

МСФМ 27

Диагностические протоколы для карантинных вредных организмов

ДП 10: *Bursaphelenchus xylophilus*

(Принят в 2016 году; опубликован в 2016 году)

СОДЕРЖАНИЕ

1.	Информация о вредном организме	2
2.	Таксономическая информация	3
3.	Выявление	3
3.1	Обнаружение в деревьях	4
3.2	Обнаружение при помощи ловушек для насекомых, ловчих бревен и в образцах с лесопилок и складов лесоматериалов.....	5
3.3	Обнаружение непосредственно в древесине, древесной продукции и упаковке из массива дерева.....	5
3.4	Извлечение нематод из образцов древесины.....	5
3.5	Извлечение нематод из насекомых-переносчиков.....	6
4.	Идентификация	7
4.1	Морфологическая идентификация	7
4.1.1	Подготовка образцов	8
4.1.2	Ключ для определения довида.....	9
4.1.3	Сравнение вида <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> со сходными видами	13
4.2	Идентификация на молекулярном уровне	14
4.2.1	ITS-ПЦР ПДРФ	15
4.2.2	Традиционный ПЦР-метод.....	17
4.2.3	Метод ПЦР в режиме реального времени.....	18
4.2.4	РНК-молекулярное тестирование для определения живых <i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	20
4.2.5	Метод петлевой изотермической амплификации (LAMP).....	22
4.2.6	Контроль в молекулярных исследованиях	23
4.2.7	Трактовка результатов ПЦР	24
4.2.8	Секвенирование.....	25
5.	Данные.....	25
6.	Контактные адреса для дополнительной информации	26
7.	Выражение признательности.....	27
8.	Библиография.....	27
9.	Рисунки.....	33

1. Информация о вредном организме

Сосновая стволовая нематода *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Buhrer, 1934; Nickle, 1970) является возбудителем болезни, вызывающей увядание хвойных пород (вилт). *B. xylophilus*, как полагают, является аборигенным видом Северной Америки, где она широко распространена в Канаде и Соединенных Штатах (Ryss *et al.*, 2005) и также, по-видимому, ограничено распространена в Мексике (Dwinell, 1993). Североамериканские хвойные породы невосприимчивы или, по крайней мере, устойчивы к *B. xylophilus*, но экзотические породы, высаженные в Северной Америке, особенно в более теплых южных районах Соединенных Штатов, погибают при заражении нематодами.

B. xylophilus была завезена в Японию в начале XX века, предположительно в древесине, экспортированной из Северной Америки, и стала одним из самых опасных лесных вредителей в стране, где она до сих пор вызывает значительные потери сосновых деревьев (*Pinus densiflora*, *P. thunbergii* и *P. luchuensis*). *B. xylophilus* также была завезена в Китай (включая Тайвань) и Корею, где была обнаружена во второй половине 1980-х годов. В 1999 году *B. xylophilus* была впервые выявлена в Европе (Португалия) на *P. pinaster*, которая погибает от нематоды в течение нескольких месяцев после заражения (Mota *et al.*, 1999; Fonseca *et al.*, 2012). *B. xylophilus* также была обнаружена на *P. nigra* и *P. radiata* в Португалии и Испании, соответственно (Inácio *et al.*, 2014; Zamora *et al.*, 2015). В 2008 году *B. xylophilus* была впервые выявлена в Испании (Abelleira *et al.*, 2011).

B. xylophilus переносится с дерева на дерево обитающими в древесине жуками рода *Monochamus* (Coleoptera: Cerambycidae) (Linit, 1990; Evans *et al.*, 1996). Нематоды внедряются в тела насекомых вскоре после выхода последних из куколки и непосредственно перед их выходом из дерева-хозяина (Wingfield, 1987). Жуки летят в крону здоровых деревьев и питаются молодыми побегами и листьями (дополнительное питание). Затем они спариваются и самки ищут ослабленное либо недавно погибшее дерево, стволы или крупные ветки (в том числе среди порубочных остатков), в зависимости от вида *Monochamus*, куда они откладывают яйца через кору. Вылупившиеся из яиц личинки жука в течение нескольких месяцев питаются камбиальными тканями непосредственно под корой. По достижении зрелости они засверливаются вглубь дерева для окукливания, которым завершается их жизненный цикл. *B. xylophilus* использует особенности этого жизненного цикла для распространения на другие деревья (Wingfield, 1987). Их переселение на новые деревья может происходить в процессе яйцекладки жуков (это, по всей видимости, единственно возможный способ распространения для некоторых видов *Bursaphelenchus*, которые колонизируют мертвые деревья) (Edwards and Linit, 1992). Вместе с тем, *B. Xylophilus*, пожалуй, единственная из этих видов может переноситься на новое дерево в процессе дополнительного питания жуков, поэтому вилт может развиваться в результате переноса вредителя на молодые побеги (Wingfield, 1987).

При переносе *B. xylophilus* в процессе яйцекладки нематоды остаются относительно недалеко от места занесения. Однако при переносе на молодые побеги и последующем поражении дерева вилтом нематоды распространяются по всему дереву, разрушая его ткани – эпителиальные клетки, клетки паренхимы осевых и радиальных каналов смолы, камбия и флоэмы. *B. xylophilus* также обнаруживаются в корнях, даже тогда, когда надземная часть дерева уже мертва, усохла или срублена. Развитие болезни увядания хвойных пород зависит от вида дерева (как правило, поражается только *Pinus spp.* неамериканского происхождения), а также состояния его здоровья и климатических условий (в частности, температуры и обводнения). Эти факторы также влияют на распространение нематод по всему дереву: оно может быть как локализованным, так и неравномерным, что необходимо принимать в расчет при определении стратегии отбора проб (Schröder *et al.*, 2009).

B. xylophilus также встречаются в мертвых деревьях *Abies*, *Chamaecyparis*, *Cedrus*, *Larix*, *Picea* и *Pseudotsuga* и других хвойных (за исключением *Thuja spp.*), но насколько известно, ни один из этих родов не поражается вилтом, хотя патогенные исследования на саженцах выявили примечательные реакции, включая гибель растений (Evans *et al.*, 1996).

B. xylophilus почти всегда разносится видами *Monochamus*. Вид-переносчик варьирует в зависимости от географического региона: например, *M. alternatus* в Китае и Японии, *M. saltuarius* в Японии, *M. carolinensis* в Северной Америке и *M. galloprovincialis* в Португалии. Время от времени выявляются иные жуки семейства *Cerambycidae* или другие жесткокрылые, которые могут переносить дауэрличинкок нематоды на своих телах, но нет никаких доказательств того, что они играют определенную роль в распространении нематоды (Evans *et al.*, 1996).

Деятельность человека является основной причиной распространения *B. xylophilus* на большие расстояния. *B. xylophilus* и ее переносчики в ряде случаев были обнаружены в партиях международных поставок древесины – в изделиях из древесины и, в первую очередь, в упаковочных материалах, изготовленных из массива древесины хвойных пород. Таким образом, риск ее дальнейшего распространения по миру высок.

Несмотря на то, что наибольшую угрозу представляет распространение *B. xylophilus* вместе с жуками-переносчиками, при определенных обстоятельствах может происходить перенос из зараженной древесины на незараженную или на здоровые деревья – при прямом контакте зараженной и чистой древесины, высоком содержании влаги в чистой древесине или наличии ран на здоровых деревьях (Sousa *et al.*, 2011; Hopf and Schroeder, 2013).

Более детальная информация о биологии *B. xylophilus*, ее переносчиках, болезни увядания хвойных пород, географическом распространении, торговых и экономических последствиях, а также стратегиях борьбы и профилактики приведена в подробных работах следующих авторов: Kishi (1995); Mota and Vieira (2004); Mota and Vieira (2008); and Zhao *et al.* (2008).

2. Таксономическая информация

Название:	<i>Bursaphelenchus xylophilus</i> (Steiner and Buhner, 1934; Nickle, 1970)
Синонимы:	<i>Aphelenchoides xylophilus</i> (Steiner and Buhner, 1934) <i>Paraphelenchoides xylophilus</i> (Steiner and Buhner, 1934; Haque, 1967) <i>Bursaphelenchus lignicolus</i> (Mamiya and Kiyohara, 1972)
Таксономическое положение:	Nematoda, Rhabditida, Tylenchina, Aphelenchoidea, Aphelenchoididae, Parasitaphelenchinae, <i>Bursaphelenchus</i>
Обычное название:	Сосновая стволовая нематода

3. Выявление

Жизненный цикл *B. xylophilus* состоит из шести стадий: яйца и четырех личиночных стадий, предшествующих половозрелой особи. Личинка первого возраста (J₁), находясь в яйце, линяет до личинки второго возраста (J₂). На стадии J₂ она выходит из яйца, после чего следуют еще две личиночные стадии (J₃ и J₄), предшествующие линьке до половозрелой особи. Стадии развития сменяются в зависимости от различных условий. При благоприятных условиях при температуре в 25 °С *B. xylophilus* развивается из яйца, проходя через четыре пропативные стадии (от J₁ до J₄), и достигает стадии половозрелой особи в течение четырех дней (Hasegawa and Miwa, 2008) (рис. 1).

При неблагоприятных условиях вместо личинки J₃ развивается дисперсионная личинка J_{III}. На стадии J_{III}, по всей видимости, личинка не питается. В клетках ее кишечника накоплен запас липидов (Kondo and Ishibashi, 1978), благодаря чему она может пережить такие неблагоприятные условия, как засуха, низкие температуры или отсутствие питания. Обычно после этой стадии происходит линька в дисперсионную личинку четвертого возраста J_{IV} (дауэрличинку), которая распространяется вместе с жуками-переносчиками на новые деревья. Тем не менее, при наступлении условий, благоприятных для дальнейшего развития, например, при помещении

личинок J_{III} в субстраты с культурами грибов, нематоды развиваются до пропативных личинок четвертого возраста J₄ (Wingfield *et al.*, 1982).

B. xylophilus встречается на различных типах древесины растений-хозяев, в том числе на стоящих или поваленных деревьях, круглых лесоматериалах, пиломатериалах и таких изделиях из древесины хвойных пород, как древесные упаковочные материалы, а также на опилках, древесных стружках и частицах, древесных отходах, необработанной мебели и ремесленных изделиях. В следующих разделах приводится конкретная информация об обнаружении *B. xylophilus* на деревьях, древесине и изделиях из дерева, а также в жуках-переносчиках. Несмотря на то, что грамотный отбор проб важен для получения материала, который с наибольшей долей вероятности заражен *B. xylophilus*, руководство по отбору проб не является частью настоящего протокола. Общее руководство по отбору проб в случае, когда переносчиками являются европейские *Monochamus*, было опубликовано Schröder *et al.* (2009), а также ЕОКЗР (2012).

3.1 Обнаружение в деревьях

При отсутствии информации о распространении *B. xylophilus* в той или иной местности, пробы следует отбирать с деревьев вблизи мест с высокой степенью риска заражения, например, портов приема импортируемых товаров из стран с известными случаями заражения *B. xylophilus*, аэропортов, лесопилок, деревообрабатывающих предприятий, мест хранения древесины, а также зон, где были лесные пожары (*Monochamus* привлекают лесные пожары).

Для увеличения вероятности обнаружения *B. xylophilus* в районе исследования целесообразно сосредоточить отбор проб на погибающих или недавно погибших сосновых деревьях (рис. 2 и 3), как стоящих, так и поваленных. Деревья и отходы от свежих рубок леса (одно- или двухлетние вырубки), которые за это время были колонизированы жуками *Monochamus*, также могут быть использованы в качестве материала для отбора проб. Необходимо искать следующие симптомы: изменение цвета (например, пожелтение) иголок, увядание, свидетельства деятельности насекомых (например, наличие древесной стружки на земле или в трещинах в коре, плоскоголовых личинок *Monochamus* под корой, поверхностных червоточин под корой с овальными входными отверстиями в продольном направлении ствола, круглых отверстий выхода взрослых особей), синева, вызванная ростом грибка в древесине, и отсутствие сочения смолы из ран. Скорость сочения живицы проверяется на зеленых деревьях путем удаления части коры со слоя камбия. Здоровые деревья покрывают поверхность древесины смолой в течение одного часа, в то время как для зараженных деревьев характерно отсутствие или слабое выделение смолы. Вместе с тем, эти симптомы разнятся в зависимости от вида сосны и не являются исключительными для *B. xylophilus*, так как могут быть вызваны другими патогенами или физическими факторами. В настоящее время не существует метода для визуального определения деревьев, погибающих от вилта или от других причин. Предпочтительно брать пробы с деревьев, заселенных жуками *Monochamus* на стадии дополнительного кормления или размножения, или хотя бы место отбора проб должно находиться в известном ареале распространения видов *Monochamus*.

Распространение нематод внутри деревьев легко установить, особенно вскоре после их занесения во время яйцекладки или на стадии дополнительного питания жука-переносчика. При вилта нематоды могут быстро распространяться и производить многочисленное потомство во всех частях дерева за исключением игл, шишек и семян. *B. xylophilus* также поражает корневую систему и может выживать там некоторое время после гибели, высыхания или рубки дерева. Однако в невосприимчивых деревьях, при неблагоприятных климатических условиях или в определенных физиологических состояниях дерева, нашествие *B. xylophilus* и их распространение внутри деревьев может носить ограниченный характер: например, крона может быть частично или полностью поражена *B. xylophilus*, однако другие части дерева будут нетронутыми.

3.2 Обнаружение при помощи ловушек для насекомых, ловчих бревен и в образцах с лесопилок и складов лесоматериалов

Ловушки для насекомых с приманками для привлечения видов *Monochamus* разработаны в последние годы и могут также быть использованы для целей мониторинга (Sanchez-Husillos *et al.*, 2015). При использовании ловушек для сбора жуков *Monochamus* для их исследования на предмет возможного заражения *B. xylophilus*, жуки должны быть пойманы живыми, а не при помощи жидкого умерщвляющего вещества.

В местах с известной популяцией жуков *Monochamus* в качестве ловчих бревен могут использоваться бревна, вырубленные в период лёта жуков. Они привлекают жуков для откладки яиц, и было доказано, что в таких случаях происходит перенос нематод (Dwinell, 1997; Luzzi *et al.*, 1984). Дерево или имаго жуков могут быть выбраны для мониторинга наличия *B. xylophilus* в ограниченной области. Жуки могут завершать свой жизненный цикл в таком материале. Также можно ускорить развитие жуков за счет переноса ловчих бревен в лабораторию осенью: жуки появятся из древесины на несколько недель раньше, чем это произошло бы в естественных условиях.

Сбор образцов древесины, стружки или древесной щепы с лесопилок и со складов лесоматериалов может быть эффективнее, чем отбор проб со стоящих деревьев. Такие образцы могут собираться с весьма обширной территории, поскольку крупные лесопилки получают древесину издалека и обрабатывают как заготовленные в стране, так и импортируемые лесоматериалы. Однако этот фактор играет и отрицательную роль, ибо затрудняет привязку положительных проб к региону происхождения древесины.

3.3 Обнаружение непосредственно в древесине, древесной продукции и упаковке из массива дерева

Во всех видах древесины хвойных пород, особенно упаковке из массива дерева, в частности, из стран, где встречается *B. xylophilus*, пробы могут быть отобраны при помощи низкоскоростной дрели, бура, пилы, топора, крюка и т.д. Отбор проб должен производиться на участках с круглыми ходами личинок (летными отверстиями жуков), с овальными входными отверстиями и личиночными ходами, которые бывают заблокированы древесной стружкой. При наличии коры ее удаление поможет обнаружить проточенные ходы. При отборе проб с пиломатериалов летные отверстия, как правило, отсутствуют, но могут быть видны личиночные ходы, зачастую забитые стружкой и поэтому трудноразличимые. Следует отбирать пробы с образцов, пораженных грибом, особенно грибом синевы. Тем не менее, в ряде случаев живые особи *B. xylophilus* были обнаружены и в образцах без вышеупомянутых признаков (ЕОКЗР, 2012).

Упаковочные материалы из массива дерева (например, поддоны) могут контактировать с почвой во время использования. Это может привести к переносу на поверхность почвенных и живущих в почве нематод, способных пережить высыхание. Во избежание переноса таких нематод на извлеченную древесную пробу перед ее обследованием необходимо удалить поверхностный слой древесины (Schröder *et al.*, 2009).

3.4 Извлечение нематод из образцов древесины

Живых нематод можно выделить из зараженной древесины при помощи вороночного метода Бермана или модифицированного вороночного метода Бермана (Penas *et al.*, 2002; ЕОКЗР, 2013с). В вороночном методе Бермана на стеклянную или пластиковую воронку с узкой трубкой у основания надевается перекрытая зажимом резиновая трубка, а воронка заполняется водой. Образец в виде измельченного дерева или древесной стружки помещается на сито внутри воронки. На сито кладется проницаемый для нематод бумажный или марлевый фильтр, предотвращающий загрязнение воды древесными частицами. Затем воронку заполняют водой так, чтобы она прикрывала материал. Образец оставляют на срок от 24 до 48 часов при комнатной температуре или помещают в термостат (при температуре около 25 °С). В течение этого времени

нематоды перемещаются из дерева в воду и падают в основание воронки, откуда их можно собрать, сливая небольшое количество воды (порядка 10 мл) в небольшую чашку.

Суть вороночного метода Бермана описана выше, но на практике используется несколько его модификаций (ЕОКЗР, 2013с). Например, древесная щепка может быть непосредственно погружена в воду или разложена на ватном фильтре, помещенном в пластиковую корзину для извлечения нематод. Кроме того, в каждом методе, описанном ЕОКЗР (2013с), может быть использовано распылительное устройство.

Под стереоскопическим микроскопом и с помощью пипетки или иглы нематоды могут быть перенесены из небольшой чашки Петри на предметное стекло для исследования под микроскопом большого разрешения.

Нематоды могут присутствовать в образце в очень малых количествах, поэтому их обнаружение может быть затруднено. Рекомендуется дать нематодам размножиться до их выделения. Для этого увлажненный образец древесины без коры герметизируется в полиэтиленовом пакете и хранится там при приблизительно 25 °С в течение двух-трех недель. Затем нематоды выделяются вороночным методом Бермана.

Принцип вороночного метода Бермана основан на обнаружении нематод при выходе из образца древесины, однако в течении рекомендованных 24-48 часов некоторые нематоды погибают (Вагманн, 1917). Тем не менее, можно с уверенностью утверждать, что они были живы при выделении. Это необходимо иметь в виду при анализе импортного древесного материала. Некоторые другие методы выделения, например метод центрифугирования (здесь не описан, является более быстрым по сравнению с вороночным методом Бермана), позволяют также извлечь нематод, которые уже были мертвы в древесине (Moens, 2000). Метод центрифугирования может быть использован для мониторинга районов, пораженных *B. xylophilus*, но не для доказательства того, что древесина успешно прошла фитосанитарную обработку (Moens, 2000).

3.5 Извлечение нематод из насекомых-переносчиков

Жуки рода *Monochamus*, пойманные с помощью ловушек (Pajares *et al.*, 2004; Ibeas *et al.*, 2007) или ловчего бревна, могут быть исследованы на наличие нематод (раздел 3.2). Жуки должны быть пойманы живыми, а не при помощи умерщвляющего их жидкого вещества, если только они не будут использованы для прямого молекулярного исследования.

Личинки нематод, обычно находящиеся на стадии развития J_{IV} (дауэрличинки), как правило, обнаруживаются в трахеях и на поверхности тела жуков. Дауэрличинки четвертого возраста J_{IV} не имеют стилета. Для выделения нематод жуков расчлениают и измельчают в подходящей чашке, а затем выдерживают в воде в течение 24-48 часов при приблизительно 25 °С (Sousa *et al.*, 2001; ЕОКЗР, 2013с). В течение этого времени дауэрличинки покинут жуков. Дауэрличинки J_{IV} следует перенести на субстрат из мицелия *Botryotinia fuckeliana* (анаморф: *Botrytis cinerea*), выращенный на солодовом агаре (раздел 4.1.1), чтобы позволить им развиваться до пропативной стадии, ибо дальнейшая морфологическая идентификация может проводиться только со взрослыми нематодами. В качестве альтернативы они могут быть использованы непосредственно для молекулярной идентификации. Для выделения нематод из жуков также может быть использован вороночный метод Бермана.

Нематоды, выделенные вышеописанным образом из древесины или насекомых-переносчиков, могут подвергаться морфологическому либо молекулярному исследованию непосредственно на извлеченных образцах. ЕОКЗР (2013b) описывает процедуру скрининга, основанную на выделении модифицированным вороночным методом Бермана, вслед за которым проводится диагностика методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в масштабе реального времени (излагается по работе François *et al.*, 2007).

Имеется также ряд свидетельств обнаружения с использованием молекулярных методов, при которых ДНК *B. xylophilus* экстрагируют непосредственно из древесины перед амплификацией (Takeuchi *et al.*, 2005; François *et al.*, 2007; Kikuchi *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2011; Kanetani *et al.*, 2011; Cardoso *et al.*, 2012). Однако количество древесины, используемое в этих случаях для выделения ДНК, варьирует в диапазоне от 5 до 120 мг, что очень мало по сравнению с размерами обычно анализируемых образцов древесины. Кроме того, данный подход непосредственного обнаружения с применением молекулярного анализа выявит любую нематоду, живую или мертвую. Соответственно, пользователи такого подхода должны иметь прописанную процедуру подтверждения наличия живых нематод в образце – если это требуется для анализа.

4. Идентификация

На сегодняшний день описано около 110 видов рода *Bursaphelenchus* (Futai, 2013). Последние обзоры можно найти в работах Рысс и колл. (2005), Hunt (2008), Braasch *et al.* (2009) и Futai (2013). *B. xylophilus* могут быть идентифицированы одним из двух способов: на основе морфологических отличительных признаков или на основе методов молекулярной биологии. Хотя количество описанных в последние годы видов *Bursaphelenchus* увеличилось и некоторые из них имеют схожие морфологические признаки, в большинстве случаев возможна идентификация, основанная на морфологии. Тем не менее, бывает сложно определить остроконечные формы *B. xylophilus* на основе морфологических признаков.

Для идентификации на основе морфологических признаков необходимы качественные микропрепараты, микроскоп высокого разрешения, а также значительный опыт в таксономии нематод, особенно небольшой группы видов, тесно связанных с *B. xylophilus* (*B. mucronatus mucronatus*, *B. mucronatus kolymensis*, *B. fraudulentus* и др.). Для методов идентификации, основанных на молекулярной биологии, необходимы дорогостоящее оборудование и реагенты, однако не требуется большой технической опыт (и обширных познаний в области нематодологии). Тем не менее, для обеспечения сохранности ограниченного материала нематод в ходе процедуры необходим достаточный опыт соответствующей работы. В то время как морфологическая идентификация проводится на взрослых особях, молекулярная идентификация может осуществляться при наличии лишь особей на ранних личиночных стадиях развития или взрослых особей одного пола, что является преимуществом последней. В то время как ДНК-методы, основанные на ПЦР, не проводят различий между мертвыми и живыми нематодами, новые методы, основанные на мРНК, могут подтвердить идентификацию именно живых нематод (Leal *et al.*, 2013).

При наличии взрослых самцов и самок в хорошем состоянии *B. xylophilus* могут быть идентифицированы нематодологом или опытным фитопатологом на основе морфологических признаков. Тем не менее, могут возникнуть ситуации, когда для более точной идентификации рекомендуется сочетать информацию о морфологических признаках с молекулярными данными, например, при обнаружении *B. xylophilus* в новой местности или при первичном обнаружении *B. xylophilus* лабораторией (как гарантия качества и соответствия системам сертификации), либо при ее обнаружении в ходе проверки импортируемых товаров, особенно если страна-экспортер была объявлена свободной от *B. xylophilus*. Более того, *B. xylophilus* может иметь морфологические вариации, требующие применения методов молекулярной биологии, например, круглые или остроконечные кончики хвоста у самок (рис. 4) или местонахождение анального отверстия. При выделении незначительного числа нематод рекомендуется перед идентификацией дать им размножиться на субстрате *B. Fuckeliana* для получения достаточного для точной идентификации количества материала (раздел 4.1.1).

4.1 Морфологическая идентификация

В водном экстракте из хвойной древесины могут присутствовать многочисленные виды нематод, особенно при начале процесса распада тканей. Некоторые из них будут принадлежать к видам сапрофагов, где у взрослых особей нематод отсутствует стилет, что характерно для нематод семейств Tylenchida, Aphelenchida и Dorylaimida. Виды *Bursaphelenchus* относятся к семейству

Aphelenchida, которые имеют спинную глоточную железу, открывающуюся в метакорпус, в отличие от семейства Tylenchida, где железа открывается в просвете глотки между бульбусом и стилетом (рис. 4). Если образец содержит только нематоды на ранней стадии развития, морфологическая идентификация *B. xylophilus* невозможна. В таких случаях виды семейства, которые по размеру совпадают с нематодами *B. xylophilus* на ранней стадии развития (см., например, Penas *et al.*, 2008), должны быть отделены либо размножены в чаше Петри выращивания или использованы для прямой молекулярной идентификации.

Для идентификации под оптическим микроскопом рекомендуется увеличение 400× - 1000× (с масляно-иммерсионным объективом). Наличие дифференциального интерференционного контраста (ДИК) может облегчить наблюдения.

4.1.1 Подготовка образцов

Возможно, для получения достаточного количества материала для идентификации выделенным нематодам следует дать размножиться. Большинство видов *Bursaphelenchus* можно выращивать на спорообразующих грибах *B. fuckeliana*. Некоторые виды, особенно принадлежащие к группе *sexdentati*, выращиваются на неспорообразующих грибах. Обе грибковые формы культивируют на 2% солодовом агаре (malt extract agar – MEA) (15 г агар-агара, 15 г солодового экстракта, 750 мл воды; pH 7,0). Чашки Петри (диаметром 90 мм) заполняются 25 мл стерилизованного MEA. Грибковые споры либо кусочки агара с грибковой культурой переносят в чашки Петри внутри стерильного бокса. Инкубацию пластин с грибами рекомендуется осуществлять при комнатной температуре (приблизительно 25 °C). Небольшую каплю субстрата с предназначенными для размножения нематодами переносят на мицелий с помощью пипетки или иным способом. Инкубацию нематод рекомендуется производить при температуре приблизительно 25 °C (в зависимости от их биологии), при которой скорость размножения достаточна для получения необходимого количества взрослых особей и их личиночных стадий.

4.1.1.1 Временные препараты

Временные препараты для быстрой идентификации или изучения особенностей, лучше всего наблюдаемых в незафиксированных образцах, получают следующим образом. Живых нематод помещают в небольшое количество воды на предметном стекле. Предметное стекло быстро нагревают над пламенем спиртовки, постоянно наблюдая за движением нематод. Как только нематоды перестанут двигаться, нагрев следует прекратить. После наложения покровного стекла образец готов для изучения. Не рекомендуется закреплять покровное стекло, так как возможно, что тело самца нематоды потребует расположить в дорсально-вентральной позиции, чтобы увидеть бурсу.

4.1.1.2 Постоянные препараты

Постоянные препараты для идентификации с помощью оптического микроскопа получают следующим образом. Живые нематоды, извлеченные из растительного материала или выращенные, умерщвляются на слабом огне, фиксируются в FAA-растворе (35% дистиллированной воды, 10% 40%-го формалина, 5% ледяной уксусной кислоты, 50% 95%-го спирта) (Andrássy, 1984) или в растворе ТАФ – триэтаноламина и формалине (7 мл формалина (40%-го формальдегида), 2 мл триэтаноламина, 91 мл дистиллированной воды), обрабатывают безводным глицерином (для длительного хранения) и помещают на пластину в безводном глицерине, как описано у Seinhorst (1959) и Goodey (1963). Более быстрый метод (1-1,5 часа) подготовки постоянных препаратов описан Рыссом (2003) и основан на умерщвлении нематод горячим раствором 4%-го формальдегида. Фиксация затем происходит при различной температуре в программируемом термостате с последующей обработкой в глицерине. Подробнее о подготовке образцов нематод и постоянных препаратов, включая составы фиксирующих растворов, можно найти в работе van Bezooijen (2006) в свободном доступе в сети Интернет.

4.1.2 Ключ для определения довида

Следующий ключ, частично созданный на основе работы Bongers (1989), используется для определения подсемейства самок изучаемых особей. Ключ подсемейства Parasitaphelenchinae для определения рода *Bursaphelenchus* взят из работы Hunt (2008). Ключ рода *Bursaphelenchus* для группы *xylophilus* взят из работы Braasch *et al.* (2009). В качестве альтернативы применяется общепризнанный простой ключ, определенный Европейской и средиземноморской организацией защиты растений (ЕОКЗР), широко используемый в данном регионе и доступный в диагностическом протоколе ЕОКЗР для *B. xylophilus* (ЕОКЗР, 2013b).

Определения терминов, используемых в последующих разделах, можно найти в публикации ЕОКЗР *Diagnostic protocols for regulated pests: Pictorial glossary of morphological terms in nematology* (ЕОКЗР, 2013a).

4.1.2.1 Ключ для определения досемейств и подсемейств

1. Нематода с шипом или стилетом.....2
 - Нематода без шипа или стилета..... **не Bursaphelenchus**
2. Ротовая область с тиленхоидным стилетом, глотка с метакорпусом.....3
 - Ротовая область с дорилаймоидным стилетом, глотка цилиндрической или бутылкообразной формы, без метакорпуса **не Bursaphelenchus**
3. Метакорпус с метакорпальными пластинами4
 - Метакорпус без видимых метакорпальных пластин **не Bursaphelenchus**
4. Прокорпус четко отделен от метакорпуса сужением5
 - Прокорпус и метакорпус не разделены сужением, базальный бульбус сильно редуцирован, видимая кольцеобразная кутикула **не Bursaphelenchus**
5. Одна гонада (вульва расположена сзади)6
 - Две гонады **не Bursaphelenchus**
6. Губная область без щетинок.....7
 - Губная область с щетинками **не Bursaphelenchus**
7. Метакорпус имеет видимо развитую мускулатуру, отчетливо различимую при слабом увеличении, имеет яйцевидную форму или форму скругленного прямоугольника, дорсальный глоточный проток открывается в полость глоточного кольца внутри метакорпуса8
 - Метакорпус обычного размера, дорсальный глоточный проток открывается в полость глоточного кольца непосредственно за стилетом **не Bursaphelenchus**
8. Глоточные железы частично перекрывают кишечник с дорсальной стороны.....9
 - Глоточные железы не выходят за пределы выступающего бульбуса..... **не Bursaphelenchus**
9. Кончик хвоста самца окружен небольшим бурсовидным кутикулярным щитком (различим только при дорсально-вентральном положении нематоды).....10
 - Бурсовидный кутикулярный щиток отсутствует **не Bursaphelenchus**

10. Наличие выступов у стилета, наличие ануса у самки..... **Parasitaphelenchinae**

– Выступы у стилета отсутствуют, отсутствие ануса у самки..... **не Bursaphelenchus**

4.1.2.2 Ключ для определения доподсемейства *Parasitaphelenchinae*

11. У большинства видов дауэрличинки третьего (J_{III}) или четвертого (J_{IV}) возраста форетически связаны с насекомыми; вульва в задней части (обычно 60-80% длины тела), спикулы отдельные или частично сросшиеся; хвост самца сильно загнут; бурса присутствует у большинства видов..... **Bursaphelenchus**

– Дауэрличинки J_{IV}; вульва расположена далеко сзади (80-90% длины тела); спикулы частично сросшиеся; хвост самца не сильно загнут; имеется бурса..... **не Bursaphelenchus**

4.1.2.3 Ключ для определения дорода *Bursaphelenchus*

12. Вульва с большим щитком; спикулы длинные, тонкие, полукруглые с дугообразными лезвиями в первой трети задней части, капитюлум плоский с маленьким кондилюсом и заметным рострумом, обычно имеется кукуллюс; боковина с четырьмя линиями..... **группа xylophilus**

– Признаки отличаются **не группа xylophilus**

4.1.2.4 Ключ для определения догруппы *xylophilus*

В группе *xylophilus* следующий ключ (дополненный в соответствии с ЕРРО (2013b, 2014)) может быть использован для определения *B. xylophilus*, выделенных из древесины и древесной коры от видов *Bursaphelenchus* той же группы. Более подробную информацию о других видах, принадлежащих к группе *xylophilus*, можно найти в работе Braasch и Schönfeld (2015). В группу *xylophilus* также входят виды, не связанные с хвойными породами деревьев (например, *B. populi*). Их можно исключить просто определением породы дерева. У нематод, размножающихся на агаровой пластине с грибами, может наблюдаться большая вариативность строения хвоста самки.

13. Хвост самки почти цилиндрической формы, с или без мукро (рис. 4 и 5)..... **14**

– Хвост самки конической формы (рис. 6) или сильно выраженное сужение к концу, с или без мукро **не B. xylophilus**

14. Длина спикулы <30 мкм (измеряется от кондилюса до дистального кончика) **15**

– Длина спикулы >30 мкм **не B. xylophilus**

15. Спикула с длинным остроконечным рострумом, лимбы спикулы с угловым изгибом (рис. 5(C) и 7)..... **16**

– Спикула с коротким остроконечным рострумом, лимбы со скругленным изгибом **не B. xylophilus**

16. Вульварный щиток самки прямой, не заканчивается значительным углублением (рис. 5(G) и 8)..... **17**

– Вульварный щиток самки заканчивается значительным углублением (рис. 9(A))..... **не B. xylophilus**

17. Хвост самки с мукро > 3 мкм (рис. 4(c) и 10(d)) **18**

– Хвост самки с мукро (рис. 5(H) и 4(a)) и с небольшим выступом <2 мкм* или без него (рис. 4(b) и 4(I)–(J)) **B. xylophilus (разновидность со скругленным хвостом)**

18. Экскреторная пора на метакорпусе или за ним.....
.....*B. mucronatus kolyomensis* и *B. xylophilus* (разновидность с мукро**)

– Экскреторная пора перед метакорпусом **не *B. xylophilus***

не *Bursaphelenchus*, не относится к видам *Bursaphelenchus*.

* В некоторых популяциях *B. fraudulentus* обнаруживаются самки с небольшим выступом или даже с отсутствующим мукро (рис. 9(B)). В случае, когда невозможно с уверенностью определить вид дерева, в котором обнаружена нематода (*B. fraudulentus* встречается в лиственных деревьях, она также была обнаружена в лиственнице – но не в сосне), рекомендуется молекулярное исследование.

** Разновидность *B. xylophilus* с мукро преимущественно встречается в Северной Америке и для достоверного различия этой и "европейской" разновидности *B. mucronatus*, т.е. *B. mucronatus kolyomensis* (Braasch et al., 2011), рекомендуется проведение молекулярных исследований (Gu et al., 2011).

Если положение экскреторной поры неразлично, идентификация на основе морфологических признаков может быть неверной. В подобных случаях должны проводиться молекулярные исследования.

B. xylophilus имеет общие признаки рода *Bursaphelenchus* (Nickle, 1970; Hunt, 2008): длина около 1 мм, продолговатая; головная область расположена высоко, отделена сужением, имеет шесть губ; стилет хорошо развит, обычно имеет небольшие базальные уплотнения; метакорпус хорошо развит (рис. 11 и 5(F)); терминус хвоста самца сильно загнут в вентральную сторону, имеет коническую форму, небольшую терминальную бурсу, различимую в дорсально-вентральном положении (рис. 12); спикулы жесткие, в форме шипов розы, обычно имеют выступающие изгиб и рострум; gubernaculum отсутствует (рис. 7 и 10); вульва занимает 70-80% длины тела; постутеральный мешок хорошо развит (рис. 5(A)).

Большинство популяций *B. xylophilus* имеют округленный хвост и отличаются от других видов рода *Bursaphelenchus* следующими тремя признаками (рис. 10). 1) Самцы *B. xylophilus* (рис. 7) имеют относительно большие спикулы, равномерной дугообразной формы, с острым большим рострумом и кукуллюсом (дискообразным выступом) на дистальных концах спикул. 2) Хвост самки имеет практически цилиндрическую форму с широко скругленным терминусом (рис. 4(a)), мукро (небольшой выступ) обычно отсутствует, но в некоторых случаях самки популяций особей со скругленным хвостом имеют мукро на терминусе хвоста длиной менее 2 мкм (рис. 4(b)). 3) Вульва перекрывается длинной передней губой (рис. 8).

Вместе с тем, самки популяций, обладающих мукро, в большинстве случаев имеют мукро (1,5-4,2 мкм) на терминусе хвоста (рис. 4(c)).

Признаками, которые лучше всего выявляются под сканирующим электронным микроскопом, являются четыре насечки (рис. 13) в латеральном поле, а также количество и положение хвостовых папилл у самцов (рис. 14): аданальная пара папилл расположена перед анусом, две пары постанальных папилл расположены прямо перед основанием бурс и единственная медиальная папилла находится прямо перед анальным отверстием. Данные признаки иногда с трудом можно наблюдать и через оптический микроскоп. Рис. 13 и 14 – это микроснимки электронной микроскопии, на которых изображены два этих признака, указанных в разделе 4.1.3 в качестве классификационных для отнесения видов рода *Bursaphelenchus* к группе *xylophilus*.

Результаты измерений морфологических параметров *B. xylophilus* приведены в Таблице 1.

Таблица 1. Измерения (средние, диапазон указан в скобках) признаков *Bursaphelenchus xylophilus*

Самцы					
Автор Признак	Nickle <i>et al.</i> (1981) (n = 5) (США) [†]	Mamiya и Kiyohara (1972) (n = 40) (Япония) [†]	Mota <i>et al.</i> (1999) (n = 12) (Португалия) [†]	Penas <i>et al.</i> (2008) (n = 20) (Португалия) [†]	Penas <i>et al.</i> (2008) (n = 20) (Португалия) [‡]
Длина (Д), мм	0,56 (0,52-0,60)	0,73 (0,59-0,82)	1,03 (0,80-1,30)	0,57 (0,45-0,69)	1,04 (0,87-1,17)
а (длина тела/наибольший диаметр тела)	40,8 (35-45)	42,3 (36-47)	49,4 (44-56)	46,0 (40,2-58,5)	45,7 (41,3-48,9)
б (длина тела/расстояние от передней части до глоточнокишечного клапана)	9,4 (8,4-10,5)	9,4 (7,6-11,3)	13,3 (11,1-14,9)	9,6 (8,2-10,7)	13,7 (11,6-15,4)
с (длина тела/длина хвоста)	24,4 (21-29)	26,4 (21-31)	28,0 (24-32)	21,6 (19,1-24,6)	26,8 (23,6-31,4)
Стилет, мкм	13,3 (12,6-13,8)	14,9 (14-17)	12,6 (11-16)	11,0 (10-14)	14,0 (12-15)
Спикулы, мкм	21,2 (18,8-23,0)	27,0 (25-30)	24 (22-25)	19,3 (16,5-24,0)	30,4 (25,0-33,5)

Самки					
Автор Признак	Nickle <i>et al.</i> (1981) (n = 5) (США) [†]	Mamiya и Kiyohara (1972) (n = 30) (Япония) [†]	Mota <i>et al.</i> (1999) (n = 12) (Португалия) [†]	Penas <i>et al.</i> (2008) (n = 20) (Португалия) [†]	Penas <i>et al.</i> (2008) (n = 20) (Португалия) [‡]
Длина (Д), мм	0,52 (0,45-0,61)	0,81 (0,71-1,01)	1,05 (0,89-1,29)	0,58 (0,51-0,66)	1,13 (0,91-1,31)
а (длина тела/наибольший диаметр тела)	42,6 (37-48)	40,0 (33-46)	50,0 (41-58)	41,9 (32,8-50,6)	45,6 (39,4-50,3)
б (длина тела/расстояние от передней части до глоточнокишечного клапана)	9,6 (8,3-10,5)	10,3 (9,4-12,8)	13,8 (12,7-16,4)	10,1 (9,1-11,2)	14,7 (11,6-16,8)
с	27,2	26,0	26,6	25,4	28,1

(длина тела/длина хвоста)	(23-31)	(23-32)	(22-32)	(20,2-29,0)	(21,9-34,4)
Стилет, мкм	12,8 (12,6-13,0)	15,9 (14-18)	12,3 (11-15)	11,2 (10,0-12,5)	14,4 (12-16)
Положение вульвы (В), % от Д	74,7 (73-78)	72,7 (67-78)	73,3 (70-76)	71,5 (70,1-72,9)	72,6 (70,4-74,5)

† Нематоды, выделенные из естественного субстрата.

‡ Нематоды, выращенные на культуре грибов в течение одного года.

4.1.3 Сравнение вида *Bursaphelenchus xylophilus* со сходными видами

Ключевые признаки для определения видов рода *Bursaphelenchus* доступны (например, А.Ю.Рысс и колл., 2005), однако описание А.Ю.Рыссом этих двух признаков в упомянутой работе страдает тем же недостатком, что и прочие ранние описания видов рода *Bursaphelenchus* – они неполны и основываются на малом количестве образцов. Первоначальное описание 74 видов рода *Bursaphelenchus* см. в работе Виеры (Vieira *et al.* (2003)).

По мнению Брааша (Braasch, 2001), *B. xylophilus* является одним из видов группы *xylophilus*. Несмотря на то, что сегодня таксономисты спорят о том, сколько видов входит в эту группу, по меньшей мере 15 видов или подвидов (по состоянию на апрель 2015 года) причислены к группе *xylophilus* из-за наличия четырех бороздок (рис. 9), количества и положения хвостовых бугорков и параметров спиккулы, а также большого размера вульварного щитка (Gu *et al.*, 2005; А.Ю.Рысс и колл., 2005; Braasch *et al.*, 2009; Braasch and Schönfeld, 2015). По меньшей мере два вида рода *Bursaphelenchus* (*B. tryphloei*, см. Tomalak & Filipiak, 2011 и *B. masseyi*, см. Tomalak, Worrall & Filipiak, 2013) недавно были предложены для включения в группу *xylophilus*. Однако в основе настоящего протокола лежит последняя классификация Braasch and Schönfeld (2015), согласно которой данные виды не могут быть причислены к этой группе из-за морфологических особенностей спиккулы. Таким образом, членами группы *xylophilus* являются следующие виды:

- *B. xylophilus* (Steiner & Buhner, 1934; Nickle, 1970)
- *B. fraudulentus* (Rühm, 1956; Goodey, 1960)
- *B. mucronatus mucronatus* (Mamiya & Enda, 1979; Braasch, Gu & Burgermeister, 2011)
- *B. mucronatus kolymensis* (Braasch, Gu & Burgermeister, 2011)
- *B. conicaudatus* (Kanzaki, Tsuda & Futai, 2000)
- *B. baujardi* (Walia, Negi, Bajaj & Kalia, 2003)
- *B. luxuriosae* (Kanzaki & Futai, 2003)
- *B. doui* (Braasch, Gu, Burgermeister & Zhang, 2004)
- *B. singaporensis* (Gu, Zhang, Braasch & Burgermeister, 2005)
- *B. macromucronatus* (Gu, Zheng, Braasch & Burgermeister, 2008)
- *B. populi* (Tomalak & Filipiak, 2010)
- *B. paraluxuriosae* (Gu, Wang & Braasch, 2012)
- *B. firmae* (Kanzaki, Maehara, Aikawa & Matsumato, 2012)
- *B. koreanus* (Gu, Wang & Chen, 2013)
- *B. gillanii* (Schönfeld, Braasch, Riedel & Gu, 2013).

Вид *B. xylophilus* может быть разделен на две формы или популяции: круглохвостые и остроконечные (Gu *et al.*, 2011) (рис. 4). Остроконечные популяции в основном обнаруживаются в Северной Америке и очень схожи с видом *B. mucronatus kolymensis*.

Пятнадцать видов или подвидов группы *xylophilus* можно отличить от других видов рода *Bursaphelenchus* по форме спикул самцов и по характерной форме вульварного щитка у самок. Для отделения *B. xylophilus* от остальных 14 видов в группе используют признак формы хвоста самки (субцилиндрическая или цилиндрическая форма с округленной оконечностью, отсутствие остроконечия). Подробное описание ключевых признаков по всем видам группы *xylophilus*, а также рисунки с основными элементами приводятся в работе Braasch and Schönfeld (2015). У всех других видов группы *xylophilus* самки имеют конический или остроконечный хвост. Однако некоторые остроконечные популяции вида *B. xylophilus*, встречающиеся в Северной Америке, сложно отличить по морфологическим признакам от других остроконечных видов (рис. 4). Кроме того, самки *B. xylophilus*, выведенные в лаборатории, имеют типичный закругленный кончик хвоста, тогда как в образцах, полученных с зараженных или искусственно привитых деревьев, помимо самок с округлым хвостом, могут попадаться самки с остроконечным хвостом различной длины (рис. 4). Более подробную информацию по данному вопросу можно найти в работе Gu *et al.* (2011).

Самыми распространенными видами группы *xylophilus* являются виды *B. mucronatus mucronatus* и *B. mucronatus kolyomensis*. Данные виды распространены в Европе и Азии, их можно обнаружить также в Канаде (А.Ю.Рысс *и колл.*, 2005). Поэтому, пожалуй, чаще всего будут встречаться различия между видами *B. xylophilus* и *B. mucronatus mucronatus* или *B. mucronatus kolyomensis* (рис. 6 и 10).

Эталонные образцы 50 видов рода *Bursaphelenchus*, включая 41 подвид *B. xylophilus* из различных источников во всем мире, собраны в коллекции рода *Bursaphelenchus* в Институте Юлиуса Кюна, являющемся федеральным исследовательским центром культурных растений и институтом национальной и международной охраны здоровья растений (г. Брауншвейг, Германия).

4.2 Идентификация на молекулярном уровне

В данном разделе приводится информация о молекулярных исследованиях, позволяющих определить вид *B. xylophilus* из числа собранных нематод. Эти тесты обычно проводятся после морфологических исследований для подтверждения полученных результатов. В последующих подразделах представлены различные виды исследований по отдельным аспектам, что указывается в начале каждого раздела.

Для идентификации *B. xylophilus* имеется множество методов. Молекулярные исследования, описанные ниже, были рекомендованы при разработке настоящего протокола. Возможно проведение и других тестов. Идентификация на молекулярном уровне может проводиться при помощи обычных методов ПЦР (раздел 4.2.2) или методов ПЦР в режиме реального времени (раздел 4.2.3). Все данные методы, в частности, метод полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДФ) внутреннего транскрибируемого участка-спейсера (ITS) (раздел 4.2.1), эффективно использовались в лабораториях по всему миру, однако до сих пор не были апробированы с применением реакции кольцевой преципитации. Метод петлевой изотермической амплификации (LAMP-тест, раздел 4.2.5) был разработан для непосредственного обнаружения и идентификации целевых нематод в древесине.

В основе наиболее современного подхода к молекулярной идентификации лежит анализ секвенирования и штрих-кодирования ДНК (раздел 4.2.8). Данный подход требует доступа к аппаратуре для секвенирования и к достоверным описаниям последовательностей (например, к хранящимся в базе данных Q-bank (<http://www.q-bank.eu/Nematodes/>)), а также высококвалифицированного персонала для анализа последовательностей во избежание недостоверных результатов.

При использовании молекулярных методов обнаружения *B. xylophilus* в древесной продукции в фитосанитарных целях крайне важно проводить различие между живыми и мертвыми нематодами. Некоторые способы фитосанитарной обработки уничтожают *B. xylophilus* в

древесине, поэтому при использовании современных методов обнаружения, основанных на ДНК, нельзя различить, получен ли положительный результат из-за содержания в образце живых нематод или ДНК мертвых нематод. В целях фитосанитарного регулирования предпочтительнее использование молекулярных методов, основанных на РНК, позволяющих различать живых и мертвых нематод в древесине, (Leal *et al.*, 2013) (раздел 4.2.4). Данное обстоятельство следует принимать во внимание при выборе метода получения образцов нематод (например, вороночный метод воронки Бермана рассчитан на живых нематод; см. разделы 3.4 и 3.5) и молекулярного метода определения. По возможности положительный результат молекулярного теста следует подтвердить с помощью морфологической идентификации.

В этом диагностическом протоколе методы (включая упоминание торговых марок) приводятся в соответствие с официально опубликованными, так как они обеспечивают достижение заданного уровня чувствительности, избирательности и/или воспроизводимости. Использование в настоящем диагностическом протоколе названий реагентов, химических веществ или оборудования не подразумевает их использование в ущерб другим подходящим элементам. Описанные в протоколах лабораторные процедуры при условии надлежащей верификации могут быть адаптированы к стандартам конкретных лабораторий.

4.2.1 ITS-ПЦР ПДРФ

Бургермайстер (Burgermeister *et al.* (2005, 2009)) использовал основанный на ПЦР метод ITS-ПДРФ для того, чтобы отличить *B. xylophilus* от 43 других видов рода *Bursaphelenchus*. Почти все описания новых видов рода *Bursaphelenchus*, опубликованные после 2009 года, получены в результате применения основанного на ПЦР метода ITS-ПДРФ, разработанного Бургермайстером (Burgermeister *et al.* (2009)). Из всех методов молекулярных исследований, упомянутых в данном протоколе, данный метод оказался наиболее эффективным для определения самого большого числа видов рода *Bursaphelenchus*.

ДНК выделяется из нематод на различных этапах их жизни (взрослые самки и самцы, молодые неполовозрелые особи) с использованием набор для анализа ДНК QIAamp (Qiagen¹). Нематод (от 1 до 30 особей) помещают в 5 мкл воды в пробирки Eppendorf¹ и охлаждают до -20 °С до выделения ДНК. Перед экстракцией ДНК образец размораживают, перемешивают с 10 мкл буферного раствора ATL (Qiagen¹) и перемешивают до гомогенного состояния в пробирке Eppendorf¹ с использованием миниатюрного пестика для растирания (Eppendorf¹). После этого процесс экстракции ДНК ведется в соответствии с рекомендациями производителя для выделения ДНК (QIAamp DNA Micro Kit Handbook, Qiagen: “Isolation of genomic DNA from tissues”¹), за исключением следующих этапов. На этапе 4 инкубация длится 3 часа. На этапе 12 (элюидирование) от 20 мкл (для экстракции ДНК одной нематоды) до 100 мкл (для экстракции ДНК до 30 нематод) буферного раствора АЕ (Qiagen¹) наносится на мембрану. Элюат, содержащий извлеченную ДНК, хранится при температуре -20 °С до момента использования.

ITS-ПЦР ПДРФ анализ выполняется путем осуществления полимеразной цепной реакции (ПЦР) в выделенной ДНК, после этого осуществляется анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) на образце с проведенной ПЦР. Отрезок РНК нематоды, содержащий

¹ В этом диагностическом протоколе методы (включая упоминание торговых марок) приводятся в соответствие с официально опубликованными, так как они обеспечивают достижение заданного уровня чувствительности, избирательности и/или воспроизводимости. Использование названий реагентов, химических веществ или оборудования в этих диагностических протоколах не означает их одобрения и ограничения к использованию других, подходящих для этих целей. Описанные в протоколах лабораторные процедуры при условии надлежащей верификации могут быть адаптированы к стандартам конкретных лабораторий.

внутренние транскрибируемые участки –спейсеры (ITS), а именно первый участок-спейсер ITS1 и второй участок-спейсер ITS2, амплифицируется при ПЦР, образуя следующие основные пары:

ITS1-forward (F): 5'-CGT AAC AAG GTA GCT GTA G-3 '(Ferris *et al.*, 1993)

ITS2-reverse (R): 5'-TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG-3 '(Vrain, 1993)

Раствор с проведенной ПЦР (50 мкл) содержит 0,6 ммоль основных пар спейсеров каждый, 2 U Taq полимеразы ДНК (Stratageneили Fermentas¹), 10 ммоль 3-НСI (рН 8,8), 50 ммоль КСI, 2 ммоль MgCl₂, 0,2 ммоль дезоксинуклеотида (dNTPs) и 2 нг матричной ДНК. Процесс амплификации выполняется в термоциклере со следующими параметрами цикла: процесс денатурации при 94 °С в течение 2,5 минут, 40 циклов реакции (94 °С в течение 1 минуты, 55 °С в течение 1 минуты и 72 °С в течение 2 минут) и окончательная выдержка при 72 °С в течение 5 минут. После завершения процесса ПЦР 5 мкл аликвотной пробы продуктов ПЦР подвергаются гелиевому электрофорезу. Подходящие аликвотные пробы амплифицированной ДНК подвергаются преобразованию с помощью 3 U рестрикционной эндонуклеазы *AluI*, *HaeIII*, *HinfI*, *MspI* и *RsaI* в соответствии с инструкцией производителя.

B. xylophilus определяется на основе свойственных конкретному виду шаблонов рестрикционных фрагментов ДНК (рис. 15). Количество и размеры рестрикционных фрагментов ДНК были описаны по меньшей мере для следующих видов рода *Bursaphelenchus* (Gu, 2014): *B. abietinus*, *B. abruptus*, *B. africanus*, *B. anamurius*, *B. andrassyi*, *B. antoniae*, *B. arthuri*, *B. arthuroides*, *B. braaschae*, *B. burgermeisteri*, *B. chengi*, *B. conicaudatus*, *B. corneolus*, *B. doui*, *B. eggersi*, *B. eremus*, *B. fraudulentus*, *B. fuchsi*, *B. fungivorus*, *B. gerberae*, *B. gillanii*, *B. hellenicus*, *B. hildegardae*, *B. hofmanni*, *B. hylobianum*, *B. koreanus*, *B. leoni*, *B. luxuriosae*, *B. macromucronatus*, *B. masseyi*, *B. mucronatus mucronatus* (ранее *B. mucronatus* восточноазиатский тип), *B. mucronatus kolymensis* (ранее *B. mucronatus* европейский тип), *B. obeche*, *B. paraburgeri*, *B. paracorneols*, *B. Paraluxoriosae*, *B. paraparvispicularis*, *B. parathailandae*, *B. parvispicularis*, *B. pinasteri*, *B. pinophilus*, *B. poligraphi*, *B. populi*, *B. posterovolvus*, *B. rainulfi*, *B. seani*, *B. sexdentati*, *B. silvestris*, *B. Sinensis*, *B. singaporensis*, *B. thailandae*, *B. tusciae*, *B. vallesianus*, *B. willibaldi*, *B. xylophilus*, *B. yongensis* и *B. yuyaoensis*.

B. hunanensis и *B. lini* предлагается переклассифицировать как не относящихся к роду *Bursaphelenchus*. Бургермайстер (Burgermeister *et al.* (2009)) приводит полный список шаблонов и длин фрагментов ДНК, полученных с помощью ITS-ПДРФ-метода для 44 видов *Bursaphelenchus*. Пример определения видов с помощью шаблонов рестрикционных фрагментов, полученных с помощью метода ITS-ПДРФ для *B. xylophilus*, *B. mucronatus mucronatus* и *B. mucronatus kolymensis*, приведен в Таблице 2.

Таблица 2. Шаблоны полиморфизма рестрикционных фрагментов (ПДРФ) видов рода *Bursaphelenchus*

Виды	Результат ПЦР (основные пары)	Рестрикционные фрагменты (основные пары), образованные расщепляющим энзимом				
		<i>RsaI</i>	<i>HaellI</i>	<i>MspI</i>	<i>HinfI</i>	<i>AluI</i>
<i>B. mucronatus</i> восточноазиатский тип = <i>B. mucronatus mucronatus</i>	920	486	621	355	408	674
		412	299	302	232	246
		12		263	121	
					86	
					49	
			24			

Виды	Результат ПЦР (основные пары)	Рестриктонные фрагменты (основные пары), образованные расщепляющим энзимом				
		<i>RsaI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>MspI</i>	<i>HinfI</i>	<i>AluI</i>
<i>B. mucronatus</i> европейский тип = <i>B. mucronatus</i> <i>kolyomensis</i>	925	413	625	356	412	678
		263	195	303	232	247
		227	105	266	121	
		22			87	
<i>B. xylophilus</i>	925	483	728	562	263	433
		420	197	363	232	256
		22			142	142
					139	96
					125	
					24	

Источник: Burgermeister *et al.* (2009).

4.2.2 Традиционный ПЦР-метод

Следующие ПЦР-тесты дают возможность провести идентификацию конкретных видов *B. xylophilus*, но не могут определить присутствие других видов рода *Bursaphelenchus*.

4.2.2.1 Традиционный ПЦР-метод определения при ITS рекомбинантной ДНК

Метод для определения конкретного вида *B. xylophilus*, применяемый для выделения отрезка ITS1–ITS2 рДНК, был описан Мацунага и Тогашаи (Matsunaga and Togashi (2004)). Этот метод прошел апробацию при определении 5 и 4 видов японской популяции *B. xylophilus* и *B. mucronatus*, соответственно. Протокол этого эксперимента приводится ниже.

Нематоды по отдельности помещают в 5 мкл буферного раствора для лизиса клеток (50 ммоль KCl, 10 ммоль 3-NCl (pH 8,2), 2,5 ммоль MgCl₂, 0,45% (вес/объем) Nonidet P-40, 0,45% (вес/объем) Tween 20, 0,01% (вес/объем) желатина и 0,06 мг/мл протеиназы-K) в 0,2 мл пробирку MicroAmp (Applied Biosystems¹) и выдерживают при температуре -70 °C или ниже в течение 10 минут (при выделении ДНК применяется метод, предложенный Барстедом (Barstead *et al.*, 1991)). После размораживания при комнатной температуре раствор ДНК нагревают до 60 °C в течение 1 часа, а затем при 95 °C в течение 15 минут. Получившийся неочищенный раствор ДНК используется в качестве шаблона для конкретной ПЦР. ПЦР проводится с использованием следующих пар праймеров:

X-F: 5'-ACG ATG ATG CGA TTG GTG AC-3 '

X-R: 5'-TAT TGG TCG CGG AAC AAA CC-3 '

ПЦР протекает в 10 мкл реакционной смеси, содержащей приготовленный заранее шаблон/матрицу ДНК (5 мкл базовой вытяжки ДНК), 50 ммоль KCl, 10 ммоль Tris (pH 8,3), 1,5 ммоль MgCl₂, 0,001% желатина, 200 ммоль dNTP каждого вида, 5 пмоль основных пар (праймеров) и 0,25 U Taq полимеразы ДНК (AmpliTaq Gold, Applied Biosystems¹) и с применением термоциклера Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystems¹). После денатурации при 94 °C в течение 5 минут процесс повторяется в течение 35 циклов (94 °C в течение 30 секунд, 55,9 °C в течение 30 секунд и 72 °C в течение 1 минуты) и окончательной выдержкой при 72 °C в течение 6 минут.

В результате этой реакции образуется ампликон ДНК, содержащий 557 основных пар от всех исследованных *B. xylophilus*.

4.2.2.2 Традиционный ПЦР-метод, применяемый для сателлитной ДНК

Метод определения конкретного вида *B. xylophilus* с использованием ПЦР-метода, основанного на сателлитной ДНК, был описан Кастаньоне (Castagnone *et al.* (2005)). Его специфичность была проверена на нецелевых видах рода *Bursaphelenchus* (*B. leoni*, *B. mucronatus* и *B. tusciae*), а также на одной японской и двух канадских популяциях *B. xylophilus*.

Аmplификация производится по ДНК отдельных особей нематод, подготовленной в соответствии с методом ПЦР, усовершенствованным на основе работы Williams *et al.* (1992). Отдельные нематоды помещаются в ПЦР-пробирку и сверху заполняются 2,5 мкл буфера для лизиса клеток (50 ммоль KCl, 10 ммоль Tris (pH 8,2), 2,5 ммоль MgCl₂, 60 мг/мл протеиназы-K, 0,45% Nonidet P-40, 0,45% Tween 20 и 0,01% желатина). Пробирки охлаждаются при -80 °C в течение 45 минут и затем немедленно помещаются в термоциклер, где выдерживаются при 60 °C в течение 60 минут и затем 95 °C в течение 15 минут. Получившийся неочищенный раствор ДНК используется в качестве матрицы-шаблона в каждой конкретной ПЦР.

Основные праймеры ПЦР, используемые в реакции, предназначены для склеивания обоих концов состоящего из 160 основных пар мономера семейства сателлитной ДНК, ранее описанной в *B. xylophilus* (Tarès *et al.*, 1993; номер доступа GenBank L09652):

J10-1: 5'-GGT GTC TAG TAT AAT ATC AGA G-3 '

J10-2Rc: 5'-GTG AAT TAG TGA CGA CGG AGT G-3 '

ПЦР проводится в 25 мкл раствора, содержащего заранее подготовленные матрицы-шаблоны ДНК (5 мкл неочищенного раствора ДНК), 50 ммоль KCl, 10 ммоль Tris (pH 8,2), 2,5 ммоль MgCl₂, 200 ммоль каждого конкретного вида dNTP, 250 нг каждого конкретного праймера и 1 U Taq DNA полимеразы (QBiogene¹). После денатурации при 94 °C в течение 5 минут процесс повторяется в течение 25 циклов (94 °C в течение 30 секунд, 64 °C в течение 1 минуты и 72 °C в течение 1 минуты) с окончательной выдержкой при 72 °C в течение 5 минут.

Ввиду того, что семейство сателлитных ДНК состоит из повторяющихся отрезков, сгруппированных в двоянные ряды (Tarès *et al.*, 1993), амплификацию последовательности мультимеров, состоящих из 160 основных пар мономеров, получают в результате ПЦР с использованием ДНК *B. xylophilus* в качестве шаблона. И наоборот, в случае прочих видов рода *Bursaphelenchus* амплификация не наблюдается, что дает простой и надежный способ получения однозначно положительного либо отрицательного результата на *B. xylophilus* (Castagnone *et al.*, 2005).

4.2.3 Метод ПЦР в режиме реального времени

Метод ПЦР в режиме реального времени может применяться для идентификации непосредственно *B. xylophilus*. Как правило, этот метод тестирования более точный и требует меньше времени по сравнению с традиционными методами ПЦР, описанными в разделах 4.2.1 и 4.2.2.

4.2.3.1 Метод ПЦР в режиме реального времени для последовательностей сателлитных ДНК

Учитывающий видовые особенности метод определения *B. xylophilus* с использованием последовательностей сателлитных ДНК был описан Франсуа (François *et al.* (2007)). Этот метод обладает высокой чувствительностью и позволяет регистрировать от 1 пг геномной ДНК и отдельные особи нематод в смешанных образцах, в которых помимо *B. xylophilus* находятся близкие виды *B. mucronatus* с погрешностью, соответственно 0,01% и 1%. Этот метод также позволяет определять наличие *B. xylophilus* непосредственно в 100-мг образцах древесины.

ДНК выделяется из отдельных нематод, взятых из чистых культур с использованием упрощенных процедур, как описывалось ранее (Castagnone *et al.*, 2005), с незначительными изменениями: объем используемого буферного раствора для лизиса клеток не является постоянным, а зависит от числа нематод (т.е. 3 мкл для 1-4 нематод и 20 мкл для большего числа).

Выделение ДНК из древесины, зараженной *B. xylophilus*, выполняется с использованием набора для генного анализа растений ChargeSwitch (Invitrogen¹). Приблизительно 0,1 г зараженной древесины нарезается небольшими кусочками и помещается в пластиковый пакет с 5 мл буферного раствора для лизиса клеток CST, содержащего 1% поливинилпирролидона и 20 ммоль хлорида кальция. Образцы слегка размалываются с использованием молотка, после отбирается 1 мл лизата и обрабатывается согласно инструкциям производителя. 100 мкл додецилсульфата натрия добавляется в лизат, который после этого выдерживается при комнатной температуре в течение 5 минут, затем в него добавляется 400 мкл буферного раствора для осаждения и смесь центрифугируется на максимальной скорости (приблизительно 18 000g) в течение 5 минут. До 1 мл надосадочной жидкости удаляется и в надосадочную жидкость добавляется 100 мкл очищающего средства CST и 40 ммоль крупинок CST. Пробоотборник PickPen 8-M (Bio-Nobile¹) используется во время двухэтапного процесса очищения крупинок CST и связанной ДНК (на каждом этапе используется 1 мл буферного чистящего раствора CST) и добавления 150 мкл буферного элюзионного CST раствора в 2,2-мл планшет с глубокими лунками. В результате этого удаляются магнитные частицы. ДНК изучается немедленно либо хранится при -20 °C для будущих исследований.

В этом методе используются следующие основные праймеры и зонд TaqMan:

BsatF: 5'-TGA CGG AGT GAA TTG ACA AGA CA-3 '

BSatRV: 5'-AAG CTG AAA CTT GCC ATG CTA AA-3 '

Флуоресцентные зонды TaqMan BSatS: 5'-FAM-ACA CCA TTC GAA AGC TAA TCG CCT GAG A-TAMRA-3 '

ПЦР проводят в суммарном объеме раствора 25 мкл, содержащем 1 мкл геномной ДНК. Для каждой реакции требуется 2,5 мкл буферного раствора для реакции концентрацией 10x (qPCR CoreKit, Eurogentec¹), 5 ммоль MgCl₂, 200 мкмоль каждого вида dNTP, 0,5 U Taq полимеразы (qPCR Core Kit¹), по 200 нмоль праймера и зонда. Исследования ПЦР в режиме реального времени проводятся в термоциклере DNA Engine Opticon 2 (MJ Research¹). Параметры цикла: 95 °C в течение 10 минут, далее -30 циклов каждый при 95 °C в течение 15 секунд и при 59 °C в течение 30 секунд. Данные анализируются с помощью ПО Opticon 2 Monitor версия 3.1¹ при соблюдении инструкций производителя. Вытяжки исследуются неразведенными или разведенными в пропорции 1:10 в безнуклеазной воде.

Исследование образцов древесины с помощью ПЦР в режиме реального времени выполняется на циклере SmartCycler II (Cepheid¹). Для каждой реакции требуется 0,025 U/мкл Hot Taq (Biogene¹), 1 буферный раствор для ПЦР, 0,2 ммоль dNTP каждого вида, 5,5 ммоль MgCl₂, 5% трегалозы (вес/объем), по 300 нмоль праймера каждого вида и 100 нмоль зонда. Параметры цикла: 95 °C в течение 10 минут, затем 40 двухэтапных циклов: при 95 °C в течение 15 секунд и при 60 °C в течение 1 минуты. Полученные данные анализируются с помощью базовых установок в ПО SmartCycler II¹ (30 люминесцирующих единиц). Вытяжки исследуются неразведенными или разведенными в пропорции 1:10 в безнуклеазной воде.

4.2.3.2 Метод ПЦР в режиме реального времени для определения нуклеотидной генной последовательности гена *hsp70*

Метод ПЦР в режиме реального времени, основанный на белке гена теплового шока (*hsp70*), был разработан Лилом (Leal *et al.* (2007)). Этот метод показал свою эффективность для определения *B. xylophilus* (он был проверен на 5 изолятах *B. xylophilus*). При этом не наблюдалось амплификации для 7 нецелевых видов *Bursaphelenchus*. Этот метод ПЦР, основанный на белке

гена теплового шока *hsp70*, обладает достаточной чувствительностью для определения не менее 0,005 нг геномной ДНК *B. xylophilus*, а также ДНК, выделенной из единичных особей нематод.

Для выделения ДНК применяется метод, разработанный Бургермейстером (Burgermeister *et al.* (2005)), со следующими изменениями: 1) выдержка образца гомогената производится при 56 °С в течение ночи вместо 3 часов; 2) РНК в качестве переносчика используется только тогда, когда ДНК выделяется из единичных особей нематод; 3) элюирующий буфер (10 ммоль 3-НCl, pH 8,0) наносится на мембрану мини-колонны и выдерживается в течение 5 минут перед центрифугированием для элюирования образца ДНК; 4) вытяжки ДНК нагреваются до 55 °С в течение 5 минут для удаления остаточного этанола, который впоследствии может повлиять на процесс измерения качества и количества ДНК и амплификации во время ПЦР; 5) образцы элюируют в 30 мкл (для отдельных особей нематод) и 50 мкл (для образцов, содержащих более 1 особи нематоды).

В этом методе используются следующие праймеры и зонд TaqMan (подстрочный символ означает заблокированные нуклеиновые кислоты):

VxLNAF: 5'-TAA GAT GTC TTT tAc AGA TGc CAA G-3 '

VxLNAR: 5'-GCc TGG ACG AcC TTG AAT-3 '

Зонд TaqMan с двойной меткой VxLNAP: 5'-FAM-AtT GgC CGC AAA TtC GaT GAa CC-IAblkFQ-3 '

ПЦР проводится в 20 мкл объема реакционного раствора, содержащего 5 мкл матрицы-шаблона ДНК, 50 ммоль Tris (pH 8,3), 0,25 мг/мл неацетилованного альбумина бычьей сыворотки (BSA) (Sigma¹), 0,1 мкмоль зонда, 0,7 мкмоль первичного праймера, 0,5 мкмоль обратного праймера, 0,4 ммоль каждого вида dNTP (Roche¹), 5,0 ммоль MgCl₂ и 1,0 U FastStart Taq полимеразы ДНК (Roche¹). Амплификация проводится в термоциклере LightCycler 1.5 (Roche Diagnostics¹) при следующих параметрах: первоначальная денатурация и активация ДНК полимеразы FastStart Taq (Roche Diagnostics¹) проводится при 95 °С в течение 10 минут, затем в течение 45 циклов, включая денатурацию при 94 °С в течение 5 секунд, денатурацию при 62 °С в течение 20 секунд и выдержку при 72 °С в течение 10 секунд. Полученные данные анализируются с помощью ПО LightCycler версии 3.5¹.

Для гарантии качества очищенной геномной ДНК нематоды, используемой в этом тестировании, амплификация с контрольными праймерами ITS1-F и ITS2-R (праймеры, описанные в разделе 4.2.1) проводится с помощью традиционного ПЦР-метода. 25 мкл реакционной смеси для ПЦР состоят из 5 мкл матрицы-шаблона, 2,5 мкл буферного раствора с 10-кратной концентрацией (50 ммоль 3-НCl, 10 ммоль KCl, 5 ммоль (NH₄)₂SO₄; pH 8,3), 1,5 ммоль MgCl₂, 1 мкмоль каждого вида праймера, 1,6 мкг BSA, 0,2 ммоль каждого вида dNTP и 1 U FastStart Taq полимеразы ДНК (Roche¹). Параметры цикла включают первоначальную денатурацию при 94 °С в течение 5 минут, затем 40 циклов, включающих нагрев до 94 °С в течение 1 минуты, до 55 °С в течение 1 минуты и до 72 °С в течение 2 минут с окончательной выдержкой при 72 °С в течение 5 минут.

4.2.4 РНК-молекулярное тестирование для определения живых

Bursaphelenchus xylophilus

Нижеописанные тесты предназначены для определения лишь живых нематод. Возможен выбор между традиционной ПЦР и методом ПЦР с применением обратного транскрибирования в режиме реального времени (ОТ-ПЦР).

4.2.4.1 Традиционный ОТ-ПЦР-метод для определения *hsp70* отрезка ДНК

Традиционный метод ОТ-ПЦР для выявления живых *B. xylophilus*, основанный на идентификации отрезка *hsp70* генома, был описан Лилом (Leal *et al.* (2013)). При этом исследовании прямые и обратные праймеры располагаются на одной из сторон интрона *hsp70*

таким образом, что геномную ДНК можно легко отличить от комплементарной ДНК по длине ампликона. Результативность этого метода тестирования была оценена на 6 нецелевых видах рода *Bursaphelenchus* и 6 изолятах вида *B. xylophilus*. Предел чувствительности этого метода составляет 0,4 нематоды на реакцию, что было подтверждено 3 повторными исследованиями с положительными результатами.

РНК и геномная ДНК выделяются как минимум из 20 нематод. Одновременное выделение РНК и геномной ДНК осуществляется с помощью тест-набора AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen¹) в соответствии с инструкцией производителя со следующими изменениями: диски с нематодами, хранившиеся при -80 °С, измельчаются с помощью пестика Kontes Pellet Pestle компании "Kimble Chase Life Science and Research Products"¹, и к каждому диску с нематодами добавляется 350 мкл буферного раствора для лизиса клеток RLT (из экстрактивного набора Qiagen¹). Процесс гомогенизации осуществляется с использованием аппарата QIAshredder Mini Spin Columns (Qiagen¹). РНК элюируют из колонны с использованием 20 мкл безрибонуклеазной воды, а ДНК элюируется с использованием 50 мкл заранее подогретого буферного раствора EB (из экстрактивного набора Qiagen¹). Элюат может оставаться на мембранах колонн аппарата около 3 минут для максимального элюирования за одно центрифугирование.

Праймеры для *B. xylophilus*, используемые в этом тестировании, указаны ниже, а ампликон, полученный из комплементарной матрицы-шаблона ДНК, составляет 473 основные пары:

Hsp23F1: 5'-ACC CAA GTT TGA GTT GTA TTG TTT-3 '

Hsp19R2: 5'-ACG GTA ACA ACG GCA TCC T-3 '

Следующие контрольные праймеры взаимодействуют с геном актина и могут быть добавлены для обеспечения результативности тестирования при исследовании изолированной геномной ДНК. С помощью этих праймеров получается ампликон из 228 базовых пар:

VxActF3: 5'-TCG TCA CCA ACT GGG ATG ATA-3 '

VxActR3: 5'-CAC CAG TGG TAC GAC CG-3'

Применяется двухэтапный протокол ОТ-ПЦР. Реакция ОТ завершается с использованием синтез-набора для транскрибирования первой нити комплементарной ДНК Transcriptor First Strand cDNA (Roche Diagnostics¹) с применением протокола по олигофиксированному (dT)18 праймеру. Для синтеза комплементарной ДНК в качестве стартового материала используется 12 мкл РНК. Также включен предложенный производителем набора необязательный этап денатурации РНК и праймеров при температуре 65 °С в течение 10 минут при последующем резком охлаждении на льду. После завершения синтеза комплементарной ДНК ее образцы хранятся при -20 °С для последующего использования в качестве матрицы-шаблона.

25 мкл ПЦР раствора содержат 2 мкл комплементарной ДНК в качестве матрицы-шаблона, 19 мкл буферного раствора для ПЦР GoTaq Flexi PCR (Promega¹), 1,5 ммоль MgCl₂, 0,20 ммоль каждого вида dNTP (Roche Diagnostics¹), 1,25 U полимеразы ДНК GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega¹) и 0,4 мкмоль каждого вида праймера (Hsp23F1 и Hsp19R2). Амплификация проводится при следующих параметрах цикла: первоначальная денатурация при 95 °С в течение 5 минут, за которой следуют 35 циклов амплификации, состоящих из денатурации при 95 °С в течение 30 секунд, ренатурации при 60 °С в течение 30 секунд, отпуска при 72 °С в течение 1 минуты и окончательной элонгации при 72 °С в течение 5 минут. При амплификации с контрольными праймерами 25 мкл раствора ПЦР характеризуются теми же параметрами, что описаны выше, за исключением того, что используются 1 мкл геномной ДНК (40 ng/μl) и по 1 мкмоль каждого вида праймера (VxActF3 и VxActR). Амплификация проводится при следующих параметрах цикла: первоначальная денатурация при 95 °С в течение 5 минут, за которой следуют 35 циклов (при 95 °С в течение 30 секунд, при 52 °С в течение 30 секунд и при 72 °С в течение 1 минуты), и окончательная элонгация при 72 °С в течение 5 минут.

4.2.4.2 Метод ОТ-ПЦР в режиме реального времени для последовательности *hsp70* комплементарной ДНК

Применение метода SYBR Green ОТ-ПЦР в режиме реального времени для обнаружения живых *B. xylophilus* исключительно путем определения присутствия последовательности *hsp70* в митохондриальной ДНК в качестве надежного маркера было описано Лилом (*Leal et al.* (2013)). С помощью этого метода определяется специфическая амплификация обратной транскрибированной последовательности *hsp70* комплементарной ДНК *B. xylophilus*, так как обратный праймер заворачивается на экзон-интронном стыке, прекращая тем самым амплифицированную геномной ДНК. Его избирательность была проверена на 6 нецелевых видах *Bursaphelenchus* и 6 изолятах *B. xylophilus*. Предел чувствительности этого метода составляет 0,25 нематоды на реакцию, что было подтверждено 3 повторными исследованиями с положительными результатами.

Протокол для одновременного выделения РНК и геномной ДНК выглядит так же, как и при применении традиционного метода ПЦР (раздел 4.2.4.1).

Праймеры, используемые при этом тестировании:

HspexF3: 5'-AGA ACC ACT CCC TCG TAT GTC-3'

HspexR3: 5'-TCA AAC GCT TGG CAT CAA-3'

Для проверки корректности тестирования для внутреннего контроля могут добавляться следующие праймеры:

VxActF3: 5'-TCG TCA CCA ACT GGG ATG ATA-3'

VxActR3: 5'-CAC CAG TGG TAC GAC CG-3'

Применяется двухэтапный протокол ОТ-ПЦР и синтез комплементарной ДНК проводится так же, как и при традиционном ПЦР-методе (раздел 4.2.4.1), за исключением того, что применяется либо олигофиксированный (dT)18 праймер, либо праймер, специфичный к последовательности (HspexR3). После завершения синтеза комплементарной ДНК ее образцы хранятся при -20 °C для последующего использования в качестве матрицы-шаблона.

20 мкл реакционного раствора для ПЦР состоят из 5 мкл матрицы-шаблона комплементарной ДНК (разведенной в пропорции 1:10 в 10 ммоль Tris, pH 8,0), 0,6 мкмоль прямого праймера (HspexF3), 0,4 мкмоль обратного праймера (HspexR3) и 4 мкл реагента 5× LightCycler FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green 1 Mix (Roche Diagnostics¹). Амплификация в режиме реального времени проводится в аппарате LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics¹) с применением ПО LightCycler версии 4.1¹ при следующих параметрах цикла: первичная денатурация и активация при 95 °C в течение 10 минут, после которой следуют 40 циклов (при 95 °C в течение 15 секунд, при 66 °C в течение 10 секунд и при 72 °C в течение 15 секунд). При амплификации с контрольными праймерами 20 мкл раствора ПЦР характеризуются теми же параметрами, что описаны выше, за исключением того, что используются по 0,5 мкмоль каждого вида праймера (VxActF3 и VxActR). Амплификация проводится при следующих параметрах цикла: первичная денатурация и активация при 95 °C в течение 10 минут, за которой следуют 45 циклов (при 95 °C в течение 15 секунд, при 52 °C в течение 10 секунд и при 72 °C в течение 15 секунд).

4.2.5 Метод петлевой изотермической амплификации (LAMP)

Метод выявления *B. xylophilus* в образцах древесины был описан Кикучи (*Kikuchi et al.* (2009)). Эти авторы разработали метод для ускоренного и более точного выявления *B. xylophilus* по сравнению с методом TaqMan в ПЦР в режиме реального времени, также разработанным этим коллективом. Избирательность действия праймеров и метода LAMP была проверена на ДНК, выделенном из материала нецелевой группы: 10 различных видов нематод, относящихся к роду *B. xylophilus*, 6 нецелевых родов нематод, а также видов *P. thunbergii*, *P. densiflora* и *B. fuckeliana*.

Чувствительность метода LAMP была установлена на уровне 10 копий целевого гена (ITS) и $2,5 \times 10^{-5}$ нематоды, отделенной от чистой культуры.

Образцы древесины (для тестирования требуется около 0,12 г древесины) выдерживают при 55 °С в течение 20 минут в 800 мкл буферного раствора для экстракции, содержащего протеиназу-К и дитиотрейтол, входящих в набор по определению *B. xylophilus* (Nippon Gene¹), за которым следует выдержка при 95 °С в течение 10 минут.

В этом методе применяются следующие LAMP праймеры:

ITS(ID19) F3: 5'-GCA GAA ACG CCG ACT TGT-3'

ITS(ID19) B3: 5'-TCA TCC GAA CGT CCC TGA C-3'

ITS(ID19) FIP: 5'-CGC GGA ACA AAC CGC GTA AAA C-CG TTG TGA CAG TCG TCT C G-3'

ITS(ID19) BIP: 5'-AGA GGG CTT CGT GCT CGA TTG GCC GTT GAA ACA ACA TCA CC-3'

ITS(ID19) LF: 5'-AGA TGG TGC CTA ACA TTG CG-3'

Реакция LAMP проводится в соответствии с алгоритмом, разработанным Нотоми (Notomi *et al.* (2000)) с применением набора для амплификации ДНК Loopamp DNA Amplification Kit (Eiken Chemical¹). 25 мкл реакционной смеси содержит 2 мкл выделенной ДНК, 5 пмоль каждого из праймеров F3 и B3, 40 пмоль каждого из праймеров FIP и BIP, 20 пмоль праймера LF, 12,5 мкл реакционной смеси концентрацией 2х, 1 мкл Bst полимеразы ДНК и 1 мкл флуоресцирующего реагента (Eiken Chemical¹). Реакционная смесь выдерживается при 63 °С от 60 до 120 минут и процесс завершается выдержкой при 80 °С в течение 2 минут. LAMP-ампликоны регистрируются по изменению цвета раствора в ультрафиолетовом свете.

Наличие ампликонов можно также установить с помощью системы определения с применением зондов. Для LAMP-реакции используется 5'- биотинилированная форма прямого внутреннего праймера. После проведения LAMP-реакции 10 мкл зонда, помеченного флуоресцинизиотиоцианатом (10 пмоль/мкл; 5'-GGC GAG AGG GCT TCG TGC TCG ATT GTC GTG C-3'), предназначенного для присоединения к внутренним секторам целевой последовательности, добавляется в реакционную смесь, которая затем выдерживается при 95 °С в течение 5 минут, затем медленно охлаждается до 25 °С. Реакционная смесь разбавляется 100 мкл электродного буфера (буферный фосфатный рассол, содержащий 3% полисорбата) и наносится непосредственно на полоски HybriDetect (Milenia Biotec¹) в соответствии с инструкциями производителя. Полоски HybriDetect определяют фрагменты, содержащие как биотин, так и флуоресцинизиотиоцианат, являющиеся продуктом специфической амплификации. И наоборот, при неспецифической амплификации сигнала на уровне тестовой полосы не наблюдается.

4.2.6 Контроль в молекулярных исследованиях

Для обеспечения достоверности полученных результатов исследований необходимы соответствующие способы контроля, которые зависят от вида исследования и требуемого уровня достоверности. Они должны быть разработаны для каждой конкретной последовательности изолированных нуклеиновых кислот и амплификации целевой нуклеиновой кислоты вредного организма. При молекулярных тестах как минимум рекомендуется применять такие средства контроля, как положительный контроль на нуклеиновую кислоту, отрицательный контроль на амплификацию (контроль отсутствия матрицы-шаблона) и, в соответствующих случаях (например, при прямом обнаружении нематоды), внутренний контроль. При ОТ-ПЦР (традиционной или в режиме реального времени) следует применять положительный контроль на обратную транскрипцию.

Положительный контроль на наличие нуклеиновой кислоты. Этот способ контроля применяется для мониторинга соответствия проведения теста условиям и параметрам эксперимента. Положительным контролем может быть любая нуклеиновая кислота, содержащая целевую последовательность, а именно нуклеиновая кислота *B. xylophilus*, присутствие которой было определено в предыдущем тестировании; плазида, содержащая клонированную целевую последовательность; транскрибированная в лаборатории РНК; продукт предыдущей реакции амплификации; синтезированная двухцепочечная ДНК или протяженный олигонуклеотид.

Отрицательный контроль амплификации (контроль на отсутствие матрицы-шаблона). Этот контроль необходим при ПЦР для исключения ложноположительного тестирования вследствие загрязнения при приготовлении реакционной смеси или неспецифической амплификации. Вода для ПЦР, предназначенная для приготовления реакционной смеси, добавляется на этапе амплификации.

Внутренний контроль. При традиционной ПЦР, а также ПЦР в режиме реального времени и LAMP-реакции для исключения ложноотрицательного тестирования ПЦР вследствие невыделения нуклеиновой кислоты, ее разрушения или присутствия ингибиторов ПЦР могут использоваться такие эндогенные средства контроля, как проверка на наличие отрезка ITS, 18S рестриктазной РНК, бета-актина или ЦОГ генов.

При ОТ-ПЦР для подтверждения отсутствия загрязнения образцов РНК геномной ДНК контролируется отсутствие обратной транскриптазы. При этом контроле используются все реагенты для ОТ-ПЦР, за исключением энзима обратной транскриптазы. При отсутствии загрязнения геномной ДНК этот контроль не должен давать сигнал после амплификации.

Для ОТ-ПЦР в целях подтверждения корректного функционирования энзима обратной транскриптазы должен проводиться положительный контроль присутствия обратной транскриптазы. При этом контроле используются все реагенты, применяемые для ОТ-ПЦР, а также вытяжка РНК, содержащая целевую последовательность теста (например, вытяжка РНК, сделанная лабораторией и ранее протестированная как положительная). Этот контроль должен давать сигнал после амплификации.

При применении как метода ПЦР, так и метода LAMP требуется принимать меры предосторожности во избежание взаимного загрязнения аэрозолями положительных контролей или давших положительные результаты образцов.

4.2.7 Трактовка результатов ПЦР

4.2.7.1 Традиционный метод ПЦР

Тест ПЦР для конкретного патогенного микроорганизма засчитывается лишь в том случае, когда:

- положительный контроль дает ампликоны ожидаемого для целевой нематоды размера;
- отрицательный контроль на выделение и отрицательный контроль на амплификацию не дают ампликонов ожидаемого для целевой нематоды размера.

При использовании праймеров внутреннего контроля в симплексных реакциях положительные контроли, равно как и каждый тестируемый образец, должны давать ампликоны ожидаемого размера. При мультиплексных реакциях все негативные образцы должны давать ампликоны ожидаемого размера. В некоторых случаях положительные на наличие нематоды пробы могут также давать ампликоны ожидаемого размера с праймерами внутреннего контроля.

Тест образца будет считаться положительным, если в результате будет получен ампликон правильного размера.

4.2.7.2 ПЦР в режиме реального времени

Результаты ПЦР в режиме реального времени засчитываются лишь в следующих случаях:

- положительный контроль с использованием специфических для целевой нематоды праймеров дает кривую амплификации;
- отрицательный контроль не дает кривую амплификации.

При применении праймеров внутреннего контроля положительный контроль и каждый из тестируемых образцов должны дать кривую амплификации.

4.2.8 Секвенирование

Несколько геномных отрезков были непосредственно выделены из изолированных нематод (одной в исследовании Wu *et al.* (2013) или множества, полученного с культур грибов в исследовании Ye *et al.* (2007)) для идентификации вида *B. xylophilus* и дифференциации различных видов рода *Bursaphelenchus*. Эти отрезки должны содержать внутренние транскрибируемые спейсеры (ITS-1, ITS-2, 5.8S) рестриктазой ДНК (Abelleira *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2013) или отрезок D2–D3 гена 28S рестриктазой РНК (Ye *et al.*, 2007). Целевой отрезок амплифицируется при ПЦР, а ампликоны секвенируются либо напрямую, либо после их копирования. Данные секвенирования могут быть проанализированы с помощью метода BLAST (базовый метод поиска локального выравнивания), описание которого размещено Национальным центром биотехнологической информации США (NCBI) по адресу <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Эти данные можно сравнить с последовательностями для рода *Bursaphelenchus*, описание которых имеется в базе данных NCBI (например, номера доступа HQ646254 и KC460340 для упомянутого выше отрезка ITS и от AY508105 до AY508109 для отрезка 28S рРНК).

В случае, если для гена ITS расхождение парных последовательностей образца в сравнении с последовательностями известного вида *B. xylophilus* составляет менее 2%, но более 2% по сравнению со всеми остальными видами, то образец идентифицируется как *B. xylophilus*. В случае, если для гена 28S расхождение парных последовательностей образца в сравнении с последовательностями известного вида *B. xylophilus* составляет менее 0,5%, но более 0,5% по сравнению со всеми остальными видами, то образец идентифицируется как *B. xylophilus*. Любые другие полученные результаты должны быть перепроверены.

Для идентификации видов также можно использовать область субъединицы I цитохромоксидазы гена COI. Методическое руководство и справочная информация по последовательностям взяты из справочного материала (последовательность Q38), доступного по ссылке Q-базы данных (<http://www.q-bank.eu/Nematodes/>), включая метод BLAST.

5. Данные

Свидетельства и данные должны фиксироваться так, как это описано в разделе 2.5 МСФМ 27 (*Диагностические протоколы для регулируемых вредных организмов*).

Если по результатам диагностики могут быть затронуты интересы других договаривающихся сторон, в частности, в случаях несоответствия (МСФМ 13 (*Руководство по нотификации о несоответствии и экстренном действии*)), или если вид *B. xylophilus* был впервые обнаружен в определенной местности, следующие факты, данные и дополнительный материал должны фиксироваться и храниться не менее одного года таким образом, чтобы обеспечить прослеживаемость:

- образец нематоды в виде постоянного препарата либо зафиксированный в растворе ТАФ или глицерине. В случаях, когда *B. xylophilus* впервые обнаруживается в той или иной местности, было бы полезным в целях дальнейшего исследования пути распространения вывести культуру живых *B. xylophilus*, размноженных на *B. cinerea*. Образцы особей и их

ДНК также могут пригодиться для молекулярных исследований на более позднем этапе, даже в случае морфологической идентификации.

- При идентификации с помощью молекулярных методов выделенная ДНК может храниться при температуре -20 °С, а выделенная РНК – при температуре -80 °С.
- При обнаружении *B. xylophilus* в древесине или в древесной продукции, включая упаковочные материалы, вместо информации о географическом месте отбора проб фиксируются данные о происхождении, материале (например, круглый лес, деревянная упаковка) и условиях ввоза (например, одновременное обнаружение жуков-переносчиков). Необходимо учитывать, что происхождение деревянной тары не обязательно совпадает с происхождением товара. Согласно МСФМ 15 (*Руководство по регулированию древесных упаковочных материалов в международной торговле*), древесные упаковочные материалы должны иметь маркировку, где первые две буквы обозначают код ISO страны производства упаковки.

6. Контактные адреса для дополнительной информации

Дополнительная информация по данному организму и протоколу:

Julius Kühn-Institut (JKI), Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for National and International Plant Health, Messeweg 11-12, D-38104 Braunschweig, Germany (Thomas Schröder; e-mail: thomas.schroeder@jki.bund.de).

Technical Center, Ningbo Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No. 9 Mayuan Road, Ningbo, 315012 China (Jianfeng Gu; e-mail: jeffgu00@qq.com).

ANSES Plant Health Laboratory, 7 rue Jean Dixmères, 49044 Angers Cedex 01, France (Geraldine Anthoine; e-mail: geraldine.anthoine@anses.fr).

Canadian Forest Service, 506 West Burnside Road, Victoria, BC V8Z 1M5, Canada (Isabel Leal; e-mail: ileal@nrcan.gc.ca).

Canadian Food Inspection Agency, 3851 Fallowfield Road, Ottawa, ON K2H 8P9, Canada (Fencheng Sun; e-mail: sunfc@inspection.gc.ca).

В дополнение к вышеупомянутым экспертам в Таблице 3 перечислены региональные эксперты по нематодам.

Таблица 3. Список региональных и национальных экспертов по *Bursaphelenchus xylophilus* (не является исчерпывающим)

По региону и стране	Контакты эксперта
Африка	Forestry and Agricultural Biotechnology Institute (FABI), University of Pretoria, Pretoria 0002, South Africa (Michael J. Wingfield; e-mail: mike.wingfield@fabi.up.ac.za)
Австралия	CSIRO Ecosystem Sciences-Black Mountain Laboratories, Clunies Ross Street, Black Mountain, ACT 2601, Australia (Mike Hodda; e-mail: Mike.Hodda@csiro.au)
Китай	Department of Forest Protection, Nanjing Forestry University, No. 159 Longpan Road, Nanjing, 210037 China (Boguang Zhao; e-mail: 13505186675@126.com)
Европейский союз	NemaLab-ICAM, Departamento Biologia, Universidade de Évora, 7002-554 Évora, Portugal (Manuel Mota; e-mail: mmota@uevora.pt)
Япония	Forest Pathology Laboratory, Forestry and Forest Products Research Institute, Tsukuba, Ibaraki 305-8687, Japan (Mitsuteru Akiba; e-mail: akiban@ffpri.affrc.go.jp)

Республика Корея (Южная Корея)	Division of Forest Insect Pests and Disease, Korea Forest Research Institute, 207 Cheongnyangni 2-dong, Dongdaemun-gu, Seoul 130-712, Korea (ROK) (Hyrim Han; e-mail: hrhan@forest.go.kr)
---	--

Запрос на пересмотр диагностического протокола может быть направлен национальными организациями по карантину и защите растений (НОКЗР), региональными организациями по карантину и защите растений (РОКЗР) или вспомогательными органами Комиссии по фитосанитарным мерам (КФМ) через Секретариат МККЗР (ippc@fao.org), который, в свою очередь, направит его в Техническую группу экспертов по разработке диагностических протоколов (ТГДП).

7. Выражение признательности

Настоящий диагностический протокол разработали эксперты Томас Шрёдер, Федеральный исследовательский центр культурных растений и Институт национальной и международной охраны здоровья растений, Германия (см. предыдущий раздел), Джеральдина Антуан, Лаборатория по охране здоровья растений, Франция (Geraldine Anthoine, ANSES Plant Health Laboratory, France (см. предыдущий раздел)), Изабель Лиль, Канадская лесная служба, Канада (Isabel Leal, Canadian Forest Service, Canada (см. предыдущий раздел)), Цзянь Фенгу, Технический центр, импорто-экспортная инспекция и карантинное бюро, Китай (Jianfeng Gu, Technical Center, Ningbo Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, China (см. предыдущий раздел)), Феньчен Сан, Канадская инспекция пищевых продуктов, Канада (Fengcheng Sun, Canadian Food Inspection Agency, Canada (см. предыдущий раздел)).

Владимир Гаар, Диагностическая лаборатория Государственного управления фитосанитарного контроля, Чешская Республика, (Vladimir Gaar, Diagnostic Laboratory, State Phytosanitary Administration, Czech Republic), и Дэвид МакНамара, бывший сотрудник ЕОКЗР (David McNamara, formerly EPPO), участвовали на ранних стадиях разработки протокола.

Описание методики ITS-ПДРФ изначально подготовлено Вольфгангом Бургермайстером, Институт вирусологии растений, микробиологии и биологической безопасности, Германия (Wolfgang Burgermeister, Institut für Pflanzenvirologie, Mikrobiologie und Biologische Sicherheit, JKI, Germany). Первоначальное описание методики ПЦР-анализа сателлитной ДНК для определения *B. xylophilus* предоставлено Филиппом Кастаньоне-Серено, Франция (Philippe Castagnone-Sereno, UMR1064 INRA/UNSA/CNRS, Interactions Plantes-Microorganismes et Sante Vegetale, France).

Текст настоящего диагностического протокола частично основан на диагностическом протоколе ЕОКЗР для *B. xylophilus* (ЕОКЗР, 2001, 2013b).

8. Библиография

В настоящем приложении делаются ссылки на международные стандарты по фитосанитарным мерам (МСФМ). МСФМ размещены на Международном фитосанитарном портале (МФП): <https://www.ippc.int/core-activities/standards-setting/ispms>.

Abelleira, A., Picoaga, A., Mansilla, J.P. & Aguin, O. 2011. Detection of *Bursaphelenchus xylophilus*, causal agent of pine wilt disease on *Pinus pinaster* in northwestern Spain. *Plant Disease*, 95(6): 776–776.

Andrássy, I. 1984. Klasse Nematoda (Ordnungen Monhysterida, Desmoscolecida, Araeolaimida, Chromadorida, Rhabditida). In *Bestimmungsbücher zur Bodenfauna Europas*, pp. 24–25. Stuttgart, Germany, Gustav Fischer Verlag. 509 pp.

Baermann, O. 1917. [A simple method of discovering ankylostomo (nematode) larvae in faeces.] *Med. Geneeslc. Lab. Weltevreden*, 1917: 41–47 (на немецком языке).

- Barstead, R.J., Kleiman, L. & Waterston, R.H.** 1991. Cloning, sequencing and mapping of an alpha-actinin gene from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 20: 69-78.
- van Bezooijen, J.** 2006. *Methods and techniques for nematology*. Wageningen, Netherlands, Department of Nematology, Wageningen University. 112 pp. Доступен по ссылке https://www.wageningenur.nl/upload_mm/4/e/3/f9618ac5-ac20-41e6-9cf1-c556b15b9fa7_MethodsandTechniquesforNematology.pdf.
- Bongers, T.** 1989. [*The nematodes of the Netherlands*] (translated from the Dutch by J. van de Haar). Wageningen, Netherlands, Wageningen Agricultural University. 83 pp.
- Braasch, H.** 2001. *Bursaphelenchus* species in conifers in Europe: Distribution and morphological relationships. *EPPO Bulletin*, 31: 127-142.
- Braasch, H., Burgermeister, W. & Gu, J.** 2009. Revised intra-generic grouping of *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 (Nematoda: Aphelenchoididae). *Journal of Nematode Morphology and Systematics*, 12(1): 65-88.
- Braasch, H., Gu, J. & Burgermeister, W.** 2011. *Bursaphelenchus mucronatus kolymensis* comb. n.: New definition of the "European type" of *B. mucronatus*. *Journal of Nematode Morphology and Systematics*, 14(2): 77-90.
- Braasch, H. & Schönfeld, U.** 2015. Improved morphological key to the species of the *xylophilus* group of the genus *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937. *EPPO Bulletin*, 45(1): 73-80.
- Burgermeister, W., Braasch, H., Metge, K., Gu, J., Schröder, T. & Woldt, E.** 2009. ITS-RFLP analysis, an efficient tool for identification of *Bursaphelenchus* species. *Nematology*, 11: 649-668.
- Burgermeister, W., Metge, K., Braasch, H. & Buchbach, E.** 2005. ITS-RFLP patterns for differentiation of 26 *Bursaphelenchus* species (Nematoda: Parasitaphelenchidae) and observations on their distribution. *Russian Journal of Nematology*, 13(1): 29-42.
- Cardoso, J., Fonseca, L. & Abrantes, I.** 2012. Direct detection of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, from pine wood, bark and insect vector. *European Journal of Plant Pathology*, 133: 419-425.
- Castagnone, C., Abad, P. & Castagnone-Sereno, P.** 2005. Satellite DNA-based species-specific identification of single individuals of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae). *European Journal of Plant Pathology*, 112: 191-193.
- Dwinell, L.D.** 1993. Dwinell, L.D. 1993. First report of pinewood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) in Mexico. *Plant Disease*, 77: 846. *Plant Disease*, 77: 846.
- Dwinell, L.D.** 1997. The pinewood nematode: Regulation and mitigation. *Annual Review of Phytopathology*, 35: 153-166.
- Edwards, O.R. & Linit, M.J.** 1992. Transmission of *Bursaphelenchus xylophilus* through oviposition wounds of *Monochamus carolinensis* (Coleoptera: Cerambycidae). *Journal of Nematology*, 24(1): 133-139.
- ЕОКЗР** (Европейская и средиземноморская организация по карантину и защите растений). 2001. *Bursaphelenchus xylophilus*: Diagnostics PM 7/4 (1). *EPPO Bulletin*, 31(1): 61-69.
- ЕОКЗР** (Европейская и средиземноморская организация по карантину и защите растений). 2012. *Bursaphelenchus xylophilus* and its vectors: Procedure for official control. National regulatory control systems PM 9/1 (5). *EPPO Bulletin*, 42(3): 477-485.
- ЕОКЗР** (Европейская и средиземноморская организация по карантину и защите растений). 2013a. *Diagnostic protocols for regulated pests: Pictorial glossary of morphological terms in nematology*. EPPO Technical Document No. 1056 (rev. 4). Paris, EPPO. 21 pp.
- ЕОКЗР** (Европейская и средиземноморская организация по карантину и защите растений). 2013b. *Bursaphelenchus xylophilus*: Diagnostics PM 7/4 (3). *EPPO Bulletin*, 43(1): 105-118.
- EPPO** (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2013c. Nematode extraction. Diagnostics PM 7/119 (1). *EPPO Bulletin*, 43(3): 471-496.

- EPPO** (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2014. *Bursaphelenchus xylophilus*: Addendum to Diagnostics PM 7/4 (3). *EPPO Bulletin*, 44(1): 105.
- EPPO/CABI**. 1996. *Bursaphelenchus xylophilus*: In I.M. Smith, D.G. McNamara & P.R. Scott, eds. Quarantine pests for Europe, 2nd edn. Wallingford, UK, CABI. 1425 pp.
- Evans, H.F., McNamara, D.G., Braasch, H., Chadoeuf, J. & Magnusson, C.** 1996. Pest risk analysis (PRA) for the territories of the European Union (as PRA area) on *Bursaphelenchus xylophilus* and its vectors in the genus *Monochamus*. *EPPO Bulletin*, 26: 199-249.
- Ferris, V.R., Ferris, J.M. & Faghihi, J.** 1993. Variation in spacer ribosomal DNA in some cyst-forming species of plant parasitic nematodes. *Fundamental and Applied Nematology*, 16: 177-184.
- Fonseca, L., Cardoso, J.M.S., Lopes, A., Pestana, M., Abreu, F., Nunes, N., Mota, M. & Abrantes, I.** 2012. The pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in Madeira Island. *Helminthologia*, 49(2): 96-103.
- François, C., Castagnone, C., Boonham, N., Tomlinson, J., Lawson, R., Hockland, S., Quill, J., Vieira, P., Mota, M. & Castagnone-Sereno, P.** 2007. Satellite DNA as a target for TaqMan real-time PCR detection of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Molecular Plant Pathology*, 8: 803-809.
- Futai, K.** 2013. Pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Annual Review of Phytopathology*, 51: 61-83.
- Goodey, J.B.** 1963. *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes*. Technical Bulletin No. 2 of the Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. London, HMSO. 72 pp.
- Gu, J.**, ed. 2014. [*Identification of Bursaphelenchus xylophilus and its closely related species.*] Xiamen, China, Xiamen University Press (на китайском).
- Gu, J., Wang, J., Braasch, H., Burgermeister, W. & Schröder, T.** 2011. Morphological and molecular characterisation of mucronate isolates (M form) of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae). *Russian Journal of Nematology*, 19(2): 103-120.
- Gu, J., Zhang, J., Braasch, H. & Burgermeister, W.** 2005. *Bursaphelenchus singaporensis* sp. n. (Nematoda: Parasitaphelenchidae) in packaging wood from Singapore: A new species of the *B. xylophilus* group. *Zootaxa*, 988: 1-12.
- Hasegawa, K. & Miwa, J.** 2008. Embryology and cytology of *Bursaphelenchus xylophilus*. B B.G. Zhao, K. Futai, J.R. Sutherland & Y. Takeuchi, eds. *Pine wilt disease*, pp. 81-104. Tokyo, Springer. 459 pp.
- Hopf, A. & Schroeder, T.** 2013. Non vector spread of *Bursaphelenchus xylophilus* via wood chips. In T. Schroeder, ed. Pine Wilt Disease Conference, 15-18 October 2013, Braunschweig, Germany. *Berichte aus dem Julius Kühn Institut*, 169: 46-47.
- Hu, Y.Q., Kong, X.C., Wang, X.R., Zhong, T.K., Zhu, X.W., Mota, M.M., Ren, L.L., Liu, S. & Ma, C.** 2011. Direct PCR-based method for detecting *Bursaphelenchus xylophilus*, the pine wood nematode in wood tissue of *Pinus massoniana*. *Forest Pathology*, 41: 165-168.
- Hunt, D.J.** 2008. A checklist of the Aphelenchoidea (Nematoda: Tylenchina). *Journal of Nematode Morphology and Systematics*, 10(2): 99-135.
- Ibeas, F., Gallego, D., Diez, J.J. & Pajares, J.A.** 2007. An operative kairomonal lure for managing pine sawyer beetle *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera: Cerymbycidae). *Journal of Applied Entomology*, 131 (1): 13-20.
- Inácio, M.L., Nóbrega, F., Vieira, P., Bonifácio, L., Naves, P., Sousa, E. & Mota, M.** 2014. First detection of *Bursaphelenchus xylophilus* associated with *Pinus nigra* in Portugal and in Europe. *Forest Pathology*, 45(3): 235-238.
- Kanetani, S., Kikuchi, T., Akiba, M., Nakamura, K., Ikegame, H. & Tetsuka, K.** 2011. Detection of *Bursaphelenchus xylophilus* from old discs of dead *Pinus armandii* var *amamiana* trees using a new detection kit. *Forest Pathology*, 41: 387-391.

- Kikuchi, T., Aikawa, T., Oeda, Y., Karim, N. & Kanzaki, N.** 2009. A rapid and precise diagnostic method for detecting the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* by loop-mediated isothermal amplification. *Phytopathology*, 99: 1365-1369.
- Kishi, Y.** 1995. *The pine wood nematode and the Japanese pine sawyer*. Forest Pests in Japan No. 1. Tokyo, Thomas Company Limited. 302 pp.
- Кондо, Е. & Ishibashi, H.** 1978. Ecological significance of dormancy in plant parasitic nematodes. 7. Ultrastructural differences between propagative and dispersal forms in pine wood nematode, *Bursaphelenchus lignicolus*, with reference to survival. *Applied Entomology and Zoology*, 13: 1-11.
- Leal, I., Foord, B., Allen, E., Campion, C., Rott, M. & Green, M.** 2013. Development of two reverse transcription-PCR methods to detect living pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in wood. *Forest Pathology*, 43: 104-114.
- Leal, I., Green, M., Allen, E., Humble, L. & Rott, M.** 2007. Application of a real-time PCR method for the detection of pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in wood samples from lodgepole pine. *Nematology*, 9: 351-362.
- & Linit, M.J.** 1990. Transmission of pinewood nematode through feeding wounds of *Monochamus carolinensis* (Coleoptera: Cerambycidae). *Journal of Nematology*, 22(2): 231-236.
- Luzzi, M.A., Wilkinson, R.C. & Tarjan, A.C.** 1984. Transmission of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*, to slash pine trees and log bolts by a cerambycid beetle, *Monochamus tilliator*, in Florida. *Journal of Nematology*, 16(1): 37-40.
- Mamiya, Y. & Kiyohara, T.** 1972. Description of *Bursaphelenchus lignicolus* n.sp. from pine wood and histopathology of nematode-infested trees. *Nematologica*, 18: 120-124.
- Matsunaga, K. & Togashi, K.** 2004. Among-tree difference in the inhibition of systemic dispersal of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) by *Pinus densiflora*. *Applied Entomology and Zoology*, 39(2): 271-277.
- Moens, M.** 2000. The pinewood nematode: Development of a sampling, extraction and identification method. Final report FAIR1-CT95-0034 EU research project. 102 pp.
- Mota, M., Braasch, H., Bravo, M.A., Penas, A.C., Burgermeister, W., Metge, K. & Sousa, E.** 1999. First record of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. *Nematology*, 1: 727-734.
- Mota, M. & Vieira, P., eds.** 2004. The pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. Proceedings of an international workshop, University of Évora, Portugal, 20–22 August 2001. In *Nematological monographs and perspectives*, Vol. 1. Leiden, Netherlands, Brill. 291 pp.
- Mota, M. & Vieira, P., eds.** 2008. *Pine wilt disease: A worldwide threat to forest ecosystems*. Berlin, Springer Verlag. 405 pp.
- Nickle, W.R.** 1970. A Taxonomic review of the genera of the Aphelenchoidae (Fuchs, 1937) Thorne, 1949 (Nematoda: Tylenchida). *Journal of Nematology*, 2(4): 375-392.
- Nickle, W.R., Golden, A.M., Mamiya, Y. & Wergin, W.P.** 1981. On the taxonomy and morphology of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Buhner, 1934) Nickle (1970). *Journal of Nematology*, 13: 385-392.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. & Hase, T.** 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28: e63.
- Pajares, J.A., Ibeas, F., Diez, J.J. & Gallego, D.** 2004. Attractive responses by *Monochamus galloprovincialis* (Col., Cerambycidae) to host and bark beetle semiochemicals. *Journal of Applied Entomology*, 128(9/10): 633-638.
- Penas, A.C., Bravo, M.A., Valads, V. & Mota, M.** 2008. Detailed morphometric studies of *Bursaphelenchus xylophilus* and characterisation of other *Bursaphelenchus* species (Nematoda: Parasitaphelenchidae) associated with *Pinus pinaster* in Portugal. *Journal of Nematode Morphology and Systematics*, 10(2): 137-163.

- Penas, A.C., Dias, L.S. & Mota, M.M.** 2002. Precision and selection of extraction methods of aphelenchoid nematodes from maritime pine wood, *Pinus pinaster* L. *Journal of Nematology*, 24(1): 62-65.
- Ryss, A.Y.** 2003. Express technique to prepare permanent collection slides of nematodes. *Zoosystematica Rossica*, 11: с.257-260.
- Ryss, A., Viera, P., Mota, M. & Kulnich, O.** 2005. A synopsis of the genus *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 (Aphelenchida: Parasitaphelenchidae) with keys to species. *Nematology*, 7(3): 393-458.
- Sanchez-Husillos, E., Etxebeste, I. & Pajares, J.** 2015. Effectiveness of mass trapping in the reduction of *Monochamus galloprovincialis* Olivier (Col.: Cerambycidae) populations. *Journal of Applied Entomology*, doi:10.1111/jen.12219.
- Schröder, T., McNamara, D.G. & Gaar, V.** 2009. Guidance on sampling to detect pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* in trees, wood and insects. *EPPO Bulletin*, 39: 179-188.
- Seinhorst, J.W.** 1959. A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. *Nematologica*, 4: 67-69.
- Sousa, E., Bravo, M.A., Pires, J., Naves, P., Penas, A.C., Bonifácio, L. & Mota, M.M.** 2001. *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) associated with *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera; Cerambycidae) in Portugal. *Nematology*, 3(1): 89-91.
- Sousa, E., Naves, P., Bonifácio, L., Henriques, J., Inácio, L. & Evans, H.** 2011. Assessing risks of pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* transfer between wood packaging by simulating assembled pallets in service. *EPPO Bulletin*, 41: 423-431.
- Takeuchi, Y., Kanzaki, N. & Futai, K.** 2005. A nested PCR-based method for detecting the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, from pine wood. *Nematology*, 7: 775-782.
- Tarès, S., Lemontey, J.M., de Guiran, G. & Abad, P.** 1993. Cloning and characterization of a highly conserved satellite DNA sequence specific for the phytoparasitic nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *Gene*, 129: 269-273.
- Tomalak, M. & Filipiak, A.** 2011. *Bursaphelenchus tryphloeus* sp. n. (Nematoda: Parasitaphelenchinae): An associate of the bark beetle, *Trypophloeus asperatus* (Gyll.) (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae), in aspen, *Populus tremula* L. *Nematology*, 13: 619-636.
- Tomalak, M., Worall, J. & Filipiak, A.** 2013. *Bursaphelenchus masseyi* sp. n. (Nematoda: Parasitaphelenchinae): A nematode associate of the bark beetle, *Trypophloeus populi* Hopkins (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), in aspen, *Populus tremuloides* Michx. affected by sudden aspen decline in Colorado. *Nematology*, 15: 907-921.
- Vieira, P.R., Mota, M. & Eisenback, J.D.** 2003. Pinewood Nematode Taxonomic Database. CD-ROM. Blacksburg, VA, Mactode Publications.
- Vrain, T.C.** 1993. Restriction fragment length polymorphism separates species of the *Xiphinema americanum* group. *Journal of Nematology*, 25: 361-364.
- Williams, B.D., Schrank, B., Huynh, C., Shownkeen, R. & Waterston, R.H.** 1992. A genetic mapping system in *Caenorhabditis elegans* based on polymorphic sequence-tagged sites. *Genetics*, 131: 609-624.
- Wingfield, M.J.** 1987. A comparison of the mycophagous and the phytophagous phases of the pine wood nematode. In M.J. Wingfield, ed. *Pathogenicity of the pine wood nematode*. Symposium Series, pp. 81-90. St Paul, MN, APS Press. 122 pp.
- Wingfield, M.J., Blanchette, R.A., Nicholls, T.H. & Robbins, K.** 1982. The pine wood nematode: A comparison of the situation in the United States and Japan. *Canadian Journal of Forest Research*, 12: 71-75.
- Wu, H.Y., Tan, Q.Q. & Jiang, S.X.** 2013. First report of pine wilt disease caused by *Bursaphelenchus xylophilus* on *Pinus thunbergii* in the inland city of Zibo, Shandong, China. *Plant Disease*, 97(8): 1126.
- Ye, W., Giblin-Davis, R.M., Braasch, H., Morris, K. & Thomas, W.K.** 2007. Phylogenetic relationships among *Bursaphelenchus* species (Nematoda: Parasitaphelenchidae) inferred from

nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43: 1185-1197.

Zamora, P., Rodriguez, V., Renedo, F., Sanz, A.V., Domínguez, J.C., Pérez-Escolar, G., Miranda, J., Álvarez, B., González-Casas, A., Mayor, E., Duenas, M., Miravalles, A., Naves, A., Robertson, L., Gutiérrez Abascal, C.J. & Martín, A.B. 2015. First report of *Bursaphelenchus xylophilus* causing pine wilt disease on *pinus radiata* in Spain. *Disease Notes*, <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-03-15-0252-PDN>.

Zhao, B.G., Futai, K., Sutherland, J.R. & Takeuchi, Y. 2008. *Pine wilt disease*: Berlin, Springer. 459 pp.

9. Рисунки

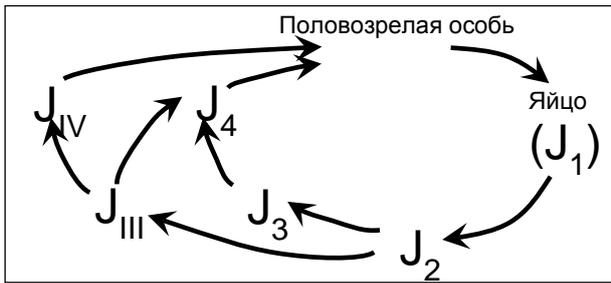


Рис. 1. Жизненный цикл *Bursaphelenchus xylophilus* от яйца до половозрелой нематоды. JX, личинки X-возраста.

Источник: Из работы Wingfield et al. (1982).



Рис 2. Развитие симптомов у сосны (*Pinus pinaster*), зараженной *Bursaphelenchus xylophilus*: от здорового дерева до мертвого.

Фото: T. Schröder, Julius Kühn-Institut, Germany.



Рис. 3. Симптомы болезни увядания хвойных пород, вызванной *Bursaphelenchus xylophilus*, на примере *Pinus pinaster*.

Фото: T. Schröder, Julius Kühn-Institut, Germany.

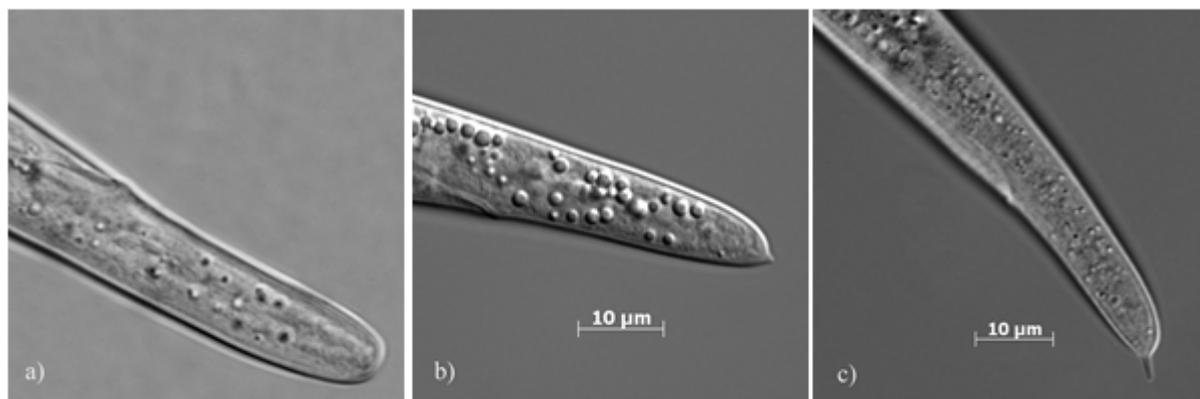


Рис. 4. Разновидности хвостов у самок *Bursaphelenchus xylophilus*: а) круглый (увеличение $\times 1000$); б) с небольшим выступом; и в) с мукро.

Фото: а) T. Schröder, Julius Kühn-Institut, Germany и (b, c) J. Gu, Ningbo Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, China.

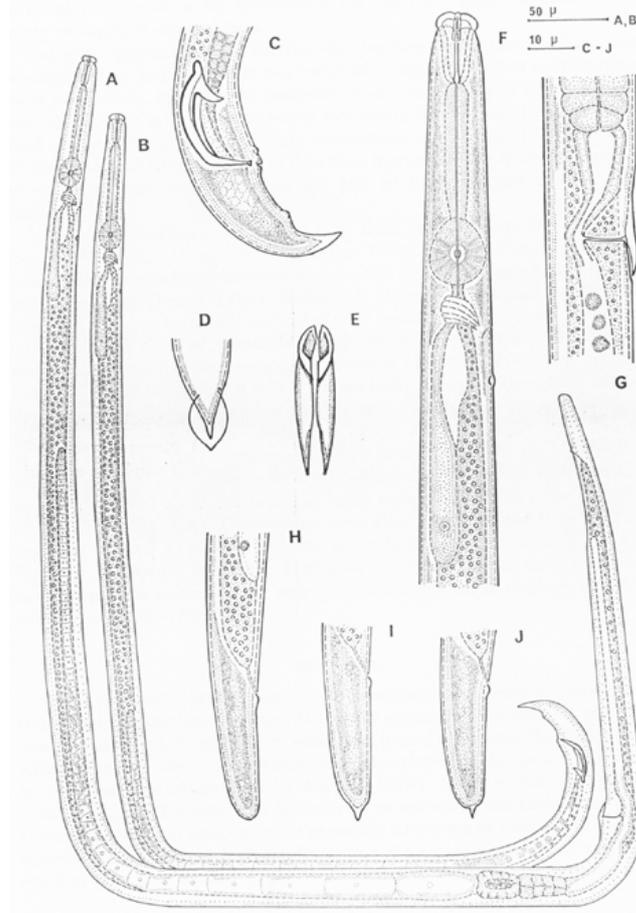


Рис. 5. *Bursaphelenchus xylophilus*: (A) самец; (B) самка; (C) хвост самца; (D) хвост самца с вентральной стороны, кончик с бурсой; (E) спикулы с вентральной стороны; (F) самка, передняя часть; (G) вульва самки; и (H), (I) и (J) хвост самки.

Источник: Mamiya and Kiyohara (1972).

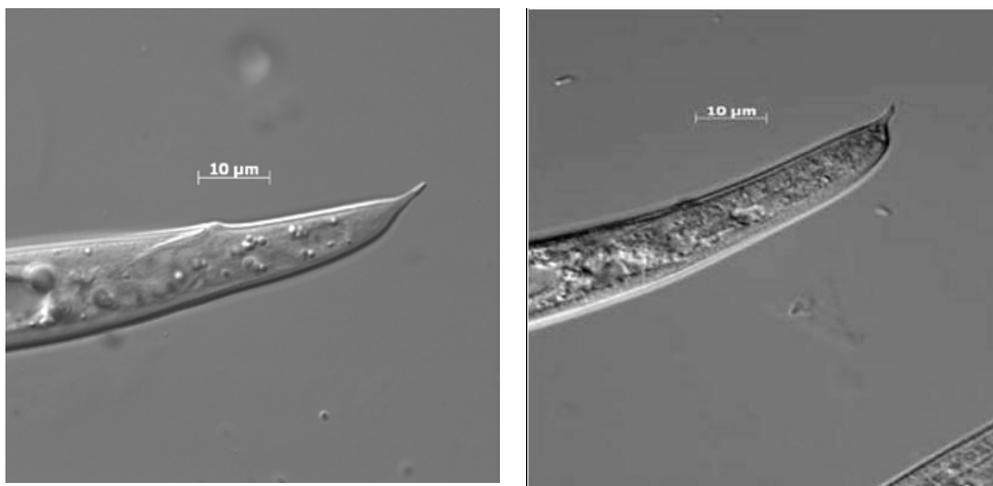


Рис. 6. Хвост самки *Bursaphelenchus mucronatus mucronatus* (слева) и *B. mucronatus kolymensis* (справа). Фото: J. Gu, Ningbo Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, China.

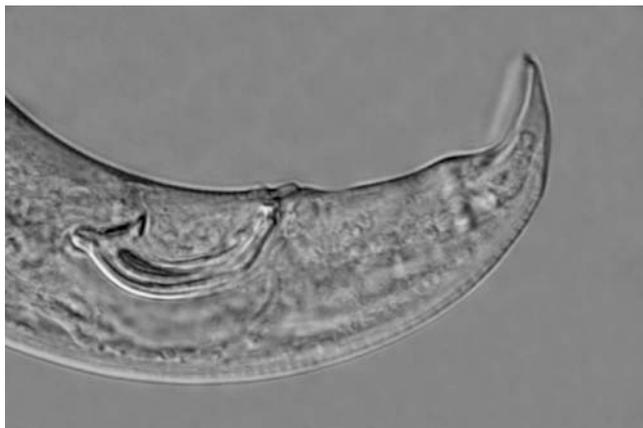


Рис. 7. Хвост самца *Bursaphelenchus xylophilus* со спикулами (увеличение $\times 1\,000$).
Фото: T. Schröder, Julius Kühn-Institut, Germany.

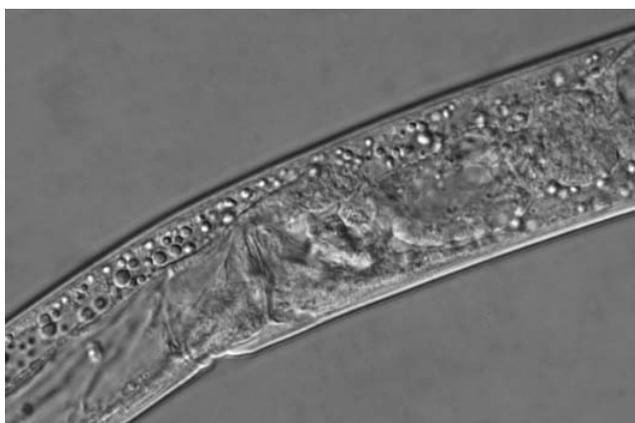


Рис. 8. Самка *Bursaphelenchus xylophilus* с вульварным щитком (увеличение $\times 640$).
Фото: T. Schröder, Julius Kühn-Institut, Germany.

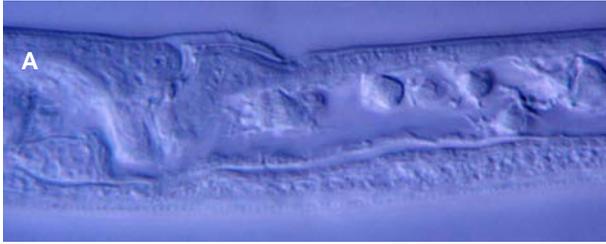


Рис. 9. Вид группы *xylophilus*, не принадлежащий к виду *Bursaphelenchus xylophilus*: (A) вульварный щиток самки закруглен и заканчивается значительным углублением и (B) Хвост самки *B. fraudulentus* с небольшим выступом (слева) и без выступа (справа) (увеличение $\times 1\ 000$).
Фото: M. Tomalak, Institute of Plant Protection, National Research Institute, Poland.

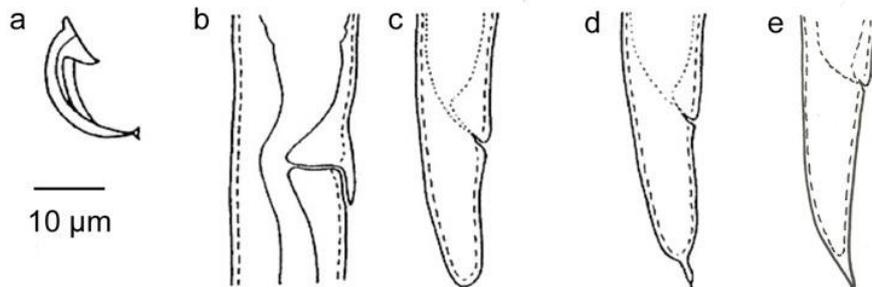


Рис. 10. Диагностические признаки *Bursaphelenchus xylophilus*, *B. mucronatus mucronatus* и *B. mucronatus kolytensis*: (a) спикулы всех трех видов; (b) вульварные щитки всех трех видов; (c) терминус хвоста самки *B. xylophilus*, скругленный; (d) терминус хвоста самки *B. mucronatus kolytensis*; и (e) терминус хвоста самки *B. mucronatus mucronatus*.

Источник: Адаптировано из EPPO/CABI (1996).

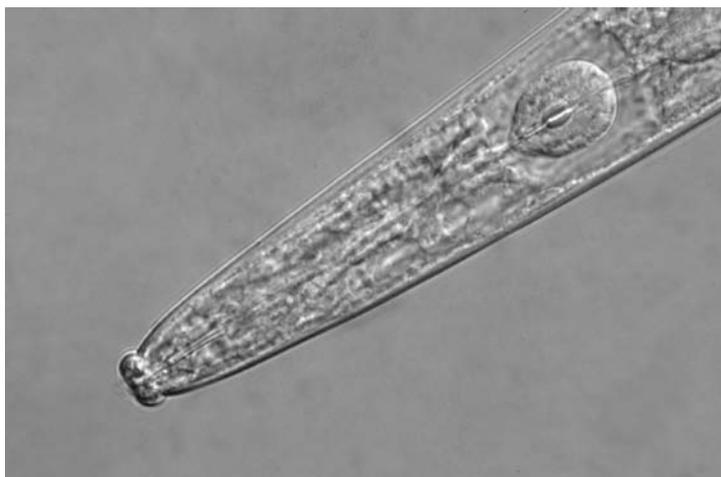


Рис. 11. Верхний отдел *Bursaphelenchus xylophilus* со стилетом и метакорпусом (увеличение $\times 640$).
Фото: T. Schröder, Julius Kühn-Institut, Germany.

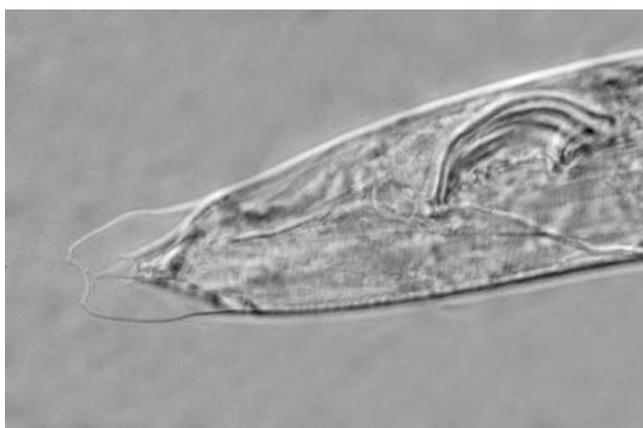


Рис. 12. Хвост самца *Bursaphelenchus xylophilus* с бурсой в дорсально-вентральном положении (увеличение $\times 1\ 000$).
Фото: T. Schröder, Julius Kühn-Institut, Germany.

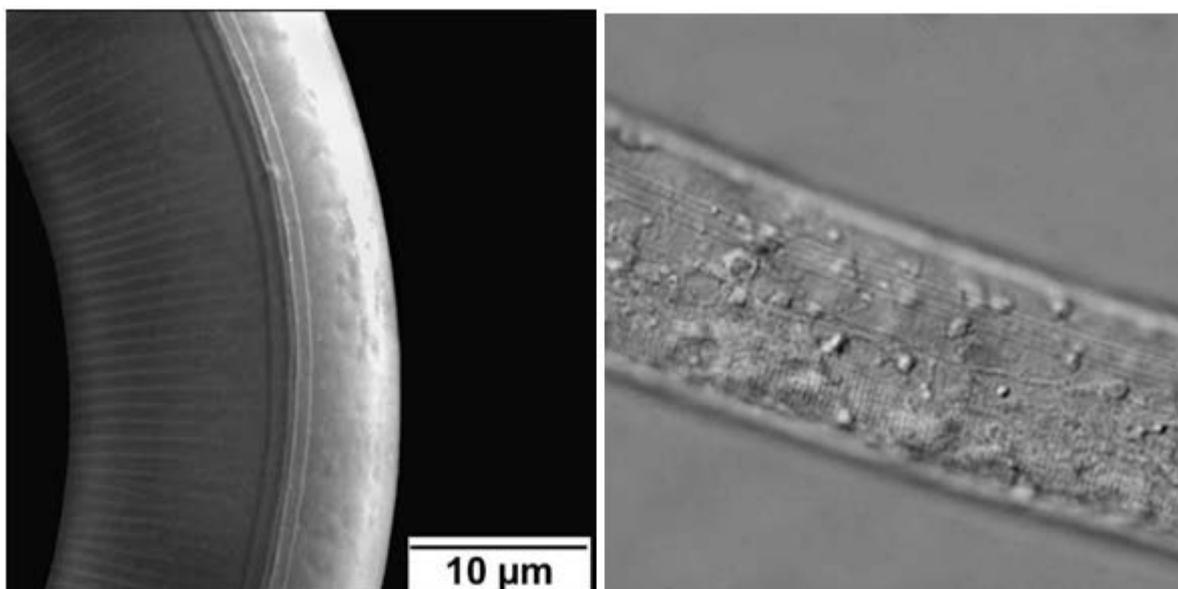


Рис. 13. Боковое поле *Bursaphelenchus xylophilus* под сканирующим электронным микроскопом (слева) и под оптическим микроскопом (справа (увеличение $\times 1\,600$)).
 Фото: (слева) M. Brandstetter, Austrian Research Centre for Forests, Austria, и (справа) T. Schröder, Julius Kühn-Institut, Germany.

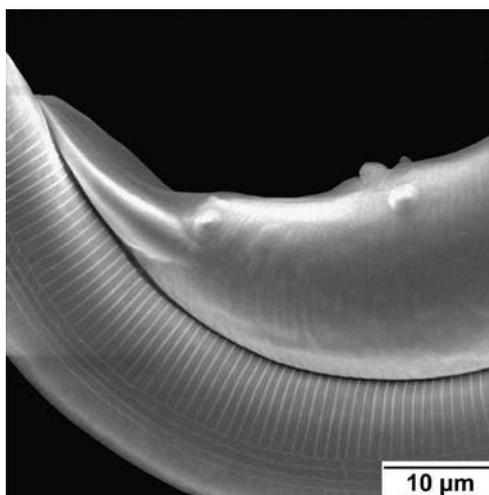


Рис. 14. Кaudальные папиллы *Bursaphelenchus xylophilus*, снимок сканирующего электронного микроскопа.
 Фото: M. Brandstetter, Austrian Research Centre for Forests, Austria.

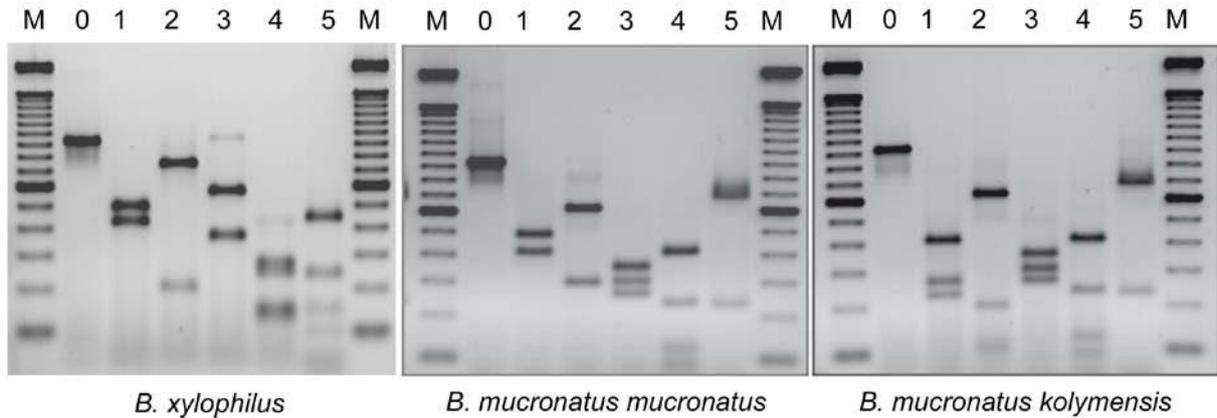


Рис. 15. Матрицы полиморфизма рестрикционных фрагментов - внутренних транскрибированных спейсеров *Bursaphelenchus xylophilus* (слева), *B. mucronatus mucronatus* (посередине) и *B. mucronatus kolymensis* (справа). Рестрикционные фрагменты были получены путем поглощения амплифицированного фрагмента (г)ДНК (0) с *RSAI* (1), *XaeIII* (2), *MspI* (3), *HinfI* (4) и *AluI* (5). М, маркер ДНК маркера (сегмент 100 базовых пар).
 Фото: W. Burgermeister, Julius Kühn-Institut, Germany.

История публикации

Не является официальной частью стандарта

2004-11 КС добавил тему: *Bursaphelenchus xylophilus* (2004-016).

2006-04 КФМ-1 (2006) добавила тему в Программу работы: Нематоды (2006-008),

2007-09 ТГДП обсудила проект.

2008-06 ТГДП обсудила проект с ведущим автором.

2013-09 Сформирована новая группа подготовки ДП.

2014-03 Экспертные консультации.

2014-10 КС одобрил проект для проведения консультации с членами (2014_eSC_Nov_11).

2015-02 Консультация с членами.

2015-10 ТГДП электронным решением одобрила текст для передачи КС на утверждение (eTPDP_Oct_02).

2015-11 КС утвердил период уведомления для ДП (2015_eSC_Nov_08).

2016-01 КС утвердил ДП от имени КФМ (формальных возражений не высказывалось).

МСФМ 27. Приложение 10. *Bursaphelenchus xylophilus* (2016); Рим, МККЗР, ФАО.

История публикации последний раз обновлена: 2016-04