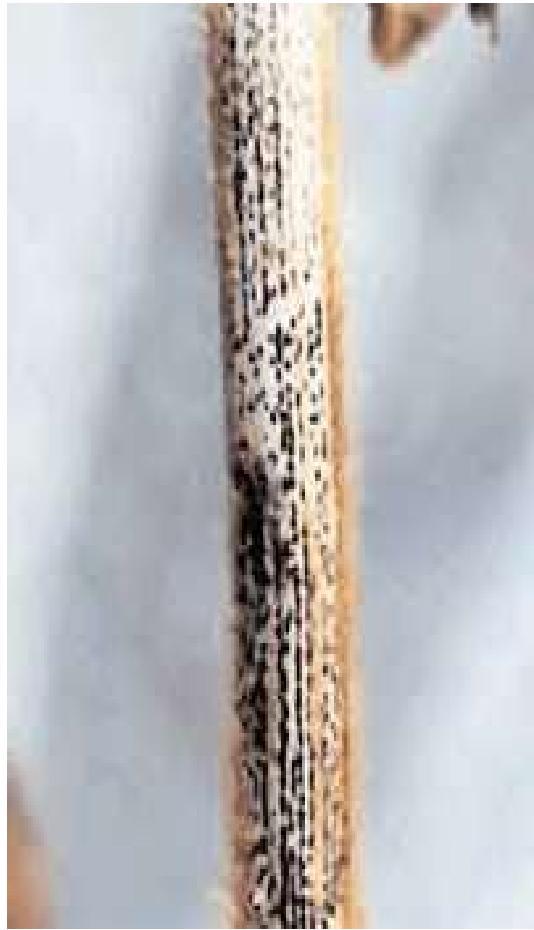


Complesso *Diaporthe/Phomopsis*

**(deterioramento dei semi, avvizzimento del fusto e del baccello e
cancro dello stelo della soia)**

Generalità e procedura di analisi delle sementi

Alessandro Romano, Mauro Dal Prà, Romana Bravi



Laboratorio CREA-DC di Lonigo

Introduzione

Il complesso fungino *Diaporthe/Phomopsis*, segnalato per prima volta in Italia nel 1977, è l'agente causale di alcune tra le fitopatie più deleterie a carico della soia (*Glycine max L.*) nella maggior parte dei paesi in cui si coltiva questa specie. Sebbene in misura diversa, la malattia interessa differenti organi della pianta. Relativamente alla produzione sementiera, il danno a carico dei semi è considerato quello più rilevante. In prossimità della raccolta, una consistente infezione, associata a condizioni meteorologiche favorevoli per lo sviluppo del patogeno, può provocare una riduzione in peso dei semi sino al 10% e una riduzione della germinabilità di oltre il 50% in varietà suscettibili.

Tale fitopatia, oltre a ridurre la vitalità e la quantità del seme prodotto, riduce sensibilmente anche il valore qualitativo dei semi destinati all'utilizzo alimentare, alterandone contenuto in olio e composizione. Semi infetti possono contenere micotossine potenzialmente letali per specie avicole qualora siano utilizzati come mangime.

Agente causale

Dal punto di vista tassonomico, il genere *Diaporthe* appartiene alla divisione degli ascomiceti, ordine *Diaporthales*, e comprende diverse specie, tra le quali *Diaporthe phaseolorum*, suddivisa a sua volta in varietà associate a una specifica sintomatologia rilevabile sulle piante colpite:

- *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* (S. G. Lehman) Wehmeyer (anamorfo: *Phomopsis phaseoli*), agente dell'avvizzimento del fusto e del baccello
- *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* K. L. Athow e R. M. Caldwell (anamorfo: *Phomopsis phaseoli*), agente del cancro dello stelo
- *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* Fernández (anamorfo: *Phomopsis phaseoli*), agente del cancro dello stelo.

Allo stesso ordine appartiene la specie *Phomopsis longicolla* T.W. Hobbs (teleomorfo sconosciuto), agente del deterioramento dei semi della soia.

P. longicolla, assieme alle varietà di *Diaporthe phaseolorum* costituisce il complesso fungino noto come *Diaporthe/Phomopsis*. Tale patogeno può anche attaccare altre colture tra le quali il ginestrino (*Lotus corniculatus L.*), il fagiolo comune (*Phaseolus vulgaris L.*), il fagiolo di lima (*Phaseolus lunatus L.*) e il fagiolino dall'occhio (*Vigna unguiculata L.*). Danni economicamente rilevanti si hanno, tuttavia, solamente su soia.

Epidemiologia

Il fungo sverna sotto forma di picnidi sui residui vegetali infettati nella stagione precedente. Nel caso delle varietà di cui esiste anche il teleomorfo, si può avere una transizione dalla forma imperfetta a quella perfetta con formazione di periteci che sverneranno ugualmente sui residui infetti.

Durante la stagione vegetativa, all'interno di picnidi e periteci si forma un gran numero di spore, conidi e ascospore rispettivamente, che verranno liberate e trasportate dagli schizzi di pioggia sulla coltura in corso. In presenza di un velo d'acqua, le spore microscopiche germinano nel giro di poche ore penetrando all'interno dei tessuti, in particolare quelli immaturi, senescenti o ammalati. Foglie ombreggiate o invecchiate e branche laterali danneggiate da vento, grandine, insetti, o dal peso dei baccelli, rappresentano quindi gli organi più vulnerabili.

L'infezione inizia normalmente alla base della pianta e si diffonde sulle parti più alte attraverso il sistema vascolare sino a raggiungere steli e baccelli in via di sviluppo. L'infezione primaria ha anche origine dall'utilizzo di semente infetta che riduce sensibilmente la percentuale di germinazione.

I baccelli possono essere infettati in qualsiasi momento durante il loro sviluppo. Tuttavia, prolungati periodi con elevata umidità e temperature superiori ai 21°C tra la fine della fioritura e l'inizio di formazione del baccello favoriscono sensibilmente il progredire dell'infezione. Anche un'alternanza di clima secco e umido favorisce il danno a carico dei baccelli. In concomitanza con l'ingiallimento del baccello, le colonie fungine possono propagarsi ai semi provocandone il deterioramento.

Nella fase iniziale, le infezioni sui semi sono concentrate sui nodi più bassi. Successivamente, se la raccolta è ritardata e avviene in condizioni di clima caldo e umido, esse si diffondono su tutta la pianta. La percentuale di semi infetti diminuisce all'aumentare del periodo di conservazione; tuttavia, il fungo può rimanere vitale nei semi per almeno due anni se gli stessi sono conservati in luogo fresco e asciutto.

Sintomi

Deterioramento dei semi della soia

Le infezioni a carico dei semi sono principalmente causate da *Phomopsis longicolla*, agente del deterioramento dei semi della soia.

Inizialmente il fungo colonizza i tegumenti seminali passando, successivamente, su cotiledoni e piumetta. Il micelio invade gli ovuli e i semi in via di sviluppo attraverso funicolo e ilo.

I semi infetti si presentano allungati, avvizziti, fessurati o appiattiti e possono essere parzialmente o totalmente ricoperti da una muffa biancastra con talora picnidi visibili. Tuttavia, anche semi apparentemente sani possono ospitare il fungo al di sotto del tegumento ed avere germinabilità e qualità ridotta.

Successivamente, nel corso della germinazione, il fungo si accresce rapidamente e può causare l'appassimento del germinello o la formazione di germinelli poco vigorosi. Sulla superficie esterna dei cotiledoni compaiono lesioni necrotiche inizialmente puntiformi, in grado di estendersi successivamente sino a ricoprirne tutta la superficie. Inizialmente le lesioni si presentano clorotiche e idropiche; successivamente virano al bruno rossastro assumendo una consistenza rigida.

Nei germinelli colpiti il tegumento aderisce saldamente ai cotiledoni, impedendone l'apertura dopo l'emergenza. Tuttavia, entro due settimane dall'emergenza, i germinelli acquisiscono una certa tolleranza e i sintomi tendono a scomparire.

Avvizzimento del fusto e del baccello

L'agente dell'avvizzimento del fusto e del baccello è rappresentato da *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae*. I sintomi consistono nella comparsa di un gran numero di picnidi sparsi, di colore nero e puntiformi, sulla superficie dei pezioli infettati che, in genere, si staccano prematuramente dallo stelo. Sintomi su foglie infette possono non essere visibili, ma quando presenti, consistono in lesioni di colore grigio cenere con margini stretti e acquosi che compaiono dapprima sulle foglie più basse, già indebolite dall'ombreggiamento o dall'attacco di altri patogeni. L'intera foglia assume colore grigio e muore quando l'infezione progredisce verso i pezioli. Picnidi disposti in file parallele ricoprono lo stelo di piante mature, caratteristica che permette di distinguere il patogeno da altre specie che producono corpi fruttiferi disposti sul fusto in modo irregolare (*Colletotrichum truncatum*, *Macrophomina phaseolina*). I baccelli presenti su branche laterali spezzate e su nodi più bassi sono generalmente i primi a mostrare i sintomi dell'infezione, che consistono in lesioni di colore marrone attorno a ferite naturali preesistenti e attorno ai tricomi (fig. 1). Lesioni originatesi dai peduncoli possono espandersi verso il basso e invadere i tessuti del baccello. Le infezioni precoci possono causare aborto, mentre infezioni tardive causano la formazione di baccelli piatti a causa di una riduzione del riempimento degli stessi. I baccelli scarsamente sviluppati, disseccati o morti ospitano un gran numero di picnidi sparsi. Quindi, analogamente a quanto causato da *P. longicolla*, anche *D. phaseolorum* var. *sojae* può colpire i semi, e i germinelli che da essi avranno origine presenteranno lesioni arancioni sui cotiledoni e macchie rossastro/marroni sull'ipocotile. I baccelli ricoperti da picnidi contengono, in genere, semi marci coperti con un bianco micelio appartenente alle due specie (fig. 2).

Cancro dello stelo

Gli agenti causali del cancro dello stelo sono rappresentati da *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* e var. *meridionalis*. Lesioni necrotiche sugli steli appaiono normalmente dopo la fase intermedia dello sviluppo dei baccelli, e sono in genere visibili in corrispondenza dei nodi. Le lesioni, di forma ellittica e lunghe in genere 2-3 cm, sono inizialmente di colore rosso vivo ma successivamente imbruniscono e diventano leggermente affossate.



Figura 1 – Lesioni su baccelli infetti e su stelo (Fonte: A. Tenuta and D. Mueller, Crop Protection Network)



Figura 2 – Semi all'interno di baccelli attaccati dal complesso *Diaporthe/Phomopsis* (Fonte: E. Stoetzer and D. Mueller, 2018)

Talvolta, queste lesioni possono allargarsi provocando una strozzatura del fusto, con conseguente morte della pianta per interruzione del flusso di acqua e di nutrienti. Numerosi picnidi possono disporsi in piccoli gruppi vicino ai nodi (var. *caulivora*) (fig. 3-a) o possono ricoprire buona parte del fusto, disponendosi in file parallele, principalmente sulla parte bassa (var. *meridionalis*) (fig. 3-b). Nel corso di stagioni calde e asciutte, esse si trovano solo su limitate aree dei fusti e delle branche vicino al terreno.



Figura 3 – Picnidi presenti sullo stelo: a) raggruppati in prossimità del nodo (var. *caulivora*); b) disposti in file parallele (var. *meridionalis*) (Fonte: L. Riccioni and K. Petrovic, 2012)

Difesa

Al fine di contenere la fitopatia, è consigliata la semina in periodi dell'anno che garantiscano la maturazione del baccello in condizioni di bassa umidità atmosferica, così come la raccolta della soia non appena matura, limitando il periodo di permanenza sulla pianta che, soprattutto in condizioni di clima caldo e umido, provocherebbe un aumento dell'incidenza della malattia. Sarà opportuna l'adozione di un'appropriata densità di semina che, da una parte, eviti un eccessivo sviluppo delle branche laterali che potrebbero spezzarsi ed essere più vulnerabili all'attacco del patogeno e, dall'altra, non crei un ambiente eccessivamente umido e poco arieggiato, predisponente alla crescita del fungo. Risulta inoltre raccomandata un'adeguata concimazione potassica, l'uso di fungicidi fogliari e l'adozione di rotazioni culturali con specie non suscettibili alla malattia.

Relativamente alle sementi, al fine di limitarne la contaminazione, sarà importante ridurre celermente le fonti di inoculo a contatto con le stesse, ripulendole da residui di fusti o baccelli potenzialmente infetti. Un trattamento fungicida consentirà un aumento della percentuale di germinazione. L'utilizzo di semente certificata costituisce una garanzia per l'ottenimento di una coltura esente o con una bassa incidenza della malattia.

Aspetti normativi

La direttiva 2002/57/CE del Consiglio del 13/06/2002, relativa alla commercializzazione delle sementi di piante oleaginose e da fibra, recepita in Italia dal DPR 08/10/1973 n. 1065 e successive modifiche e integrazioni, modificata dalla direttiva di esecuzione (UE) 2020/177 della Commissione dell'11 febbraio 2020, include, tra gli Organismi Regolamentati Non da Quarantena (ORNQ), i funghi del complesso *Diaporthe/Phomopsis* (allegato II, parte I, punto 5). Il Decreto Legislativo n.20 del 2 febbraio 2021, (Norme per la produzione a scopo di commercializzazione e la commercializzazione di prodotti sementieri), in adeguamento della normativa nazionale al Regolamento (UE) 2016/2031 e Regolamento (UE) 2017/625, prevede una soglia di tolleranza per le sementi, relativa al complesso *Diaporthe/Phomopsis* (ORNQ), pari al 15% di semi infetti per tutte le categorie di sementi di soia. Pertanto, ai fini della commercializzazione delle sementi di soia, è necessario verificare tramite specifiche analisi di laboratorio, la presenza del suddetto ORNQ per garantire il soddisfacimento dei requisiti fitosanitaria previsti dalla normativa vigente.

Analisi di laboratorio

Il metodo di analisi utilizzato è basato sul protocollo n. 7-016 (2021) "Detection of *Phomopsis* complex in *Glycine max* (soybean, soya bean) seed" dell'International Seed Testing Association (ISTA) con opportuni adattamenti derivanti dall'esperienza acquisita in laboratorio.

Preparazione del campione di analisi

L'analisi per la ricerca del complesso *Diaporthe/Phomopsis* viene effettuata su un campione costituito da 400 semi di soia prelevati dal campione medio finale di prelevamento giunto in laboratorio. I semi di ciascun campione di analisi vengono mantenuti in contenitori sterili in attesa di essere sottoposti alle successive procedure.

Disinfezione del seme, semina in PDA e incubazione

Principio del metodo

Lo scopo della disinfezione del seme è quello di ridurre il più possibile lo sviluppo di eventuali altre specie fungine e batteriche presenti sulla superficie esterna del tegumento che potrebbero interferire con la crescita di *Phomopsis* e rendere più difficoltosa la lettura delle piastre. Il complesso *Diaporthe/Phomopsis* è normalmente localizzato sotto i tegumenti, e quindi non risente del trattamento disinsettante.

Il Potato Dextrose Agar (PDA) è utilizzato come substrato su cui fare sviluppare colonie fungine. È composto da un infuso di patata e dallo zucchero destrosio (glucosio) che permettono la crescita dei funghi, cui è aggiunto l'agar come agente solidificante. Tale terreno di coltura viene addizionato con

acido lattico in modo da creare un pH che inibisca ulteriormente la crescita dei batteri. Il substrato non è comunque selettivo nei confronti delle diverse specie fungine.

Procedura

Il seme viene disinfeccato tramite immersione in una soluzione di ipoclorito di sodio all'1% per 30 secondi, quindi viene sciacquato in acqua bidistillata sterile per due volte e messo ad asciugare su carta da filtro sterile sotto cappa a flusso laminare orizzontale (fig. 4). Successivamente, i semi di ogni campione vengono adagiati all'interno di capsule Petri contenenti PDA acidificato, preparate in precedenza (v. allegato 2), in numero pari a 10 per piastra, avendo cura di mantenerli il più possibile distanziati tra loro. Le piastre, oltre ad essere singolarmente numerate, riportano anche il numero con cui il campione è stato registrato in laboratorio nonché la data indicante l'inizio dell'incubazione. Dopo aver posto i semi al loro interno, le capsule vengono disposte in pile da 10 e avvolte in pellicola trasparente in modo da prevenire un eventuale disseccamento (fig. 5). Le stesse vengono incubate al buio per 7 giorni a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$.



Figura 4 – Seme disinfeccato posto ad asciugare su carta da filtro sterile sotto cappa a flusso laminare



Figura 5 – Piastre pronte per essere incubate

Valutazione morfologica del micelio fungino

Dopo 7 giorni di incubazione si osservano le piastre ad occhio nudo o con l'ausilio di uno stereomicroscopio. I semi infetti si presentano ricoperti da un micelio denso, bianco e fioccoso, che tende ad espandersi sul terreno circostante, con picnidi di forma globosa e/o corpi stromatici, entrambi

di colore nero, che si rendono meglio visibili aumentando la durata dell'incubazione. Spesso è presente un essudato di colore ambrato che si forma in corrispondenza dell'ostiolo dei picnidi, apparendo talvolta sotto forma di cirro (fig. 6).



Figura 6 – Colonia di *Diaporthe/Phomopsis* dopo 7 giorni di incubazione a 25°C con essudato di colore ambrato



Figura 7 – Piatra con presenza di tre distinte colonie fungine separate da setti ben visibili

I periteci, di forma globosa, colore nero e “becco” allungato prodotti da *Diaporthe phaseolorum*, non si rinvengono, normalmente, in piastre con semi provenienti da aree esenti dal fungo. Al fine di determinare correttamente il numero di semi infetti all'interno di ciascuna piastra, bisognerà individuare eventuali setti che separano una colonia dall'altra, visibili anche sul retro della piastra. È infatti frequente che una colonia sviluppatisi da un unico seme ricopra anche altri semi originariamente non infetti. Nel caso di più colonie, le stesse tenderanno a non confluire tra di loro e a mantenersi separate (fig. 7). Inoltre, è di fondamentale importanza distinguere il complesso fungino da altre specie che, inevitabilmente, si svilupperanno all'interno delle piastre, alcune delle quali con aspetto del micelio simile alla *Diaporthe* (specie di *Fusarium* con micelio bianco) oppure con acervuli (*Colletotrichum dematium* var. *truncata*) o periteci (*Glomerella glycines*) simili ai periteci e ai picnidi di *Diaporthe phaseolorum* e della sua forma imperfetta. Per facilitare il riconoscimento del patogeno, potrà essere utile mantenere in laboratorio, come riferimento, piastre con colonie note del patogeno, ottenute da semi infetti.

Osservazione al microscopio ottico

Normalmente, ai fini della certificazione delle sementi, un esame visivo da parte di un analista qualificato è sufficiente per determinare la presenza e il numero di semi infetti. Tuttavia, nel caso si voglia effettuare un'analisi più approfondita, sarà necessario l'uso di un microscopio ottico in modo da individuare le caratteristiche morfologiche di conidi e ascospore.

È possibile distinguere due diversi tipi di conidi:

- Alfa-conidi, ialini, non settati e arrotondati alle estremità, di forma dritta o ellissoidale e dimensioni pari a $4.5\text{--}11.0 \times 1.5\text{--}3.5 \mu\text{m}$ (fig. 8-a).
- Beta-conidi, aghiformi, talvolta ricurvi o inclinati, ialini e di dimensioni pari $7.5\text{--}35.0 \times 0.8\text{--}1.8 \mu\text{m}$ (fig. 8-b).

La maggioranza dei picnidi produce solo alfa-conidi, alcuni picnidi producono alfa e beta-conidi, mentre raramente si ha la produzione di soli beta-conidi.

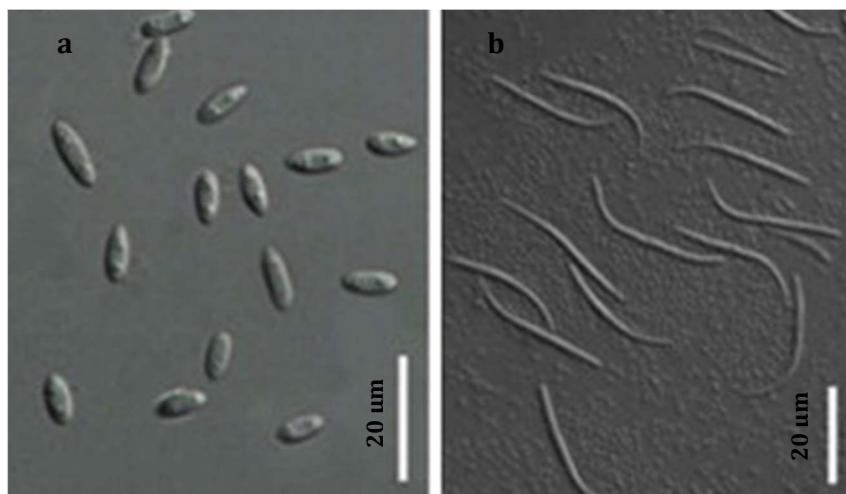


Figura 8 – Alfa-conidi (a) e beta-conidi (b) del complesso *Diaporthe/Phomopsis*
(Fonte: A.J. Dissanayake et al., 2015)

Nel caso delle forme perfette del fungo, è possibile anche una caratterizzazione morfologica delle ascospore, le quali possono presentarsi:

- ellissoidali, con le estremità leggermente appuntite e con un restringimento in corrispondenza dell'unico setto, dimensioni a partire da $4.4\text{--}6.3 \times 1.6\text{--}2.1 \mu\text{m}$ sino a $8.6\text{--}11.8 \times 3.0\text{--}3.9 \mu\text{m}$ (fig. 9).
- fusiformi, sebbene meno frequentemente, ricurve senza costrizioni e ottuse a ciascuna estremità con dimensioni pari a $7.5\text{--}10.5 \times 2.0\text{--}2.7 \mu\text{m}$.



Figura 9 – Ascospore di *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* all'interno di un asco (Fonte: J.M. Santos et al., 2011)

Espressione del risultato finale

I risultati di analisi vengono riportati su un'apposita scheda indicando il numero di semi infetti presenti all'interno di ogni piastra. La somma dei semi infetti di tutte le piastre del campione sul totale di 400 semi, espressa in valore percentuale, darà il valore finale.

Alla luce delle attuali disposizioni legislative, un campione viene ritenuto **positivo**, e quindi non idoneo alla certificazione, quando il numero di semi infetti supera il 15%.

Principali strumenti e materiale di laboratorio occorrenti

- Coltura di riferimento *di Diaporthe/Phomopsis* o campione riconosciuto come infetto
- Becher di volume 250 mL e bottiglie Schott DuranTM da 500/1000 mL
- Carta da filtro
- Micropipetta a volume 20-200 µl con relativi puntali sterili
- Pinzette
- Piastre Petri monouso da 90 mm di diametro
- Bilancia analitica con sensibilità di 0,001 g
- Deionizzatore/distillatore acqua
- Autoclave
- Stufa a secco
- Frigorifero a 4°C
- Armadio termostatico a 25±2°C
- Cappa a flusso laminare orizzontale
- Sacchetti autoclavabili BioHazard per lo smaltimento delle piastre
- Stereomicroscopio e/o lente di ingrandimento
- Microscopio ottico

Norme di laboratorio

Al fine di evitare contaminazioni incrociate tra i campioni di seme, nonché inquinamento da agenti esterni, sarà di fondamentale importanza, nel corso di tutte le operazioni, seguire strettamente le norme igieniche di un laboratorio di microbiologia. In particolare, bisognerà provvedere alla disinfezione di tutte le superfici di lavoro e degli strumenti utilizzati tramite etanolo al 70%, sia prima che dopo la manipolazione del campione di seme, e utilizzare per ogni campione contenitori e materiali di consumo nuovi e/o sterilizzati in stufa a secco o in autoclave. La fase di riempimento delle capsule Petri rappresenta un punto critico relativamente al mantenimento della sterilità del substrato di coltura; risulterà fondamentale effettuare questa operazione nel più breve tempo possibile, lavorando sotto cappa sterile e con utilizzo di guanti da parte dell'operatore. Al termine di ogni sessione di lavoro,

sarebbe opportuno sottoporre la cappa utilizzata a un trattamento con lampada UV germicida. Al termine delle analisi, dopo la lettura delle piastre, le stesse andranno smaltite in appositi raccoglitori previa inertizzazione in autoclave a 105 °C per 10 minuti.

Preparazione terreno di coltura (PDA)

Dosi per 800 mL di terreno	
Patata Destrosio Agar (PDA)	31,2 g
H ₂ O bidistillata	800 mL
Acido lattico	300 µl

- Per questa procedura di analisi si è scelto di utilizzare il terreno di coltura PDA DIFCO™ commercializzato dalla ditta Becton Dickinson. In questo modo è possibile uniformarsi al protocollo ISTA ed ai principali manuali di riconoscimento fungino. In caso di mancata osservanza di questo accorgimento, si otterranno colonie di colorazione non conforme a quella prevista.
- Mettere in bottiglie Duran da 1 L la quantità prescritta di PDA in polvere assieme all'acqua bidistillata e agitare la soluzione.
- Sterilizzare il terreno in autoclave a 121°C, 1 atm, per 20 minuti, in modo da avere una completa sterilizzazione.
- Una volta che il PDA è sciolto e sterilizzato, mantenere le bottiglie a temperatura ambiente per un tempo sufficiente ad arrivare a 50°C, al fine da poter procedere agevolmente con il riempimento delle capsule Petri e, nello stesso tempo, impedire la solidificazione dell'agar.
- Aggiungere, tramite pipetta, la quantità prescritta di acido lattico, precedentemente sterilizzato, per portare il pH del terreno a un valore di circa 4,5. Agitare le bottiglie delicatamente in modo da prevenire la formazione di schiuma e bolle d'aria.
- Procedere con il riempimento delle capsule Petri (Ø 90 mm) versando circa 18 mL di PDA in ciascuna capsula, lasciando raffreddare per alcuni minuti prima di chiuderle e, preferibilmente, mantenendo le stesse a temperatura ambiente per 24 ore prima dell'uso o prima di essere conservate a 4-5°C. L'operazione deve essere eseguita sotto cappa sterile per limitare i rischi di contaminazione. In questa fase sarà importante non chiudere le piastre prima che il PDA sia adeguatamente raffreddato, così da evitare la formazione di condensa.

Bibliografia

Brumer, B.B.; Lopes-Caitar, V.S.; Chicowski, A.S. *et al.* 2018 Morphological and molecular characterization of *Diaporthe* (anamorph *Phomopsis*) complex and pathogenicity of *Diaporthe aspalathi* isolates causing stem canker in soybean. *Eur J Plant Pathol* 151, 1009-1025 (2018). <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1436-5>.

Danggomen, A.; Visarathanonth, N.; Manoch, L. and Piasai, O. 2013. Morphological Studies of Endophytic and Plant Pathogenic *Phomopsis liquidambaris* and *Diaporthe phaseolorum* (*P. phaseoli* anamorph) from Healthy Plants and Diseased Fruits. *Thai J. Agric. Sci.* 46(3): 157-164.

Dissanayake, A.J.; Liu, M.; Zhang, W.; *et al.* 2015. Morphological and molecular characterisation of *Diaporthe* species associated with grapevine trunk disease in China. *Fungal Biol.* 119(5), 283-94. doi: 10.1016/j.funbio.2014.11.003.

Escamilla, D.; Rosso, M.L. and Zhang B. 2019. Identification of fungi associated with soybeans and effective seed disinfection treatments. *Food Sci Nutr* 7(10):3194-3205. doi:10.1002/fsn3.1166.

Li, S. 2011. Phomopsis seed decay of soybean, Soybean - Molecular Aspects of Breeding, Aleksandra Sudaric, IntechOpen, DOI: 10.5772/15688.

Gazzetta ufficiale delle Comunità europee. Direttiva 2002/57/CE del Consiglio del 13/06/2002 e successive modifiche.

Gazzetta ufficiale della Repubblica Italiana del 27 febbraio 2021. Decreto Legislativo n.20 del 2 febbraio 2021

Hosseini, B.; El-Hasan, A.; Link, T. and Voegele, R.T. 2020. Analysis of the species spectrum of the *Diaporthe/Phomopsis* complex in European soybean seeds. *Mycol Progress* 19, 455-469. <https://doi.org/10.1007/s11557-020-01570-y>.

International Rules for Seed Testing. Validated Seed Health Testing Methods. 2021. 7-016: Detection of *Phomopsis* complex in *Glycine max* (soybean, soya bean) seed.

Regione Emilia-Romagna. Cancro dello stelo della soia-scheda tecnica. 2012. <https://agricoltura.regione.emilia-romagna.it/fitosanitario/temi/avversita/schede/avversita-per-nome/cancro-dello-stelo-della-soia>.

Riccioni, L. and Petrović, K. Identification of pathogenic fungi from soybean. Conference paper. International Conference on BioScience: Biotechnology and Biodiversity, Step in the future, The Forth Joint UNS – PSU, June 18-20, 2012, at Novi Sad, Serbia.

Santos, J.M.; Vrandecic, K.; Cosic, J.; *et al.* 2011. Resolving the *Diaporthe* species occurring on soybean in Croatia. Persoonia. 27. 9-19. doi: 10.3767/003158511X603719.

Sinclair, J.B. 1993. Phomopsis seed decay of soybeans-a prototype for studying seed disease. *Plant Disease* vol. 77 no 4.

Stoetzer, E. and Mueller, D. Should You Use a Fungicidal Seed Treatment on Low-Quality Soybean Seed? Iowa State University Extension and Outreach. December 2018. <https://crops.extension.iastate.edu/cropnews/2018/12/should-you-use-fungicidal-seed-treatment-low-quality-soybean-seed>

University of Illinois Extension. College of Agricultural, Consumer and Environmental Sciences. Report on Plant Disease, number 509. August 1997.

Yang, Q.; Fan, X-L.; Guarnaccia, V. and Tian, C-M. 2018. High diversity of *Diaporthe* species associated with dieback diseases in China, with twelve new species described. *MycoKeys* 39: 97-149. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.39.26914>.

Immagini del frontespizio

<https://www.dekalbasmgrowdeltapine.com/en-us/agronomy/diaporthe-phomopsis-disease-complex-in-soybean.html>

<https://badgercropdoc.com/category/soybean/soybean-disease-fact-sheets/phomopsis-seed-decay/>

<https://www.pubs.ext.vt.edu/3001/3001-1435/3001-1435.html>