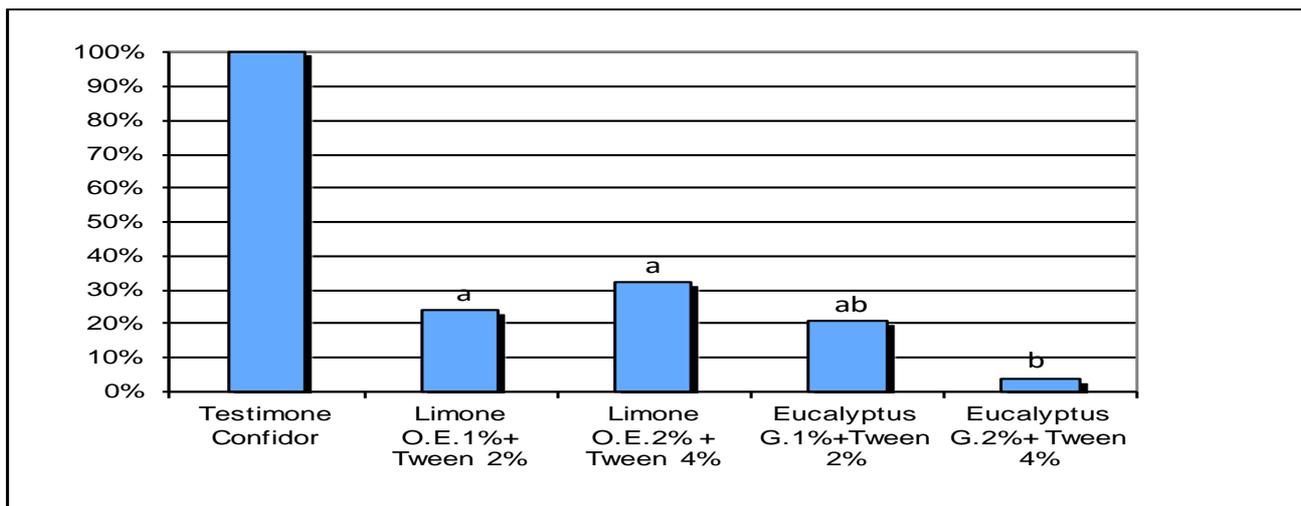


Figura 4.1.23. Mortalità a 24 h dal trattamento degli oli essenziali di Limone e Eucalyptus a due diverse concentrazioni e del neonicotinoide Confidor. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative, ANOVA ($F_{3,12}=4,62$; $p=0,0226$) seguita da test HSD di Tukey per i confronti multipli ($p<0,05$).

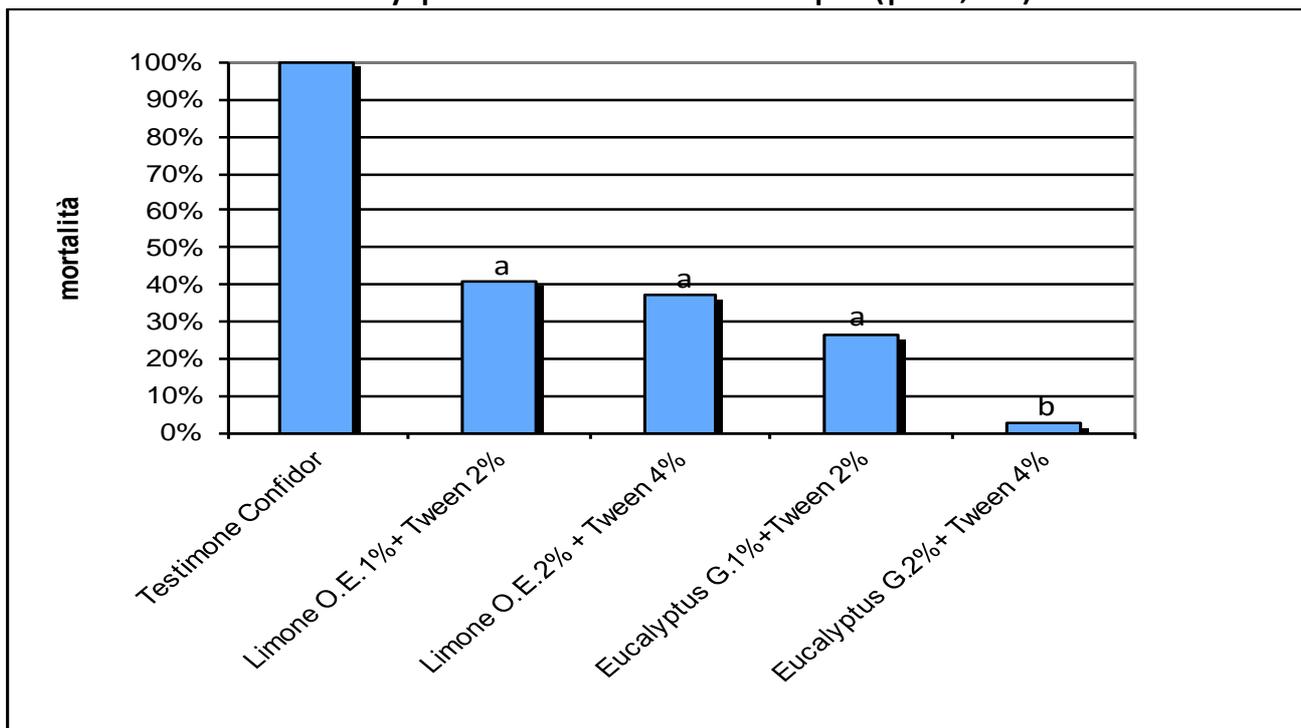


Figura 4.1.24. Mortalità a 48 h dal trattamento degli oli essenziali di Limone e Eucalyptus a due diverse concentrazioni e del neonicotinoide Confidor. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative, ANOVA ($F_{3,12}=8,77$; $p=0,00237$) seguita da test HSD di Tukey per i confronti multipli ($p<0,05$).

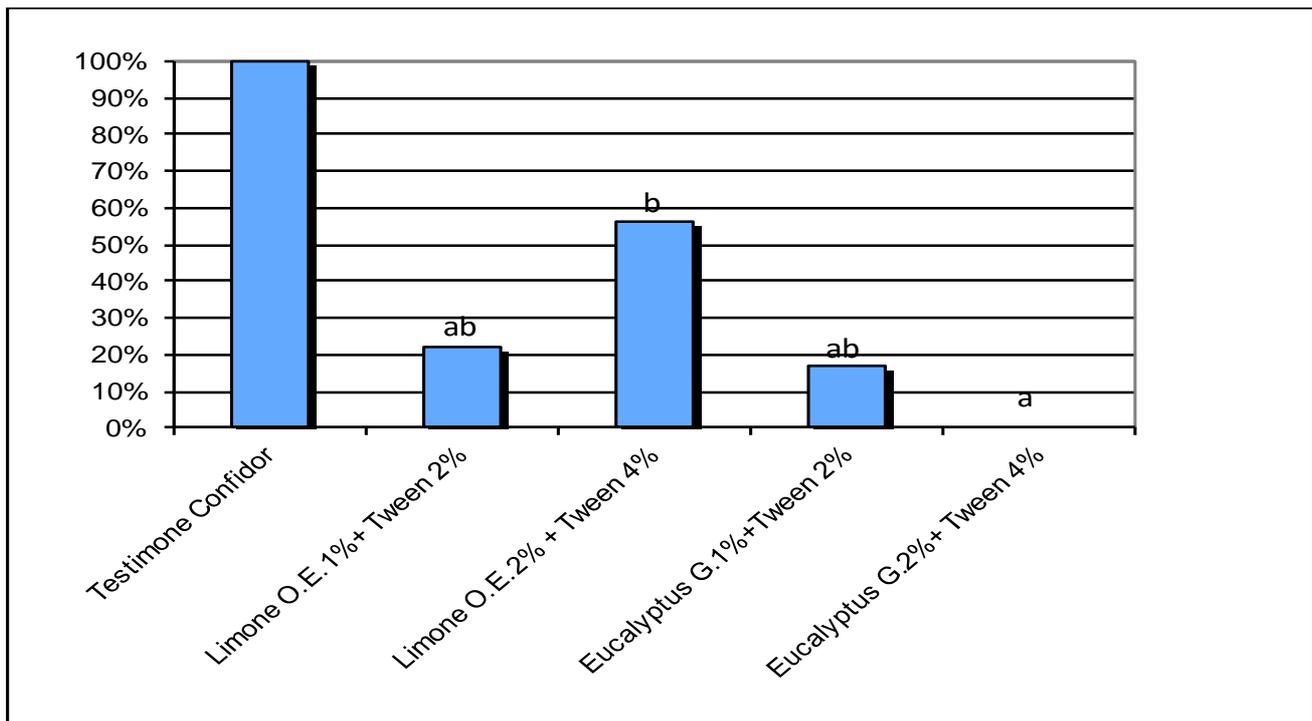


Figura 4.1.25. Mortalità a 72 h dal trattamento degli oli essenziali di Limone e Eucalyptus a due diverse concentrazioni e del neonicotinoide Confidor. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative, ANOVA ($F_{3,12}=9,09$; $p=0,00205$) seguita da test HSD di Tukey per i confronti multipli ($p<0,05$).

Nel rilevamento eseguito a 24 ore, il trattamento con l'olio essenziale di Limone all'1% e 2% provoca una mortalità che è statisticamente superiore rispetto all'intervento con Eucalyptus G. al 2%. Anche a 48 l'efficacia di quest'ultimo intervento è significativamente inferiore a tutte le altre tesi. A 72 ore l'intervento con l'olio essenziale di Limone al 2% è significativamente più efficace dell'intervento con Eucalyptus G. al 2%. L'insetticida Confidor ha provocato una mortalità del 100% degli insetti in tutte le tesi.

IX prova: Oli essenziali di Rosmarino e Cajeput

Nella tabella (**tab.4.1.9**) sono riportate le percentuali medie di mortalità riscontrate nelle cinque tesi.

Tabella 4.1.9. Mortalità media degli oli essenziali di Rosmarino e Cajeput a due diverse concentrazioni.

Tesi	Trattamento	%Mortalità a 24h	%Mortalità a 48h	%Mortalità a 72h	Media
1	Controllo Tween4%	39.3	46.5	51.1	45.6
2	Rosmarino 1%+Tween2%	21.1	5.6	13.9	13.5
3	Rosmarino2%+Tween4%	15.4	23.3	31.3	23.3
4	Cajeput oil1%+Tween2%	0.0	11.8	9.7	7.2
5	Cajeput oil2%+tween4%	16.7	11.9	7.1	11.9

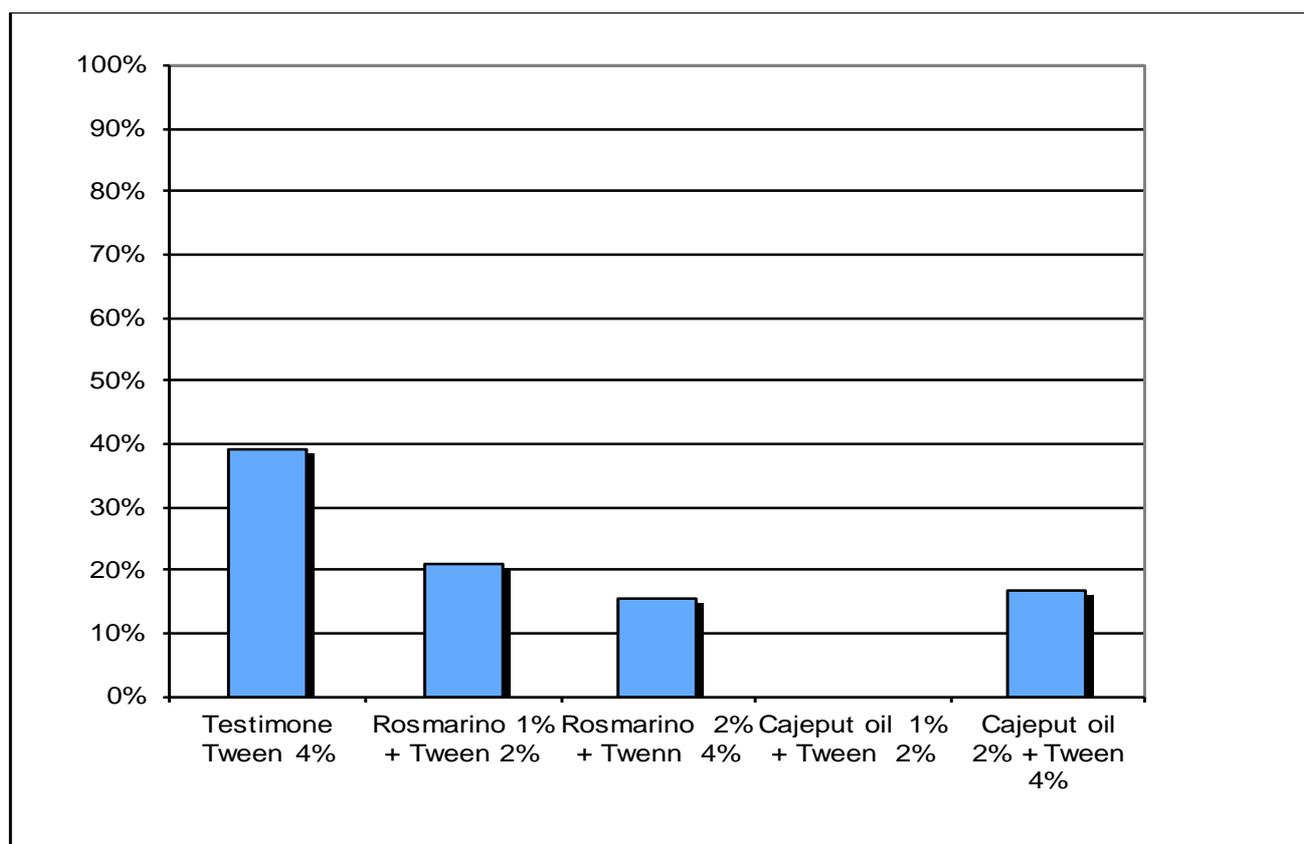


Figura 4.1.26. Mortalità a 24 h dal trattamento degli oli essenziali di Rosmarino e Cajeput a due diverse concentrazioni. L'ANOVA ($F_{3,12}=1,96$; $p=0,174$) non ha rilevato differenze statisticamente significative tra i trattamenti.

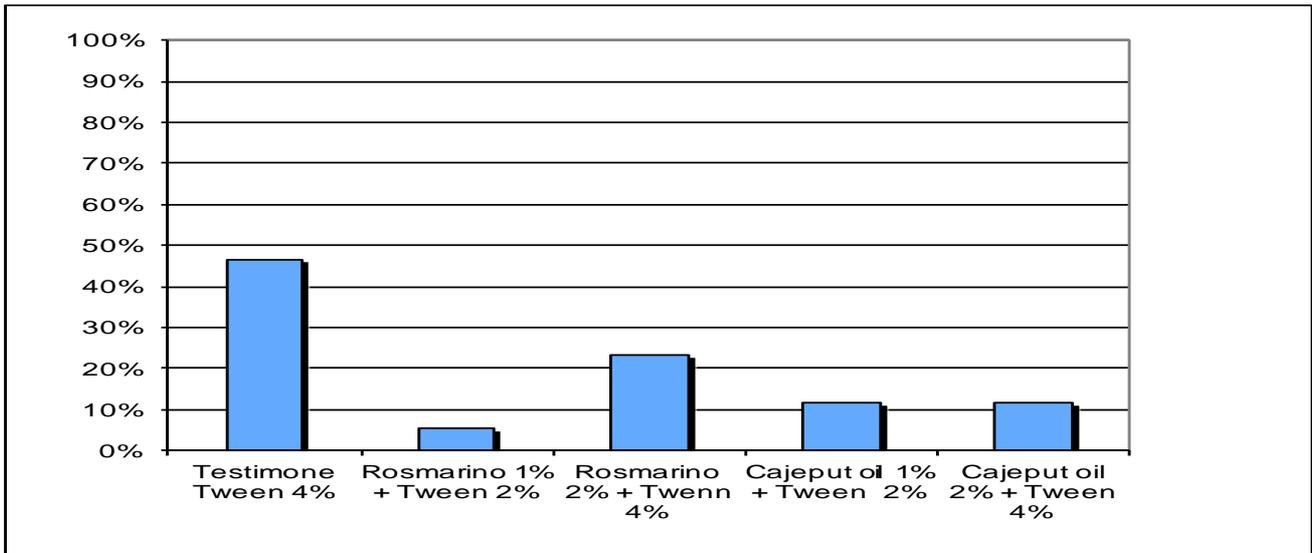


Figura 4.1.27. Mortalità a 48 h dal trattamento degli oli essenziali di Rosmarino e Cajeput a due diverse concentrazioni. Il test non parametrico di Kruskal-Wallis ($H_{4,20}=7,91$; $p=0,095$) non ha rilevato differenze statisticamente significative tra i trattamenti.

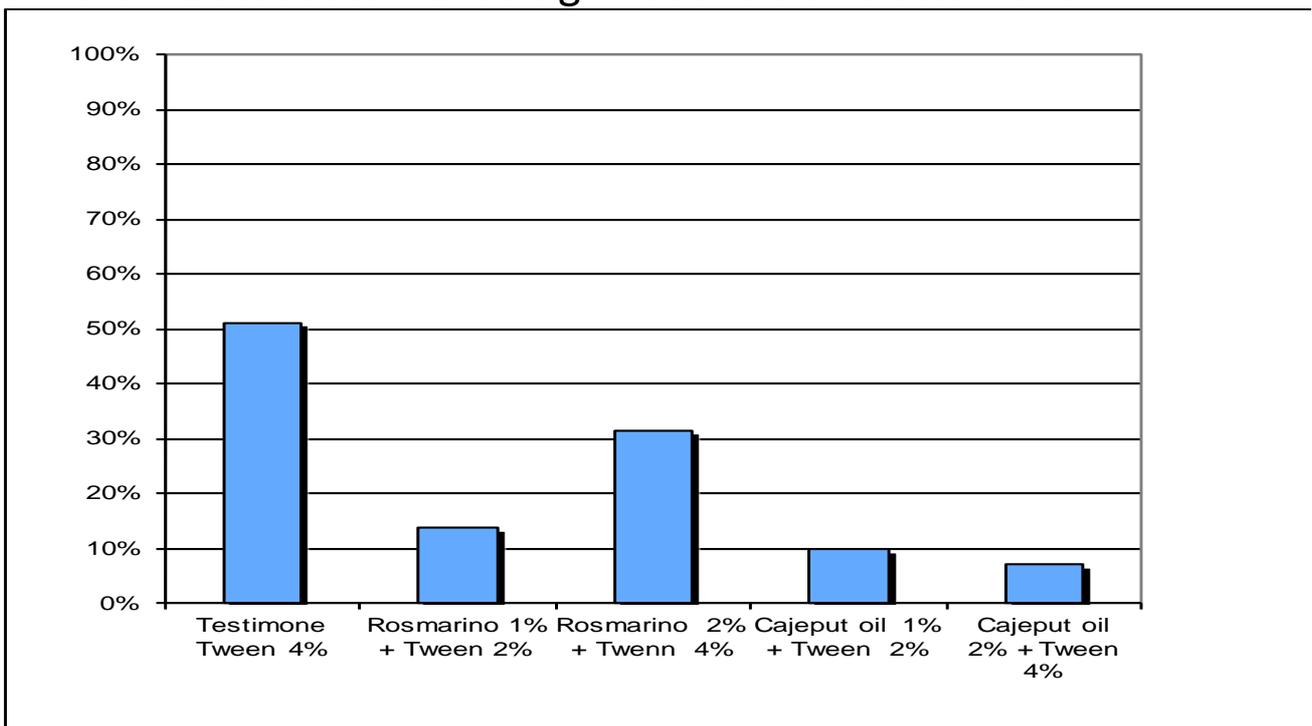


Figura 4.1.28. Mortalità a 72 h dal trattamento degli oli essenziali di Rosmarino e Cajeput a due diverse concentrazioni. L'ANOVA ($F_{4,15}=2,42$; $p=0,0942$) non ha rilevato differenze statisticamente significative tra i trattamenti.

I risultati di questa prova sono in linea con quelli delle prove precedenti. Pur non essendoci differenze significative tra gli interventi, nella tesi con il solo emulsionante (Tween al 4%) si è ottenuta la maggiore mortalità.

X prova: Oli essenziali di Artemisia e Canfora OE

Nella tabella (**tab.4.1.10**) sono riportate le percentuali medie di mortalità riscontrate nelle cinque tesi.

Tabella 4.1.10. Mortalità media degli oli essenziali di Artemisia e Canfora a due diverse concentrazioni.

Tesi	Trattamento	%Mortalità a 24h	%Mortalità a 48h	%Mortalità a 72h	Media
1	Controllo Tween4%	28.9 b	69.1 b	89.5 b	62.5
2	Artemisia 1%+Tweeen2%	2.0 a	2.2 a	8.0 a	4.1
3	Artemisia2%+Tween4%	36.5 b	34.8 ab	28.6 a	33.3
4	Canfora OE1%+Tween2%	18.8 ab	25.0 ab	12.8 a	18.9
5	Canfora OE2%+tween4%	5.6 a	27.8 a	24.1 a	19.2

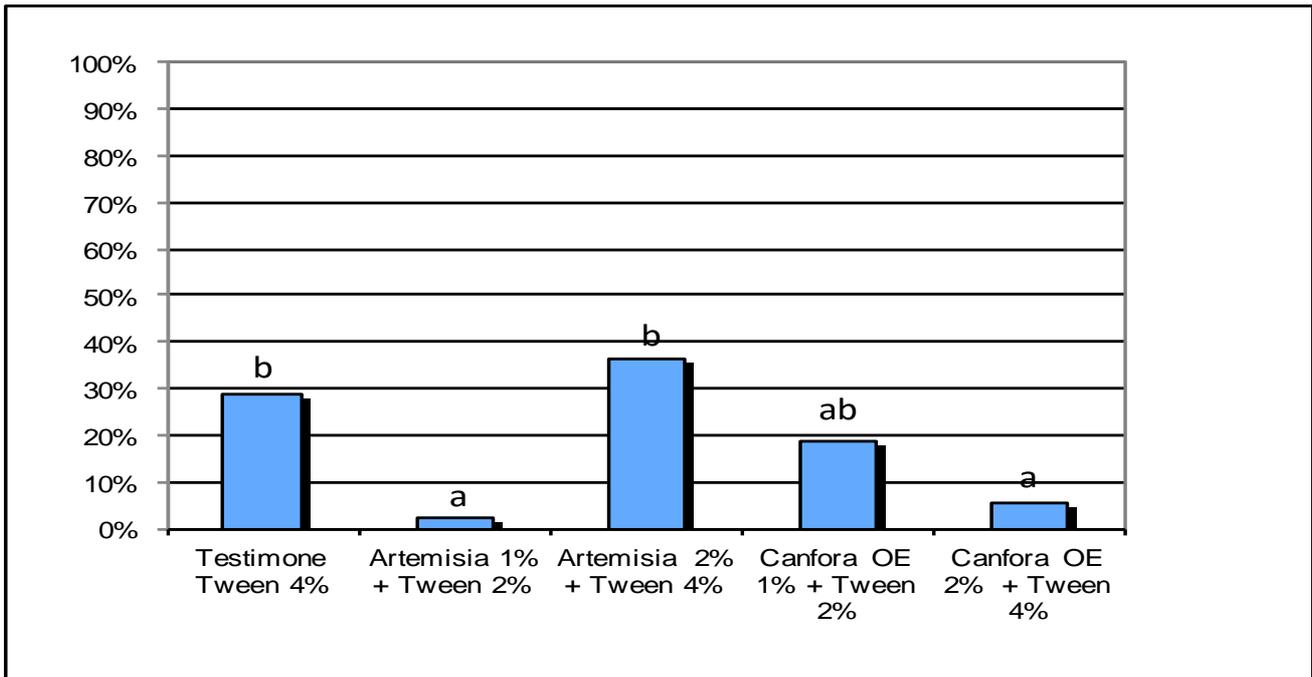


Figura 4.1.29. Mortalità a 24 h dal trattamento degli oli essenziali di Artemisia e Canfora a due diverse concentrazioni. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative, ANOVA ($F_{4,15}=9,58$; $p=0,0005$) seguita da test HSD di Tukey per i confronti multipli ($p<0,05$).

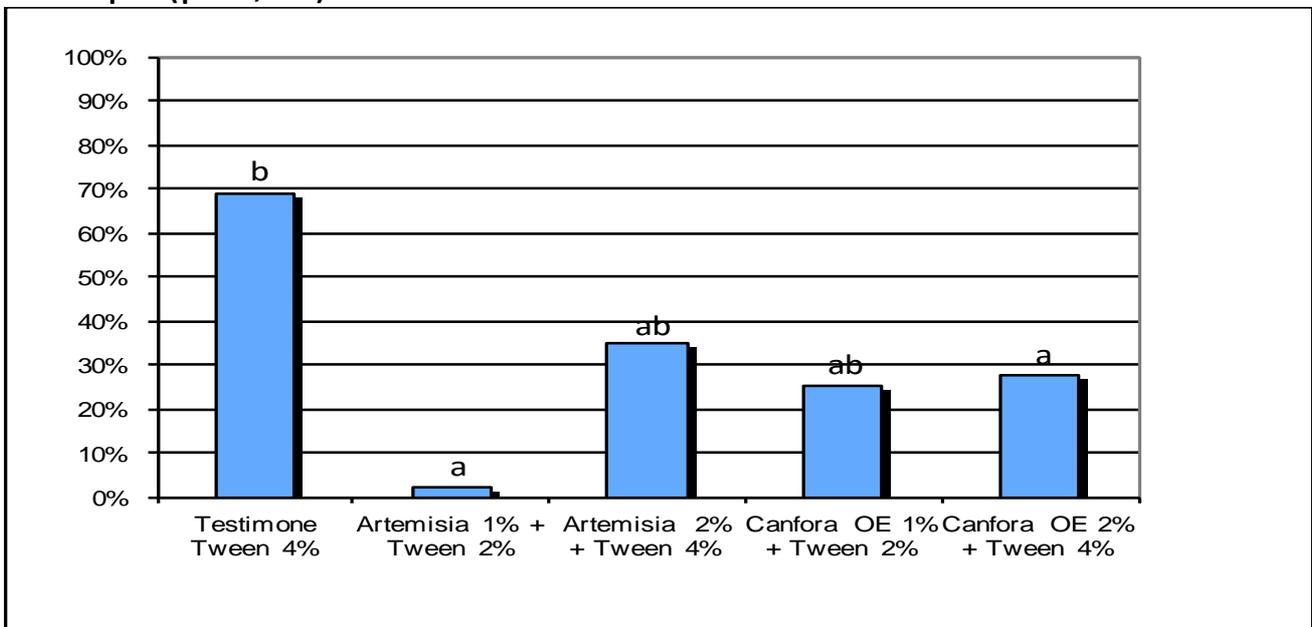


Figura 4.1.30. Mortalità a 48 h dal trattamento degli oli essenziali di Artemisia e Canfora a due diverse concentrazioni. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative, ANOVA ($F_{4,15}=6,72$; $p=0,0026$) seguita da test HSD di Tukey per i confronti multipli ($p<0,05$).

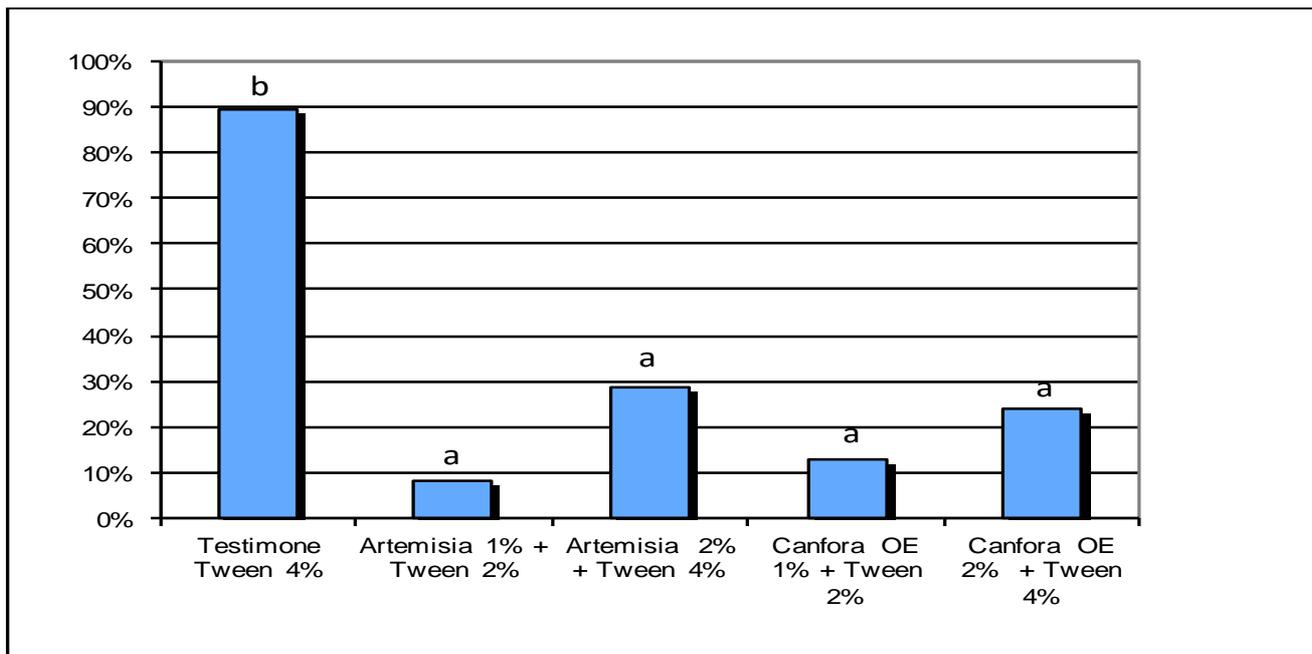


Figura 4.1.31. Mortalità a 72 h dal trattamento degli oli essenziali di Artemisia e Canfora a due diverse concentrazioni. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative, ANOVA ($F_{4,15}=9,55$; $p=0,00048$) seguita da test HSD di Tukey per i confronti multipli ($p<0,05$).

A 24 ore dall'intervento il Controllo trattato con Tween al 4% e la tesi 3 trattata con olio essenziale di Artemisia al 2% + Tween al 4% provocano una mortalità significativamente superiore rispetto alle tesi 2 (Artemisia 1%+Tween2%) e 5(Canfora OE+Tween4%). La mortalità nella tesi 1 si mantiene significativamente più elevata rispetto alla tesi 2 e 5 anche a 48 ore dal trattamento. A 72 ore dal trattamento la mortalità della tesi di Controllo è sensibilmente più elevata e statisticamente significativa rispetto a tutte le altre tesi.

XI prova: Oli essenziali di Canapa Felina e Carmagnola

Nella tabella (**tab.4.1.11**) sono riportate le percentuali medie di mortalità riscontrate nelle cinque tesi.

Tabella 4.1.11. Mortalità media degli oli essenziali di canapa Felina e Carmagnola a due diverse concentrazioni.

Tesi	Trattamento	%Mortalità a 24h	%Mortalità a 48h	%Mortalità a 72h	Media
1	Controllo Tween4%	24.5	38.1 a	57.1	39.9
2	Canapa Felina1%+Tweeen2%	19.4	60.9 ab	37.0	39.1
3	Canapa Felina2%+Tween4%	33.3	68.4 b	57.1	52.9
4	Canapa Carmagnola1%+Tween2%	31.3	27.9 ab	62.2	40.5
5	Canapa Carmagnola2%+tween4%	35.7	42.9 ab	57.8	46.1

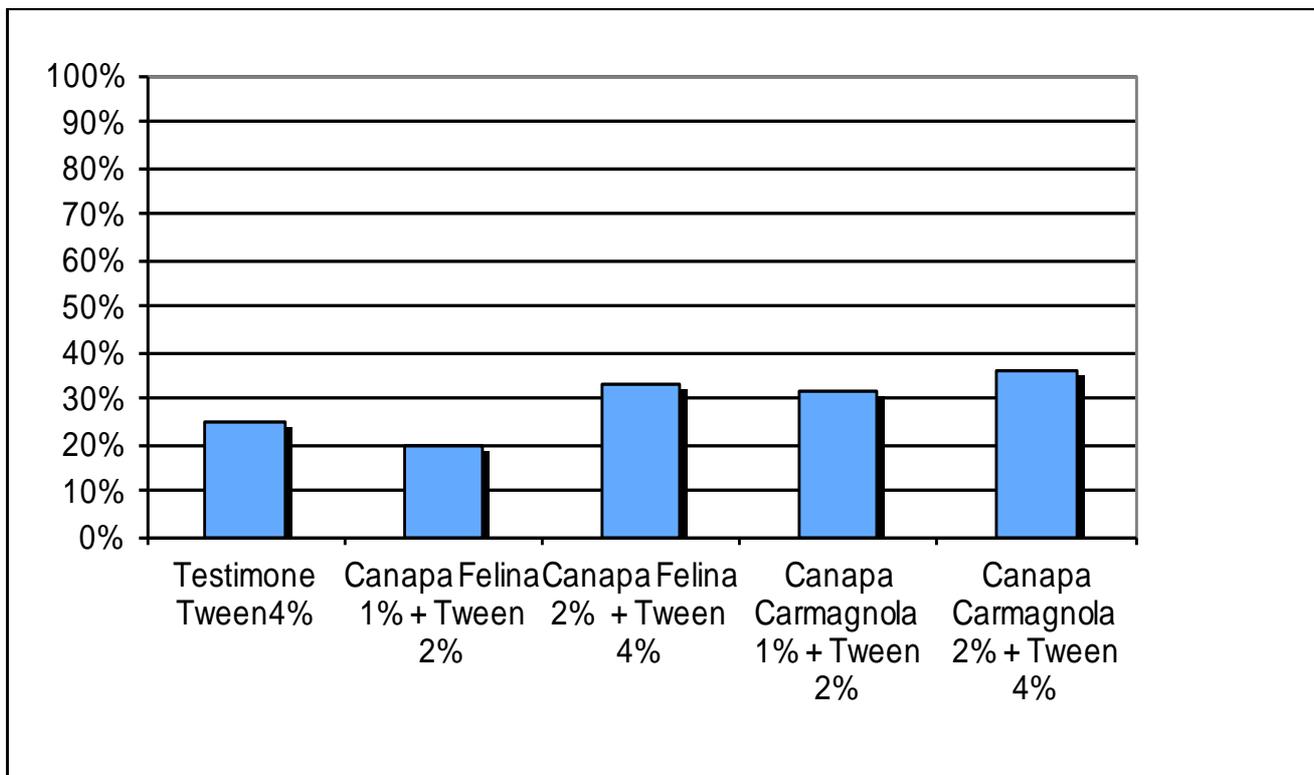


Figura 4.1.32. Mortalità a 24 h dal trattamento degli oli essenziali di canapa Felina e Carmagnola a due diverse concentrazioni. L'ANOVA ($F_{4,15}=0,73$; $p=0,587$) non ha rilevato differenze statisticamente significative tra i trattamenti.

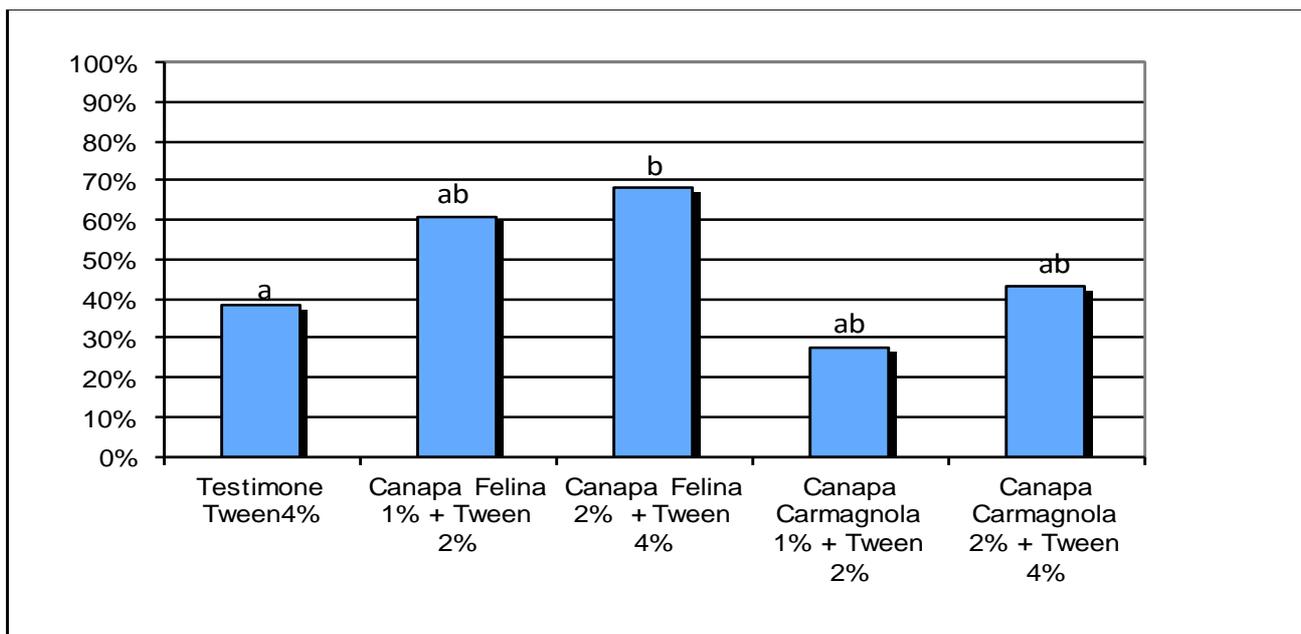


Figura 4.1.33. Mortalità a 48 h dal trattamento degli oli essenziali di canapa Felina e Carmagnola a due diverse concentrazioni. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative, ANOVA ($F_{4,15}=0,357$; $p=0,0308$) seguita da test HSD di Tukey per i confronti multipli ($p<0,05$).

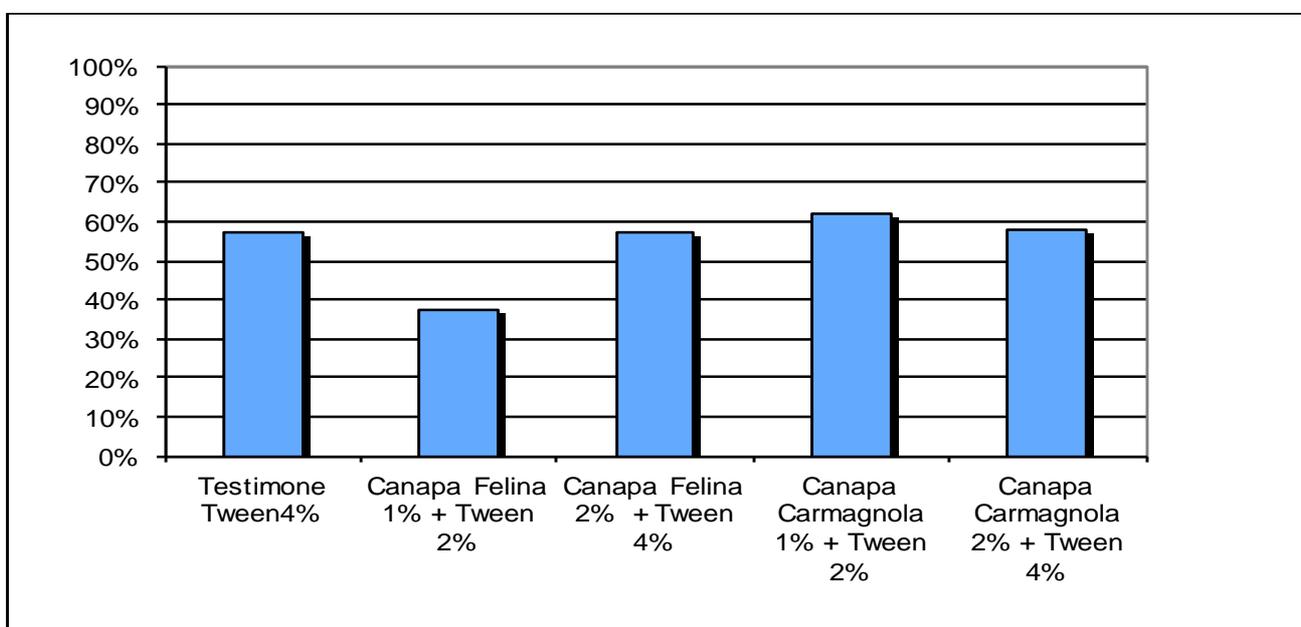


Figura 4.1.34. Mortalità a 72 h dal trattamento degli oli essenziali di canapa Felina e Carmagnola a due diverse concentrazioni. L'ANOVA ($F_{4,15}=0,889$; $p=0,489$) non ha rilevato differenze statisticamente significative tra i trattamenti.

In questa prova non si evidenziano differenze significative tra le tesi a 24 e 72 ore dal trattamento. L'olio di canapa Felina al 2% +Tween al 4% mostra il picco più alto di mortalità a 48 ore. La maggiore mortalità di questa tesi è statisticamente significativa rispetto al Testimone trattato solo con Tween al 4% e differenzia questo risultato da quelli ottenuti nelle precedenti prove sperimentali.

XII prova: Miscele di principi attivi e di oli essenziali

Nella tabella (**tab.4.1.12**) sono riportate le percentuali medie di mortalità riscontrate nelle cinque tesi.

Tabella 4.1.12. Mortalità media di miscele di principi attivi e oli essenziali a due diverse concentrazioni.

Tesi	Trattamento	%Mortalità	%Mortalità	%Mortalità	Media
		a 24h	a 48h	a 72h	
1	Controllo Acqua deionizzata	0.0	0.0	3.9	1.3
2	1%(Limonene,Mircene,Eucaliptolo)+Tween6%	28.6	30.2	20.4	26.4
3	2%(Limonene,Mircene,Eucaliptolo)+Tween12%	11.9	24.2	32.0	22.7
4	1%(Limone,Rosmarino,Artemisia)+Tween6%	14.0	12.9	28.8	18.6
5	1%(Limone,Eucalipto,Artemisia)+Tween6%	13.5	3.7	10.8	9.3

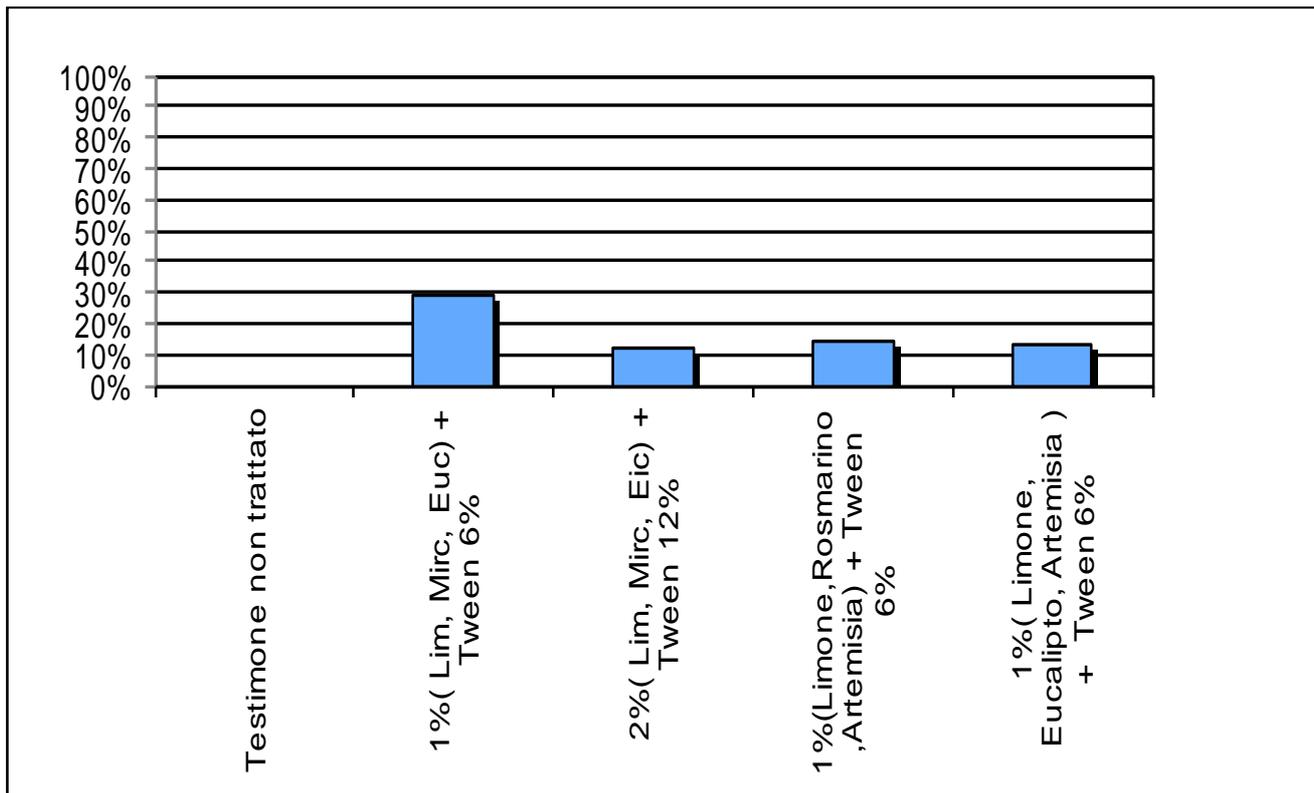


Figura 4.1.35. Mortalità a 24 h dal trattamento di miscele di principi attivi e oli essenziali a due diverse concentrazioni. L'ANOVA ($F_{3,12}=0,92$; $p=0,459$) non ha rilevato differenze statisticamente significative tra i trattamenti.

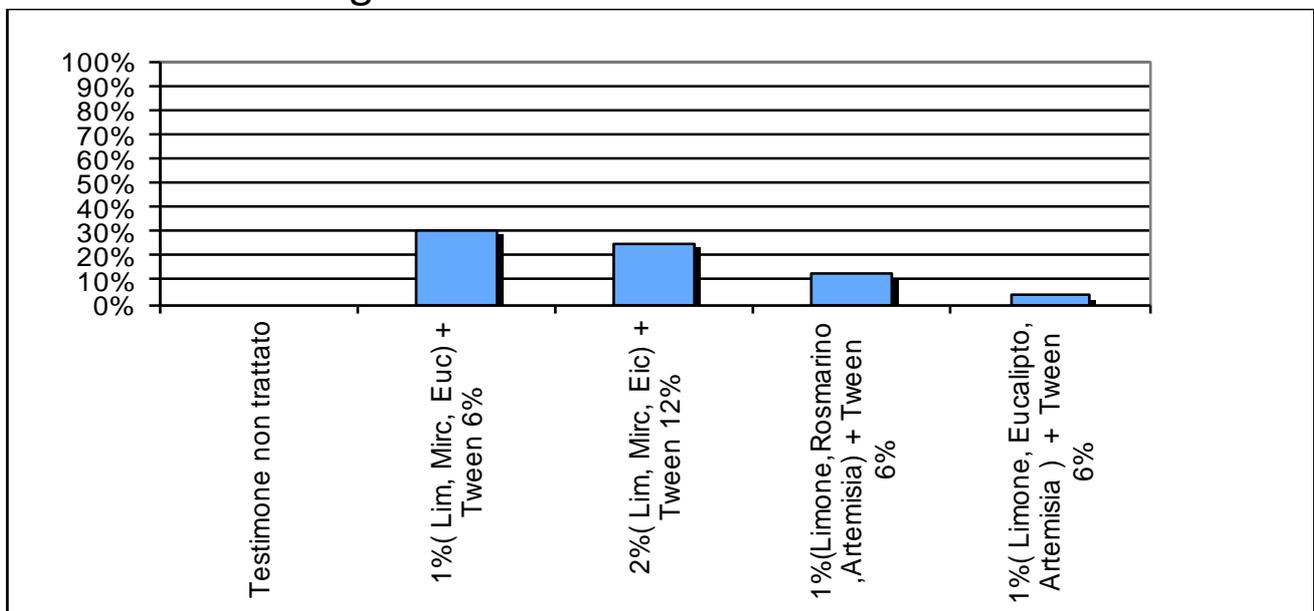


Figura 4.1.36. Mortalità a 48 h dal trattamento di miscele di principi attivi e oli essenziali a due diverse concentrazioni. L'ANOVA ($F_{3,12}=1,25$; $p=0,336$) non ha rilevato differenze statisticamente significative tra i trattamenti.

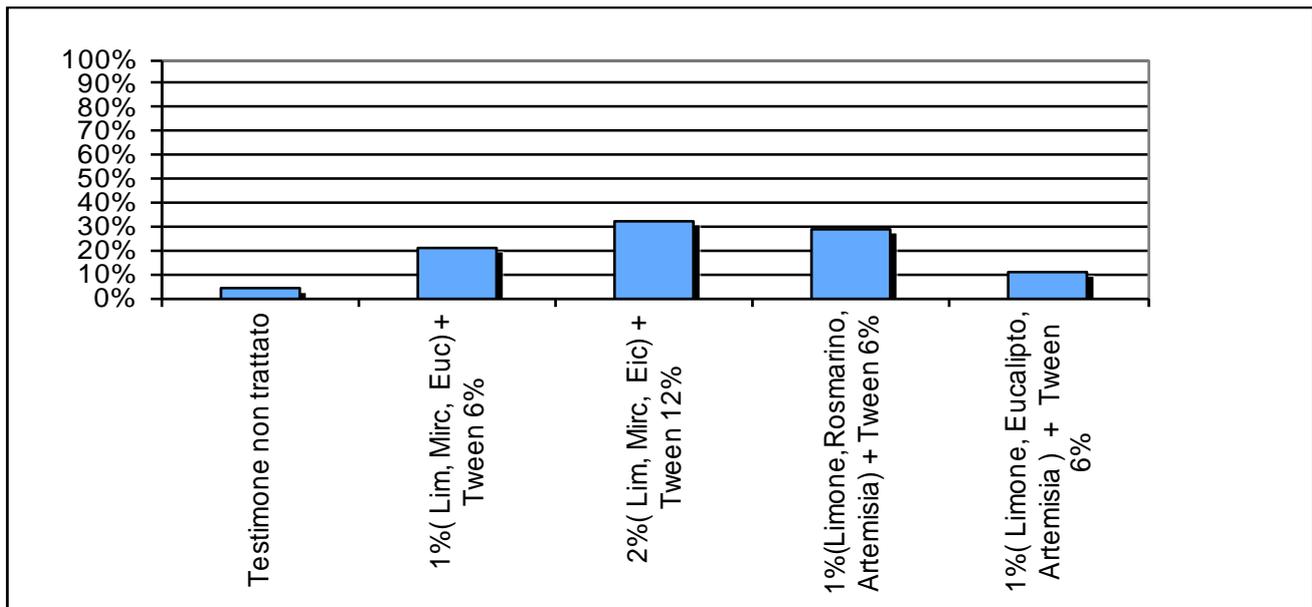


Figura 4.1.37. Mortalità a 72 h dal trattamento di miscele di principi attivi e oli essenziali a due diverse concentrazioni. L'ANOVA ($F_{4,15}=1,20$; $p=0,353$) non ha rilevato differenze statisticamente significative tra i trattamenti.

Le miscele di principi attivi a differenti concentrazioni (1% e 2% di ogni singolo principio attivo) e le due differenti miscele di oli essenziali non hanno prodotto mortalità statisticamente significative anche rispetto al controllo non trattato. La mortalità è risultata contenuta in tutte le tesi della prova.

4.2 Discussione

I risultati ottenuti nelle diverse prove hanno dimostrato una scarsa efficacia insetticida sull'afide verde del pesco, sia dei composti contenuti negli oli essenziali sia degli oli essenziali stessi.

Nelle prove con il Myrcene e l'Eucaliptolo (1,8-Cineolo) la mortalità media è stata elevata quando l'emulsionante veniva utilizzato da solo mentre si è abbassata notevolmente quando veniva utilizzato per disperdere i due composti in acqua. Si è osservato lo stesso andamento della mortalità nella prova con il Limonene a 48 ore dal trattamento. I risultati quindi suggeriscono una efficacia insetticida dell'emulsionante, molto probabilmente dovuta alla capacità del prodotto di alterare il tegumento dell'insetto esponendolo alla disidratazione. L'efficacia insetticida del Tween 20, infatti, diminuisce in presenza dei composti testati verosimilmente perché la parte idrofoba dell'emulsionante essendo legata ad essi non riesce ad aggredire o aggredisce con minore efficacia le cere del tegumento dell'insetto.

Le prove quindi, in accordo con quanto rilevato da numerosi autori, alcuni dei quali citati di seguito, hanno messo in evidenza che l'efficacia insetticida non aumenta se i composti presenti negli oli essenziali vengono utilizzati in purezza, (Isman *et al.*, 2011). Significativo, a questo proposito, è quanto ottenuto da Miresmailli *et al.* (2006) comparando la tossicità dell'olio essenziale di *Rosmarinus officinalis* L. con quella dei suoi maggiori costituenti. L'olio essenziale provocava in *Tetranychus urticae* Koch una mortalità superiore al 90% mentre inaspettatamente il miscuglio dei quattro maggiori costituenti produceva una mortalità del 25%. Se però questi venivano miscelati con i composti meno attivi la mortalità saliva al 75% mettendo in evidenza un effetto sinergico tra i principi attivi. Effetti di questo tipo sono stati rilevati da

numerosi altri autori (Hummelbrunner *et al.* 2001; Tak and Isman, 2015; Batish *et al.*, 2008).

Miscelare i componenti più abbondanti di un olio essenziale che ha mostrato una certa efficacia, quindi, non porta necessariamente ad avere un prodotto altrettanto efficace. Questo rappresenta un problema di notevole rilevanza in quanto rende estremamente difficile avere a disposizione formulati con una composizione standardizzata. Gli oli essenziali infatti, come ho già detto nella parte introduttiva di questo lavoro, hanno una composizione estremamente variabile che dipende da numerosi fattori.

Le prove effettuate con le miscele di principi attivi non hanno dato risultati significativamente differenti da quelli dei singoli principi attivi. La mortalità media infatti non è stata molto diversa se si confrontano le tesi dove l'emulsionante è stato impiegato a dosi simili (5% e 10% nelle prove con i singoli composti e 6% e 12% nelle prove con le miscele di principi attivi). Ciò conferma l'ipotesi, sopra esposta, che miscelare i componenti principali di un olio essenziale non aumenta l'efficacia insetticida del preparato.

Anche le prove effettuate con gli oli essenziali non hanno dato i risultati sperati e non si sono osservati gli effetti sinergici tra i composti in essi presenti. La mortalità media non ha presentato differenze di rilievo se si confrontano le tesi in cui i composti e gli oli sono utilizzati alla stessa concentrazione (es. 1% di olio essenziale o di composto + 2% di Tween).

Viene confermata invece la discreta efficacia insetticida del Tween 20 soprattutto quando usato da solo. Nelle prove IX e X il Tween 20 al 4% ha provocato una maggiore mortalità media (45.6% e 62.5% rispettivamente) del Tween 20 al 4% + gli oli essenziali al 2%. Unica eccezione alla regola il trattamento con Tween 20 + olio essenziale di canapa Felina che a 48 ore dall'intervento è risultato significativamente più efficace del solo emulsionante.

Anche nell'ultima prova, in cui venivano testate l'efficacia di due differenti miscele di oli essenziali e di principi attivi, non si sono riscontrati effetti sinergici tra i vari componenti e la mortalità è stata talmente bassa da non differenziarsi da quella del controllo non trattato.

Spicca invece l'enorme differenza di efficacia tra gli oli essenziali di Limone ed Eucalipto e quella di un acaricida classico come il Confidor nella prova VIII. La mortalità nella tesi trattata con il Confidor raggiungeva il 100% già a 24 ore dall'intervento.

Degna di nota è anche la totale inefficacia insetticida della Canfora nella prova VI.

Eppure l'efficacia degli oli essenziali e dei composti in essi presenti sono ben documentati nella letteratura scientifica internazionale (Don Pedro, 1996; Lee *et al.* 1997, 2003; Prates *et al.*, 1998; Isman *et al.*, 2001; Kim and Ahn, 2001; Park *et al.*, 2003; Aslan *et al.*, 2004; Papachristos *et al.*, 2004). Kordali *et al.* (2007) hanno riscontrato un'elevata tossicità di numerosi monoterpeni su *Leptinotarsa decemlineata* Say; fra questi il Limonene, il Myrcene e il 1,8-Cineolo, oggetto di studio in questo mio lavoro, provocavano una mortalità compresa fra il 90% e il 100% dei primi due stadi larvali del coleottero e del 100% degli adulti già a 24 ore dal trattamento. Le prove sono state condotte utilizzando, come ambiente per valutare la tossicità, capsule Petri del diametro di 9cm e profonde 1.5cm in cui venivano rinchiusi gli insetti. Altri autori hanno valutato la tossicità degli oli essenziali o dei loro componenti applicando direttamente il prodotto sul torace degli insetti. Per esempio Padin *et al.* (2013) hanno valutato la tossicità acuta di nove estratti di piante applicando direttamente i preparati sul torace del coleottero *Tribolium castaneum* mediante una microsiringa. Pinheiro *et al.*, (2013) hanno ottenuto una mortalità del 96,9% utilizzando l'olio essenziale di *Cymbopogon winterianus* contro *Frankliniella schultzei* e *Myzus persicae*. La sperimentazione

è stata condotta utilizzando ninfe di *M. persicae* poste su foglie di cavolo poste all'interno di capsule Petri che dopo il trattamento venivano chiuse con il proprio coperchio.

La mia ricerca è stata portata avanti seguendo un protocollo sperimentale simile a quello adottato da Walthall and Stark (1997) per valutare la tossicità acuta del neonicotinoide Imidacloprid su *Aphis pisum*(Harris 1776). I risultati che ho ottenuto mettono in evidenza che quando si eseguono prove che simulano condizioni di campo l'efficacia degli oli essenziali e dei loro componenti è abbastanza contenuta.

Il protocollo sperimentale messo a punto consente però di valutare con costi contenuti e in poco tempo numerosi prodotti che potrebbero avere efficacia insetticida.

CONCLUSIONI

L'attività di ricerca di questi tre anni è stata condotta con lo scopo di valutare l'efficacia insetticida di alcuni oli essenziali e loro componenti nei confronti dell'afide verde del pesco.

Il protocollo sperimentale messo a punto è stato individuato per simulare le condizioni di campo.

Gli oli scelti per le prove sono stati utilizzati da soli e in combinazione tra loro per valutare eventuali effetti sinergici. Inoltre sono stati testati i singoli componenti predominanti delle diverse essenze, sia singolarmente che miscelati con altri componenti.

Sulla base dei risultati ottenuti possiamo affermare che l'efficacia dei prodotti testati non è generalmente elevata e pertanto non sembrano costituire una valida alternativa agli insetticidi in uso.

Gli oli essenziali comunque hanno una grande variabilità nella composizione chimica ed è quindi auspicabile proseguire la ricerca in quanto, una volta verificata l'efficacia e la tossicità verso l'uomo e gli organismi che popolano gli agroecosistemi, possono costituire una valida alternativa ai fitofarmaci convenzionali attualmente utilizzati.

BIBLIOGRAFIA CITATA

- ARMSTRONG J.S., 2006. Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death. *BioEssays*, 28:253-260.
- ASLAN I., OZBEK H., KORDALI S., CALAMASUR O., CAKIR A., 2004. - Toxicity of essential oil vapours obtained from *Pistacia* spp. to the granary weevil, *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera:Curculionidae). *J. Plant Dis. Protect.*, 111:400-407.
- BAKKALI F., AVERBECK S., AVERBECK D., IDAOMAR M., 2008.- Biological effects of essential oils-A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46:446-475.
- BARTSCH W., SPONER G., DIETMANN K., FUCHS G.,1976. -Acute toxicity of various solvents in the mouse and rat. *Arzneimittelforschung*, 26:1581-1583.
- BATISH D.R., SINGH H.P., KOHLI R.K., KAUR S.,2008. -Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management*, 256:2166-2174.
- BAUER K., GARBE D., SURBURG H.,2001. -*Common Fragrance and Flavor Materials:Preparation, Properties and Uses*. Weinheim: Wiley-VCH. 2nd ed.
- BOYLE W.,1955. -Spices and essential oils as preservatives. *The American Perfumer and essential Oil Review*, 66:25-28.
- BURT S., 2004. –Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int. J. Food Microbiol.*, 94:223-253.
- CAPASSO R., VIOLANTE A., 2003. -Terpeni e steroidi. In: Scarponi L. *Biochimica agraria*. Patron Bologna pp.439-465.
- CARSON C.F., RILEY T.V., 1993. -Antimicrobial activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Letters in Applied Microbiology*, 16:49-55.

- CARSON C.F., MEE B.J., RILEY T.V., 2002. –Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46:1914-1920.
- CHIASSON H., BELANGER A., BOSTANIAN N., VINCENT C., POLUQUIN A., 2001. -Acaricidal Properties of *Artemisia absinthium* and *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) Essential Oils Obtained by Three Methods of Extraction. *J. Econ. Entomol.*, 94:167-171.
- CROSTHWAITE D.,1998. -UK trade within the flavour and fragrance industry. International Federation of Essential oils and Aroma Trades-21st *International Conference on Essential Oil and aroma's*. IFEAT, London, pp6-12.
- DELFINO S., LORETO F., PINELLI P., TOGNETTI R., ALVITO A., 2005. -Isoprenoids content and photosynthetic limitations in rosemary and spearmint plants under water stress. *Agriculture ecosystems Environment*, 106:243-252.
- DI PASQUA R., HOSKINS N., BETTS G., MAURIELLO G., 2006. – Changes in Membrane Fatty Acids Composition of Microbial Cells Induced by addition of Thymol, Carvacrol, Limonene, Cinnamaldehyde, and Eugenol in the Growing Media. *J. Agric. Food Chem.*, 54:2745-2749.
- DON PEDRO K.N.,1996. -Investigation of single and joint fumigant insecticidal action of citruspeel oil components. *Pestic. Sci.*, 46:79-84.
- EFSA (European Food Safety authority), 2015. - Scientific Opinion on the re-evaluation of polyoxyethylene sorbitan monolaurate (E 432), polyoxyethylene sorbitan monooleate (E433), polyoxyethylene sorbitan monopalmitate (E434), polyoxyethylene sorbitan monostearate (E435),

- polyoxyethylene sorbitan tristearate (E436) as a food additive1. *EFSA Journal*, 13(7):4152.
- ENAN E., 2001. -Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 130:325-337.
- EUR. PHARMACOP. COMM.,ed. 2008. *European Pharmacopoeia*. Strasbourg, Fr.: EDQM. 6th ed.
- FAKHARI A.R., SALEHI P., HEYDARI R., EBRAHIMI S.N., HADDAD P.R.,2005. -Hydrodistillation headspace solvent microextraction, a new method for analysis of the essential oil components of *Lavandula angustifolia* Mill. *Journal of Chromatography A*, 1098:14-18.
- FLAMINI G., CIONI P.L., BALDINI R., MACCIONI S., BEDINI G., 2011. -Composizione dell'olio essenziale di due popolazioni di *Teucrium flavum* L. subsp. *Flavum* raccolte su terreno calcareo (Caprione-Liguria orientale) e su terreno ofiolitico (colline livornesi). *Atti Soc. Tosc. Sci. Nat. Mem.*, Serie B,118:15-22.
- GIANQUINTO G., TEI F., 2010. -Orticoltura urbana nei paesi in Via di Sviluppo:ruolo multifunzionale, sistemi colturali e prospettive future. *Italus Hortus*, 17(4):71-79.
- GONZALES-COLOMA A., MARTIN-BENITO D., MOHAMED N., GARCIA VALLEJO M.C., SORIA A.C., 2006. -Antifeedant effects and chemical composition of essential oils from different population of *Lavandula luisieri* L.. *Biochemical Systematics and ecology*, 34:609-616.
- GOULSON D., NICHOLLS E., BOTÌAS C., ROTHERAY E.L., 2015. -Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* 347, 1255957. DOI: 10.1126/science.1255957.
- GOVINDARAJ S., KUMARI B.D.R., 2013. -Composition and Larvicidal activity of *Artemisia vulgaris* L. Stem Essential Oil

- Against *Aedes aegypti*. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 6:11-16.
- GUENTHER E., 1948. *The Essential Oils*. D. Van Nostrand, New York.
- GUSTAFSON J.E., LIEW Y.C., CHEW S., MARKHAM J.L., BELL H.C., WYLLIE S.G., WARMINGTON J.R., 1998. -Effect of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 26:194-198.
- HAMMER K.A., CARSON C.F., RILEY T.V., 2002. –In vitro activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against dermatophytes and other filamentous fungi. *J. Antimicrob. Chemother.*, 50:195-199.
- HOPPER S., HULPIEU H., COLE V., 1949. -Some toxicological properties of surface active agents. *Journal of the American Pharmaceutical Association Scientific Edition*, 38:428-432.
- HUIGNARD J., LAPIED B., DUGRAVOT S., MAGNIN-ROBERT M., KETOH G.K., 2008. –Modes d'action neurotoxiques des dérivés soufrés et de certaines huiles essentielles et risques liés à leur utilisation. In *Biopesticides D'origine Végétale*, 2nd ed.; Lavoisier: Paris, France, 2008; pp. 219–231.
- HUMMELBRUNNER L.A., ISMAN M.B., 2001. -Acute, sublethal, antifeedant and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae). *J.Agric. Food. Chem.*, 49:715-720.
- ISMAN M.B., 2000. -Plant essential oil for pest and disease management. *Crop protection*, 19:603-608.
- ISMAN M.B., 2006. -Botanical Insecticides, Deterrents and Repellents in Modern Agriculture and an Increasingly Regulated World. *Annu. Rev. Entomol.*, 51:45-66.
- ISMAN M.B., 2008. -Perspective. Botanical insecticides: for richer, for poorer. *Pest Management Science*, 64:8-11.
- ISMAN M.B., VAN A.J., PASSREITER C.M., 2001. -Insecticidal activity of essential oils to the tobacco cutworm, *Spodoptera litura*. *Fitoterapia*, 72:65-68.

- ISMAN M.B., MACHIAL C.M., MIRESMAILLI S., BAINARD L.D., 2007. -Essential oil-based pesticides: new insights from old chemistry. In *Pesticide Chemistry. Crop Protection, Public Health, environmental Safety*, ed. H Ohkawa, H Miyagawa, PW Lee, pp. 201-209. Weinheim: Wiley VCH Verlag GmbH & Co.
- ISMAN M.B., MIRESMAILLI S., MACHIAL C., 2011. -Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. *Phytochem Rev*, 10:197-204.
- KESDEK M., KORDALI S., USNMAZ A., ERCISLI S., 2015. -The toxicity of essential oils of some plant species against adults of colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae). *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences*, Tome 68 (1):127-136.
- KIM D.H., AHN Y.J., 2001. -Contact and fumigant activities of constituents of *Foeniculum vulgare* fruit against three Coleopteran stored-product insects. *Pest menag. Sci.*, 57:301-306.
- KIM N.S., LEE D.S., 2002. -Comparison of different extraction methods for the alalysis of fragrances from *Lavandula* spicies by gas chromatography-mass-spectometry. *Journal Chromatography A*, 982:31-47.
- KO K., JUNTARAJUMNONG W., CHANDRAPATYA A., 2009. – Repellency, Fumigant and Contact Toxicities of *Melaleuca cajuputi* Powell against *Sitophilus zeamais* Motshulsky and *Tribolium castaneum* Herbst. *Thai Journal of Agricultural Sience*, 42(1):27-33.
- KORDALI S., KESDEK M., CAKIR A., 2007. -Toxicity of monoterpenes against larvae and adults of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera:Chrysomelidae). *Idustrial Crop and Products*, 26:278-297.

- KOUL O., WALIA S., DHALIWAL G.S., 2008. -Essential oils as Green pesticides: Potential and Constraints. *Biopesticides international*, 4(1):63-84.
- KOSTYUKOVSKY M., RAFAELI A., GILEADI C., DEMCHENKO N., SHAAAYA E., 2002. -Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants: possible mode of action against insect pests. *Pest Menag. Sci.*, 58:1101-1106.
- KUMAR P., MISHRA S., MALIK A., SATYA S., 2012. –Compositional analysis and insecticidal activity of *Eucalyptus globulus* (family: Myrtaceae) essential oil against housefly (*Musca domestica*). *Acta Tropica*, 122:212-218.
- LEE B.H., CHOI W.S., LEE S.E., PARK B.S., 2001. –Fumigant toxicity of essential oils and their constituent compounds towards the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.). *Crop Protection*, 20:317-320.
- LEE S., TSAO R., PETERSON C., COAST J.R., 1997. -Insecticidal activity of monoterpenoids to western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae), twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae), and house fly (Diptera: Muscidae). *J.Econ. Entomol.*, 90:883-892.
- LEE S., PETERSON C.J., COATS J.R., 2003. -Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insect. *J. Stored Prod. Res.*, 39:77-85.
- MASETTI A., 2016. –The potential use of essential oils against mosquito larvae: a short review. *Bulletin of Insectology*, 69(2):307-310.
- MASUTTI L., ZANGHERI S., 2001. -*Myzus persicae*. In *Entomologia generale e applicata*. CEDAM Padova pp. 559-562.
- MIRESMAILLI S., BRADBURY R., ISMAN M.B., 2006. -Comparative toxicity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and blends of its major constituents against *Tetranychus urticae* Koch

- (Acari:Tetranychidae) on two different host plants. *Pest Manag Sci.*, 62:366-371.
- MUNOZ-BERTOMEU J., ARRILLAGA I., SEGURA J., 2007. -Essential oil variation within and among natural populations of *Lavandula latifolia* and its relation to their ecological areas. *Biochemical Systematics and ecology*, 35:479-488.
- ODUNOLA O., UWAIFO A., OLORUNSOGO O., 1998. -Comparative genotoxicities of Tween 20 and Tween 80 in *Escherichia coli* PQ37. *Biokemistri*, 8:123-129.
- ORSINI F., GASPARI D., MARCHETTI L., PIOVENE C., DRAGHETTI S., RAMAZZOTTI S., BAZZOCCHI G., GIANQUINTO G., 2014. - Exploring the production of rooftop gardens (RTGs) in urban agriculture: the potential impact on food and nutrition security, biodiversity and other ecosystem services in the city of Bologna. *Food Security*, 6:781-792.
- PAPACHRISTOS D.P., KARAMANOLI K.I., STAMOPOULOS D.C., MENKISSOGLU-SPIROUDI U., 2004. -The relationship between the chemical composition of three essential oils and their insecticidal activity against *Acanthoscelides obtectus* (Say). *Pest Manag.Sci.*, 60:514-520.
- MONZOTE L., MONTALVO A.M., ALMANONNI S., SCULL R., MIRANDA M., ABREU J., 2006. -Activity of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* grown in Cuba against *Leishmania amazonensis*. *Chemotherapy*, 52:130-136.
- PADIN S.B., FUSE' C., URRITIA M.I., DAL BELLO G.M., 2013. - Toxicity and repellency of nine medicinal plants against *Tribolium castaneum* in stored wheat. *Bulletin of Insectology*, 66(1):45-49.
- PARK I.K., LEE S.G., CHOI D.H., PARK J.D., AHN Y.J., 2003. - Insecticidal activities of constituents identified in the essential oil from leaves of *Chamaecyparis obtuse* against *callosobruchus*

- chinensis*(L.) and *Sitophilus oryzae* (L.). *J. Stored Prod. Res.*, 39:375-384.
- PETRAKIS E.A., KIMBARIS A.C., PERDIKIS D.C., LYKOURESSIS D.P., TARANTILIS P.A., POLISSIOU M.G., 2014. -Responses of *Myzus persicae* (Sulzer) to three Lamiaceae essential oils obtained by microwave and conventional hydrodistillation. *Industrial Crop and products*, 62:272-279.
- PICHERSKY E., NOEL J.P., DUDAREVA N., 2006. -Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science* 311:808-811.
- PINHEIRO P.F., TEBALDI DE QUEIROZ V., RONDELLI V.M., COSTA A.V., MARCELINO T.P., PRATISSOLI D., 2013. -Insecticidal activity of citronella grass essential oil on *Frankliniella schultzei* and *Myzus persicae*. *Ciencia e Agrotecnologia*, 37(2):138-144.
- POLLINI A, PONTI I, LAFFI F., 1988. -Fitofagi delle piante da frutto. *Edizioni L'Informatore agrario*, pp 9-10.
- PRATES H.T., SANTOS J.P., WAQUIL J.M., FABRIS J.D., OLIVEREIRA A.B., FOSTER J.E., 1998. -Insecticidal activity of monoterpenes against *Rhyzopertha dominica* (F.) and *Tribolium castaneum* (Herbst). *J. Stored Prod. Res.*, 34:243-249.
- REGNAULT-ROGER C., VINCENT C., ARNASON J.T., 2012. -Essential Oils in Insect Control: Low-Risk Products in a High-Stakes world. *Annu. Rev. Entomol.*, 57:405-424.
- RICCI M., PADIN S., HENNING C., RINGUELET J., KAHAN A., 2010. - Cineol para el manejo integrado de *Myzus persicae* y *Brevicoryne brassicae* en repollo. *Bol. San.Veg.Plagas*, 36:37-43.
- RIM I.S., JEE C.H., 2006. -Acaricidal effects of herb essential oils against *Dermatophagoides farinae* and *D. pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae) and qualitative analysis of a herb *Mentha pulegium* (pennyroyal). *Korean J. Parasitol.*, 44:133-138.
- RODRIGUEZ E., HEALEY P.L., MEHLA I., 1984. -*Biology and Chemistry of Plant Trichomes*. New York: Plenum.

- RUSSO A., FORMISANO C., RIGANO D., SENATORE F., DELFINE S., CARDILE V., ROSSELLI S., BRUNO M., 2013. -Chemical composition and anticancer activity of essential oil of Mediterranean sage (*Salvia officinalis* L.) grown in different environmental conditions. *Food and Chemical Toxicology*, 55:42-47.
- SKOULA M., ABIDI C., KOCCALOU E., 1996. -Essential oil variation of *Lavandula stoechas* L. spp *stoechas* growing wild in Crete (Greece). *Biochemical Systematics and Ecology*, 24:255-260.
- TAK J.H., ISMAN M.B., 2015. -Enhanced cuticular penetration as the mechanism for synergy of insecticidal constituents of rosemary essential oil in *Trichoplusia ni*. www.nature.com/scientificreports
- TOMOVA B.S., WATERHOUSE J.S., DOBERSKI J., 2005. -The effect of fractionated *Tagetes* oil volatiles on aphid reproduction. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 115:153-159.
- TOUATI B., CHOGRANIB H., HASSENC I., BOUSSA M., TOUMID L., BRAHIMA N.B., 2011. -Chemical composition of the leaf and flower essential oils of Tunisian *Lavandula dentata* L.(Lamiaceae). *Chemistry and Biodiversity*, 8:1560-1569.
- TURINA A.V., NOLAN M.V., ZYGADLO J.A., PERILLO M.A., 2006. - Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. *Biophysical Chemistry*, 122:101-113.
- WALTHALL W.K., STARK J.D., 1997. -A comparison of acute Mortality and Population Growth Rate as Endpoints of Toxicological Effect. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 37:45-52.
- WANG J., ZHU F., ZHOU X.M., NIU C.Y., LEI C.L., 2006. -Repellent and fumigant activity of essential oil from *Artemisia vulgaris* to *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Stored Products Research*, 42:339-347.

YOON H.S., MOON S.C., KIM N.D., PARK B.S., JEONG M.H., YOO Y.H., 2000. -Genistein induces apoptosis of RPE-J cells by opening mitochondrial PTP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 276:151-156.