

La *Dasineura oleae* (Angelini, 1831) (Diptera: Cecidomyiidae), l'agente delle galle delle foglie di *Olea europaea* L., è sempre stata considerata solo un infestante secondario dell'oliveto poiché non reca alcun danno diretto alla produzione degli olivi. Tuttavia, recentemente sono stati registrati focolai gravi nel bacino del Mediterraneo. Il nostro risultato fa luce sulla potenziale alterazione che l'azione trofica di *D. oleae* può innescare sulla morfologia fogliare e su alcune attività fisiologiche delle foglie di olivo (*O. europaea* cv Frantoio), in quanto strettamente correlate all'accumulo di fotosintati e alla produzione di olive. La fotosintesi netta e la conduttanza stomatica erano significativamente inferiori solo nelle foglie infestate ($P = 0,0038$ e $P = 0,0487$, rispettivamente), inducendo a considerare che i sintomi della sofferenza sono limitati agli organi attaccati. L'allungamento dell'apice apicale nel controllo rispetto alle piante infestate non mostra alcuna differenza tra i due trattamenti. Il contenuto di polifenoli è stato analizzato nei tessuti circostanti le galle di *D. oleae* e non sono stati registrati deficit rispetto alle foglie di controllo. Sebbene le prove di laboratorio non rivelino effetti drammatici su queste attività fisiologiche, sono necessari ulteriori esperimenti per mettere in relazione l'alterazione fisiologica nel campo e la produzione di olive.

introduzione

Più di 13.000 specie di insetti sono classificate come induttori di galle (Stone e Schönrogge 2003; Espírito Santo e Ferdandes 2007), e tra loro la famiglia Cecidomyiidae (Ditteri) è il gruppo più rappresentativo al mondo (Espírito Santo e Ferdandes 2007; Huang et al. 2014). Incluse nei cecidomiidi, almeno cinque specie sono ospitate da *Olea europaea* nell'area mediterranea (Dogănlar et al. 2011). Tuttavia, solo due di loro inducono la pianta a produrre malformazioni sul tessuto che si nutrono e solo uno di questi due è specializzato su *O. europaea*: *Dasineura oleae* (Angelini, 1831), noto anche come il moscerino delle foglie di olivo (Dogănlar et al. 2011). Anche se *D. oleae* è autoctona dell'area mediterranea ed è sempre stata considerata un parassita secondario dell'olivo, focolai recenti e minacciosi inducono a considerare questo moscerino un grave parassita inducendo la formazione delle galle negli oliveti mediterranei (Dogănlar 2011; Simoglou et al. . 2012; Picchi et al. 2017). Il primo stadio larvale di *D. oleae* si nutre di foglie di olivo stimolando la produzione di tessuto extra e dando origine a deformità e gonfiori (Dogănlar et al. 2011; Tondini e Petacchi 2019). La caduta fogliare precoce si registra in caso di infestazioni intense e la pianta non può sviluppare nuove foglie durante la stagione di crescita (Batta 2019). Inoltre, gli induttori di galle possono alterare la relazione sorgente-pozzo nelle prestazioni delle piante infestate, disturbando l'equilibrio tra organi fotosintetici

e pozzi delle piante (p. Es., Fiori, germogli, radici e frutti) e competendo con questi ultimi (Dorchin et al. 2006), come il caso di una gallina fogliare appartenente al genere *Bruggmanniella* Tavares (Diptera: Cecidomyiidae) (Patel et al.2018).

In generale, le malformazioni fogliari dovute alle galle influenzano la capacità fotosintetica dell'ospite provocando carenze nei complessi pigmento-proteina, alterazione nella composizione dei nutrienti e minor contenuto di clorofilla e carotenoidi (Huang et al.2014). In diverse specie vegetali, l'attacco dei galler provoca una depressione della resa quantica del Photosystem II (Φ PSII) (Aldea et al.2006) correlata al danno fisico ai centri di reazione della PSII, come influenzato nel caso di *Carya glabra* (Miller) dalle galle di *Caryomyia* sp. (Diptera: Cecidomyiidae) (Aldea et al. 2006).

L'attività di alimentazione sugli organi delle piante provoca alterazioni sull'accumulo di fotosintato (Stone e Schönrogge 2003), di conseguenza, la quantità e la qualità della resa potrebbero essere compromesse (Martinez et al. 1992; DeClerck-Floate e Price 1994; Gonzales et al. 2005). Le perdite di rendimento sono state documentate nelle coltivazioni di riso asiatiche sotto gli attacchi di *Orseolia oryzae* (Wood-Mason) (Diptera: Cecid-omyiidae) (Bentur et al.2003; Vijaya Lakshmi et al.2006; Raman 2010), o nelle crocifere del

Nord America colture sotto *Contarinia nasturtii* (Kieffer) (Diptera: Cecidomyiidae) (Hallet and Heal 2001; Chen et al.2011). Anche se l'olivo è una delle colture più importanti del Bacino del Mediterraneo (Galán et al.2004; Oteros et al.2014; Diez et al.2015; Giunti et al.2016) non sono attualmente disponibili studi sull'influenza di *D. oleae* danni sulle prestazioni fotosintetiche, quantità e qualità dei frutti di olivo e tattiche di difesa utilizzate dalla pianta per resistere all'attacco del moscerino. Generalmente, nel tessuto con le galle, il contenuto di polifenoli è maggiore rispetto a quelli sani (Patel et al.2018). L'elevata produzione di polifenoli può essere interpretata come una serie di strategie di sopravvivenza. Probabilmente, è grazie a questa tattica di difesa che le piante attaccate da agenti delle galle generalmente sembrano non soffrire fortemente (Raman 2010).

Qui, indaghiamo sull'impatto delle galle di *D. oleae* sulla morfologia e sulla fisiologia delle foglie di olivo.

L'obiettivo è analizzare come le galle compromettano l'attività di scambio gassoso, la clorofilla un pigmento fluorescente e il contenuto di polifenoli nelle foglie di *O. europaea* cv Frantoio, poiché non sono attualmente disponibili informazioni su questi argomenti.

Materiali e metodi

Materiale vegetale e infestazione

Talee radicate di un anno di *O. europaea* cv. Il Frantoio è stato acquistato da un fornitore di vivai (SPO, Società Pesciatina Olivicola, Pescia-Pistoia-Italia) nell'aprile 2019. Piante uniformi sono state coltivate in vasi di plastica da 1,4 L contenenti torba di sfagno: pomice (1:1, v: v) e addestrato a un singolo tiro. Le piante sono state irrigate a goccia giornalmente e fertilizzate con 50 ml di soluzione Hoagland a metà resistenza dall'inizio dell'esperimento. Le talee radicate sono state posate singolarmente in gabbie cilindriche in PVC (diametro 25 cm, lunghezza 80 cm) dotate di un tessuto di chiffon trasparente (dimensione maglia 0,05 mm) per consentire l'aerazione. Sono stati tenuti in una camera climatica in condizioni controllate [24 ± 1 ° C, fotoperiodo 16: 8 (L: D)] fino alla fine dell'esperimento. Abbiamo separato le piante in due diversi trattamenti, infestati e di controllo, composti ciascuno da cinque talee radicate. L'infestazione è avvenuta dopo 10 giorni dalla messa in camera climatica per permettere l'acclimatazione delle piante.

Il tentativo di infestazione è stato effettuato utilizzando *D. oleae* pupae. Le pupe raccolte dal campo [Gavorrano, Grosseto-Italia (42,91 ° N, 11,00 ° E)] sono state stoccate a 4 ° C fino al maschio e alla femmina e ha avuto luogo il sesso. Il maschio e la femmina delle pupe mature di *D. oleae* sono chiaramente distinguibili a causa del dimorfismo sessuale, come documentato

per gli adulti: i maschi presentano un addome giallo-arancio, mentre le femmine ne hanno uno rosso (Talhok 1969). Poiché il rapporto tra i sessi di *D. oleae* presenta un pregiudizio a favore delle femmine nel rapporto di 2: 1 (Hallet e Heal 2001), abbiamo rispettato questa proporzione naturale posizionando 20 pupe femmine e 10 pupe maschi su due diverse piastre di Petri per ciascuna gabbia. Inoltre, una capsula Petri con carta da filtro precedentemente inumidita con 100 µl di acqua e soluzione di saccarosio (soluzione al 10%) è stata posta in ciascuna gabbia per l'alimentazione degli adulti non appena avvenuta l'emergenza. Dopo 2-3 giorni, gli adulti sono emersi e ha avuto luogo l'accoppiamento. I parametri fisiologici sono stati registrati dopo 40 giorni dall'infestazione, quando si sono verificate galle mature. Abbiamo deciso di non registrare i dati prima di questo periodo per evitare potenziali danni alle uova e alle giovani larve.

Osservazioni morfologiche

Sono state effettuate osservazioni morfologiche su campioni freschi infestati al fine di descrivere la modifica delle strutture fogliari interne dopo la formazione di *D. oleae* delle galle.

Inoltre, è stato registrato l'allungamento dell'apice vegetativo. All'inizio dell'infestazione, le piante sono state marcate all'apice e quindi è stato monitorato l'aumento della lunghezza del fusto. L'andamento

temporale dell'allungamento dei germogli apicali è stato registrato nelle piante di controllo e infestate al fine di capire se l'attacco di *D. oleae* potesse interferire con la crescita complessiva della pianta.

Stereomicroscopio Una parte dei campioni freschi è stata utilizzata per sezionare e analizzare le galle di *D. oleae* con uno stereomicroscopio (LEICA M205 C). È stata eseguita un'osservazione sulla superficie fogliare superiore e inferiore senza tagliare i campioni. Inoltre, le galle sono state sezionate dalla superficie fogliare superiore con un bisturi per chirurgia oftalmica (BD Beaver™ Xstar™ Safety Slit Knife, 2,75 mm, Double Bevel) per osservare lo stadio larvale che giace all'interno della galla.

Microscopio elettronico a scansione criogenica (Cryo-SEM)

Una diversa porzione dei campioni freschi è stata immediatamente crio-fissata mediante congelamento a immersione in azoto liquido (- 196 ° C) e ivi conservata, in uno stato congelato-idratato (FH), fino all'osservazione. I campioni FH sono stati montati in vapori di azoto liquido su tronchetti di alluminio con Tissue-Tek (Miles Inc., USA) e analizzati in un Philips SEM 515 (Philips, Paesi Bassi) equipaggiato con un'unità SEM Cryo SCU 020 (Bal-Tech, Balzers, Liechtenstein). Le strutture interne sono state realizzate

su piani di frattura ottenuti mediante fratturazione per congelamento dell'FH campioni. All'interno della camera di preparazione i campioni di FH sono stati mordenzati in superficie per 2 min a -80°C sotto alto vuoto ($P < 2 \times 10^{-4}\text{ Pa}$), ricoperti con 10 nm di oro in un'atmosfera di argon ($P < 2,2 \times 10^{-2}\text{ Pa}$) per produrre una superficie elettricamente conduttiva. I campioni sono stati quindi trasferiti alla fase fredda del SEM e analizzati a una temperatura inferiore a -160°C con una tensione di accelerazione di 8 kV. Le immagini SEM a scansione lenta sono state digitalizzate con una risoluzione di 768×576 pixel (256 livelli di grigio) ed elaborate con AnalySIS 2.1 (Soft-Imaging Software GmbH, Germania).

Parametri fisiologici

Le misurazioni sono state effettuate principalmente sulle foglie apicali, in quanto *D. oleae* deponeva le uova solo su foglioline tenere poste sulla sommità della talea radicata. Nei campioni infestati, l'area attaccata copriva meno del 50% dell'intera foglia. Per ogni pianta sono state effettuate misurazioni su 2 foglie, apicale e / o basale (Fig.1).

Pigmento di clorofille

Le variazioni nella concentrazione di clorofille durante l'esperimento sono state misurate utilizzando lo SPAD meter (SPAD502 Plus Chlorophyll Meter, Spectrum, Plainfield, IL, USA).

Dopo 60 giorni di infestazione, i campioni di foglie (dischi di 5 mm Ø) sono stati pesati e immediatamente congelati in azoto liquido e conservati a - 80 ° C fino al loro utilizzo. La concentrazione di clorofille è stata stimata sulla base del protocollo di Porra et al. (1988) utilizzando l'80% di acetone acquoso tamponato. Per questa analisi sono state utilizzate due differenti assorbanze (646,6 e 663,6 nm) selezionate sulla base dell'assorbanza massima delle clorofille.

Successivamente, l'assorbimento della concentrazione totale della clorofilla a + b è stata calcolata seguendo l'equazione di Lichtenthaler e Buschmann (2001).

Clorofilla una fluorescenza

La fluorescenza della clorofilla è stata monitorata per calcolare l'efficienza del fotosistema II (PSII) dopo 60 giorni di trattamenti. L'efficienza della PSII è stata valutata nelle foglie, dopo un adattamento al buio di 30 minuti, mediante un fluorometro a modulazione di ampiezza dell'impulso (PAM) (Hansatech FM2, Hansatech, Inc., UK). La resa di fluorescenza minima nello stato adattato al buio (F0) è stata rilevata sotto il

fascio modulante; la fluorescenza massima (F_m) è stata misurata dopo l'applicazione di un impulso di luce saturante [$8000 \mu\text{mol (fotone) m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 700 ms] e l'efficienza quantica massima del fotosistema II è stata determinata come F_v / F_m , dove F_v è la fluorescenza variabile, calcolata come differenza tra F_m e F_0 .

Lo scambio di gas

Gli scambi di gas istantanei sono stati registrati con un sistema di fotosintesi portatile (CIRAS-2 PP Systems, Hearts, UK) dotato di una camera fogliare di Parkinson. Sono state misurate la velocità fotosintetica (P_n) e la conduttanza stomatica (g_s). La temperatura e l'umidità della camera fogliare sono state regolate per mantenere una differenza di pressione del vapore tra foglia e aria di 1,1 kPa. La luce è stata mantenuta a $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Sono state effettuate analisi di scambio gassoso nelle foglie apicali e basali, al fine di verificare la risposta della pianta all'infestazione apicale. Le foglie basali non erano affatto attaccate e non erano vicine alle foglie infestate.

Concentrazione di polifenoli

Il contenuto fenolico totale delle foglie di olivo è stato determinato utilizzando il metodo Folin-Ciocalteu (FC) come precedentemente descritto da Altiok et al. (2008).

In breve, un volume di 0,1 mL di estratto è stato miscelato con 0,2 mL di reagente FC. Dopo 3 minuti è stato aggiunto 1 mL di Na₂CO₃ al 20% (m / v). Dopo la miscelazione, le miscele di reazione sono state incubate a 50 ° C per 30 min, seguite dalla lettura dell'assorbanza a 765 nm contro il bianco. Il bianco conteneva 0,1 mL di solvente di estrazione invece di un estratto. La curva di calibrazione è stata preparata con soluzioni standard di acido gallico (50–500 mg / L) solubilizzate in metanolo. La concentrazione dei fenoli totali è stata espressa in mg di equivalenti di acido gallico per g di campione (mg GAE / g di foglie fresche).

analisi statistica

L'esperimento è stato impostato in un disegno completamente randomizzato (n = 5), è stato eseguito un test t a due code per determinare la significatività statistica tra piante infestate e di controllo. Analisi statistiche e grafici sono stati eseguiti utilizzando il software Graph-Pad PRISM ®, versione 5.00.

Risultati

Osservazioni morfologiche

D. oleae è un parassita fogliare monofago di *O. europaea* e nei nostri esperimenti, le femmine di *D.*

oleae hanno deposto naturalmente le uova sulla superficie superiore dei lembi apicali. Dopo 7 giorni dall'infestazione sono stati chiaramente individuati i fori di ingresso (EnH) sulla superficie fogliare superiore (Fig. 2a) e sono state rilevate gallerie dovute all'attività trofica di *D. oleae* primo stadio larvale (Fig. 2a, 3). Le larve del primo stadio iniziano a nutrirsi scavando una leggera galleria (larga circa 80 μm , leggermente più larga del suo spessore) all'interno del tessuto parenchimatico spugnoso della foglia di olivo (Fig. 3). Le larve del secondo stadio (diametro del corpo intorno a 300 μm) si nutrono di strati fogliari più profondi (Fig. 4a, b), sebbene siano ancora incluse nel tessuto parenchimale spugnoso. Di conseguenza, il secondo stadio larvale produce gallerie più ampie di quelle del primo, in proporzione al suo diametro maggiore (Fig. 4c). Dopo circa 20 giorni dall'infestazione, era visibile un fiele gonfio contenente un secondo stadio larvale (Fig. 2b). Quando la bile è stata sezionata, la larva (Fig. 2c) e il danno meccanico (Fig. 4a, b) dovuto all'apparato boccale della larva (Fig. 4c) erano visibili. Sulla vista esterna della superficie fogliare inferiore (Fig. 2d) sono evidenti le esuvie pupali in corrispondenza dei fori di uscita (ExH). Il numero di gallerie per foglia non era uniforme (da 5 a 30 gallerie / foglia), probabilmente perché le prestazioni della prole variavano, sia tra foglie di piante diverse che all'interno di foglie della stessa pianta.

Inoltre, i dati sull'andamento temporale dell'allungamento dei germogli rivelano che nel primo periodo di formazione delle galle, l'andamento delle piante di controllo e infestate era molto simile (Fig. 5). Solo dopo 60 giorni dall'infestazione, la crescita dei germogli delle piante infestate è stata ridotta del 37% rispetto alle piante di controllo. Tuttavia, nessuna differenza significativa è stata evidenziata in nessun punto della misurazione (Fig. 5).

Analisi sul verde fogliare e sui pigmenti fotosintetici

Il verde fogliare, indicato dai valori di SPAD, non era diverso tra i due trattamenti durante gli esperimenti.

L'attacco di *D. oleae* non ha effetti negativi sui pigmenti fotosintetici clorofilla a e b (Fig. 7a).

Scambio gassoso e clorofilla a fluorescenza

La fotosintesi netta e la conduttanza stomatica sono state valutate in foglie di controllo apicali e basali rispetto a piante infestate al fine di evidenziare le prestazioni di scambio di gas di *O. europaea* cv Frantoio dopo l'attacco di *D. oleae*. L'irritazione causata da *D. oleae* ha ridotto le prestazioni fotosintetiche e la conduttanza stomatica nel fogliame apicale del Frantoio (Fig. 6a, b).

Le foglie infestate apicali presentano un calo significativo sia per la fotosintesi netta (-35%) che per la conduttanza stomatica (-28%) rispetto alle foglie apicali di controllo. Inoltre, le foglie basali sono state analizzate separatamente, al fine di verificare se la mancanza di prestazioni fotosintetiche fosse localizzata solo nelle foglie apicali o se fosse estesa anche al fogliame basale della stessa pianta (Fig. 6c, d). Nessun deficit di prestazione fotosintetica è stato registrato sul fogliame basale.

Inoltre, i dati sulla fluorescenza della clorofilla, confermano che le foglie apicali delle piante infestate non sembrano compromesse dall'attacco di *D.oleae* poiché l'intervallo dei valori F_v / F_m era $0,83 \pm 0,014$ per le piante di controllo mentre nelle piante infestate era $0,83 \pm 0,02$ (Fig. 7b).

Contenuto totale di polifenoli

La quantità totale di polifenoli è stata valutata nel controllo rispetto alle foglie apicali del Frantoio infestate. I polifenoli totali erano compresi tra $5,6 \pm 3,8$ e $4,2 \pm 4,3$ (equivalenti di acido gallico g FW) rispettivamente nelle foglie di controllo e infestate. L'analisi statistica non mostra differenze significative tra i due trattamenti ($P = 0,4910$) (Fig. 8).

Discussione

La morfologia della cistifellea varia considerevolmente in tutti i possibili tratti a seconda delle specie di induttori della cistifellea (Oliveira et al.2016). L'azione di alimentazione dei galle provoca cambiamenti nella struttura fogliare che può includere anche modifiche strutturali nei tessuti clorofilliani (Castro et al. 2012). Gli agenti galligeni presentano una biologia e una fisiologia molto sofisticate a causa di un'evoluzione interdipendente con la pianta ospite (Patel et al.2018). Questa caratteristica li rende utenti incomparabili delle risorse host (Raman et al.2005; Schaefer et al.2005; Shorthouse et al.2005; Raman 2010). I cecidomiidi di solito pungono con le loro mandibole le cellule epidermiche della foglia ospite per nutrirsi (Rohfritsch 1978).

L'azione delle larve di *D. oleae* inizia non appena emerge il primo stadio larvale. Inizialmente provoca una formazione a galleria che interessa solo lo strato superficiale del tessuto parenchimale della spugna. Secondo Dogănlar et al. (2011) e Batta e Dogănlar (2020), in ogni galleria abita una sola larva. Per quanto riguarda il caso delle galle di *Urophora cardui* L. (Diptera: Tephritidae) (Lalonde e Shorthouse 1985), i nostri risultati indicano che il tasso di crescita del volume della galla segue il tasso di crescita delle larve. Tuttavia, sebbene la dimensione del terzo stadio larvale

è molto maggiore del secondo, il danno anatomico è pressoché lo stesso. Sebbene il danno morfologico sembri poco minaccioso, sia i fori di ingresso che quelli di uscita potrebbero essere utilizzati come ingressi da parte del microrganismo, come nel caso del fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig e Saccardo), che nelle foglie di mango sfrutta i fori di uscita di *Procontarinia schreineri* Harris (Diptera: Cecidomyiidae) galle (Harris 1992). Arambourg (1986) ha ipotizzato che *Pseudomonas savastanoi* (Smith) potesse provocare danni patologici indiretti sulle foglie di ulivo dopo aver invaso i fori di uscita di *D. oleae*. L'andamento temporale della crescita apicale suggerisce che l'azione nutritiva di *D. oleae* non influenzi l'allungamento dei germogli delle piante di Frantoio, almeno entro 60 giorni dal punto di inizio dell'infestazione, ma si potrebbe ipotizzare un chiaro effetto sulla riduzione della crescita dei germogli in tempo più lungo. Riguardo ai cecidomiidi, Tscharntke (1989) ha studiato la crescita dei germogli di *Phragmites australis* (Cavanilles)

Fig. 3 Microscopia elettronica a scansione criogenica. Esemplare congelato-idratato della superficie fogliare superiore di *O. europaea* cv Frantoio, soggetto a frattura da gelo tangenziale per esporre lo sviluppo iniziale di una galleria prodotta da *D. oleae* primo stadio larvale

Fig.4 Microscopia elettronica a scansione criogenica. una foglia di Frantoio congelata idratata congelata trasversalmente. Nel mezzo del tessuto parenchimatico spugnoso (b) è visibile una galleria (700 μm di larghezza x 400 μm di altezza), ascrivibile, per dimensioni, ad un secondo stadio larvale di *D. oleae*. Vista ventrale della larva di secondo stadio di *D. oleae* (circa 300 μm di larghezza) (c). Nell'angolo in alto a destra è visibile la testa con la bocca (m) al centro

Trinius ex Steudel dopo l'attacco di una specie che provoca galle, *Giraudiella inclusa* (Frauenfeld). L'azione nutritiva di questo moscerino non ha provocato l'accorciamento dei germogli, al contrario, sembra che il danno provocato da *G. inclusa* stimoli l'allungamento dell'internodo attaccato (Tscharntke 1989).

In questo studio si verifica anche l'influenza di *D. oleae* galle sulle prestazioni fotosintetiche delle foglie della cultivar Frantoio. La fotosintesi netta e la conduttanza stomatica hanno mostrato una riduzione significativa e circoscritta delle prestazioni nelle foglie infestate rispetto a quelle di controllo. Le piante del Frantoio, infatti, sembrano localizzare il suo stress fisiologico proprio nelle foglie attaccate mentre il resto della pianta non mostra alcun sintomo di sofferenza. Questi risultati seguono le osservazioni fatte da Florentine et al. (2005)

riguardante l'effetto di un insetto che induce il fiele, *Epiblema strenuana* (Walker) (Lepidoptera: Tortricidae) sulle foglie di *Parthenium hysterophorus* L.. Un calo delle prestazioni fotosintetiche è descritto anche nelle foglie di castagno europeo attaccate da *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu (Hymenoptera: Cynipidae) (Ugolini et al.2014). La depressione fisiologica è anche registrata da Larson (1998) su *Prunus serotina* Ehrhart e *Rhus glabra* Foglie di L. galled, in cui il tasso fotosintetico è ridotto del 24–52% rispetto a quelle non gallate (Larson 1998).

Per quanto riguarda i cecidomiidi, sono attualmente disponibili pochi studi che si riferiscono a questo argomento. Huang et al. (2015) hanno dimostrato che l'attacco di *Bruggmanniella* sp. non compromettere la conduttanza degli stomi di *Litsea acuminata* (Blume). Gli autori non mostrano differenze tra trattamenti di controllo e infestati anche per il parametro F_v / F_m indicando che l'attività di irritazione non influenza l'efficienza PSII di *L. acuminata*, in accordo con i nostri risultati sulle foglie di Frantoio. Sebbene il parametro di fluorescenza F_v / F_m sia considerato un indicatore precoce dello stress delle piante, nella nostra condizione sperimentale, il danno di *D. oleae* non ha influenzato questo valore. Infatti, 0,83 è nella gamma di valore ottimale per molte specie di piante (Maxwell e Johnson 2000).

Inoltre, le prestazioni delle clorofille sono in accordo con i dati di Huang et al. (2015) sulle foglie di *L. acuminata* attaccate da *Bruggmanniella* sp., Poiché non è stata registrata alcuna differenza tra le piante di controllo e quelle attaccate. Altri ceci-domyiidi invece, come *Daphnephila* sp. sulle piante di *Machilus*, provocare una diminuzione del contenuto di clorofilla dell'ospite (Yang et al. 2003; Pan et al. 2015) indicando la variabilità dell'interazione tra pianta e attacco di insetti.

Durante la formazione di galle, si sono verificati alcuni cambiamenti biochimici e anatomici nelle aree attaccate. Contrariamente ai normali tessuti vegetali, le galle devono affrontare uno stress ossidativo molto forte (Patel et al.2018). La sintesi di triterpene, acido gallico, etil gallato, catechina, epicatechina, acido tannico e resina è necessaria per contrastare l'azione delle specie reattive dell'ossigeno (Huang et al.2015; Patel et al.2018). Questo è il motivo per cui, in generale, il contenuto di polifenoli totali aumenta maggiormente nelle aree soggette a escoriazioni rispetto ai tessuti circostanti non scorticati (Dsouza e Ravinshankar 2014; Hall et al.2017; dos Santos Isaias et al.2018), a seconda dei casi di *Ficus glomerata* Roxburgh lascia dopo l'attacco dell'agente bile *Pauropsylla depressa* Crawford (Homoptera: Psyllidae) (Dsouza e Ravinshankar 2014). Risultati simili sono

descritti anche su fusti di *Ziziphus mauritiana* Lamark attaccati da una vespa calcide sconosciuta (Purohit et al. 1979). Dati di Kot et al. (2017) sulle galle fogliari di cinipidi nelle querce hanno suggerito che sia le galle da sole che le foglie dissestate presentano un valore significativamente più alto nei polifenoli totali rispetto al fogliame sano. Diverse indagini hanno confrontato solo le galle da sole rispetto alle foglie di controllo, come il caso di Gupta (2011) che ha rivelato che le foglie di *Dalbergia sissoo* Roxburgh, *Salvadora oleoides* Decaisne e *Salvadora persica* Wallich hanno mostrato un valore significativamente più alto del contenuto di polifenoli nelle sole galle rispetto a quelle sane. tessuto (Gupta 2011). I ricercatori spiegano l'aumento del contenuto di polifenoli negli organi infestati, come strategia della pianta per contrastare il rischio di attacchi nemici naturali e infezione da patogeni (Inbar et al.2003; Kot et al.2017).

Nel nostro studio, i campioni per la concentrazione di polifenoli sono stati selezionati in modo casuale senza discernere le aree delle foglie danneggiate o non gallate e questo potrebbe essere il motivo per cui non abbiamo rilevato alcuna differenza su questo parametro.

Per quanto a nostra conoscenza, non sono attualmente disponibili studi sulla riduzione della resa dei frutti di olivo causata da *D. oleae*. Tuttavia, la gravità

dell'intensità dell'attacco di *D. oleae* è molto alleggerita in alcuni lavori, come Al-Tamimi (1997), in cui è riportato un livello molto elevato di infestazione in frutteti economicamente importanti in Giordania sono stati infestati) (Al-Tamimi 1997; Dogănlar et al.2011). Dogănlar et al. (2011) hanno ipotizzato che in situazioni simili i parametri fotosintetici della pianta potrebbero essere fortemente influenzati dall'alterazione morfologica del tessuto parenchimale della spugna dovuta all'azione nutritiva di *D. oleae*. La prospettiva è un calo della resa delle olive, a causa di una forte defogliazione della chioma (Dogănlar et al.2011; Simoglou et al.2012; Tondini e Petacchi 2019).

Fig. 7 Concentrazione di pigmenti di clorofilla (Chl a + b) nel controllo rispetto alle piante infestate (a). Parametro di fluorescenza della clorofilla (F_v / F_m) tra il controllo e le piante infestate (b). Il test t a due code è stato eseguito per determinare la significatività statistica tra le piante infestate rispetto a quelle di controllo ($n = 5$). $P \leq 0,05$

Fig. 5 Andamento temporale delle misurazioni SPAD del controllo rispetto alle piante infestate e andamento temporale dell'allungamento dei germogli (cm) del controllo rispetto alle piante infestate. I dati sono stati analizzati con il test t a due code per determinare la significatività statistica tra le piante infestate rispetto a quelle di controllo ($n = 5$). Ns non significativo; $P \leq 0,05$

Fig. 8 Contenuto di polifenoli totali (GAeq / g FW) nel controllo rispetto alle foglie infestate di *O. europaea* cv Frantoio. Il test t a due code è stato eseguito per determinare la significatività statistica tra le piante infestate rispetto a quelle di controllo (n = 5). $P \leq 0,05$

Fig. 6 Fotosintesi netta (P_n) e conduttanza stomatica (g_s) nel controllo rispetto alle foglie infestate apicali (a, b) e basali (c, d) di *O. euro-paea* cv Frantoio. Il test t a due code è stato eseguito per determinare la significatività statistica tra le piante infestate rispetto a quelle di controllo (n = 5). $P \leq 0,05$

Sebbene l'olivo sia una delle colture più importanti del bacino del Mediterraneo, si sa poco dei suoi parassiti minori. Recentemente, focolai inattesi di *D. oleae* hanno spinto gli scienziati a fare luce sulla gravità dell'attacco di *D. oleae* alla fisiologia vegetale e alla biochimica. Questo studio ha dimostrato che sia la fotosintesi netta che la conduttanza stomatica sono significativamente ridotte nelle foglie infestate rispetto a quelle sane, mentre non sono state registrate differenze significative tra i due trattamenti sulla fluorescenza della clorofilla, sulla quantità di pigmenti fotosintetici e sul contenuto di polifenoli totali. Poiché gli studi su questi temi sono scarsi e mancano le

esperienze sul campo, sono urgentemente richieste ulteriori indagini per valutare i danni di *D. oleae* sullo stato di salute della pianta e conseguentemente sulla produzione di frutti di olivo. Gli studi sul campo saranno fondamentali per capire quando si verifica un danno significativo, e conseguentemente per formulare le soglie economiche, base fondamentale della Disinfestazione Integrata.