



Organización de las Naciones
Unidas para la Alimentación
y la Agricultura



Convención Internacional de Protección Fitosanitaria
Proteger de las plagas los recursos vegetales del mundo

PD 10: *Bursaphelenchus xylophilus*

Esta página se ha dejado en blanco intencionalmente

NIMF 27

Protocolos de diagnóstico para plagas reglamentadas

PD 10: *Bursaphelenchus xylophilus*

Adoptado en 2016; publicado en 2018

ÍNDICE

1.	Información sobre la plaga	3
2.	Información taxonómica	5
3.	Detección	5
3.1	Detección en árboles	6
3.2	Detección mediante el uso de trampas para insectos y troncos trampa, y en muestras de aserraderos y de almacenes de madera	7
3.3	Detección directa en madera, productos derivados de la madera y embalajes de madera maciza	7
3.4	Extracción de nematodos de muestras de madera	8
3.5	Extracción de nematodos de los insectos vectores	9
4.	Identificación	10
4.1	Identificación morfológica	11
4.1.1	Preparación de los especímenes	11
4.1.2	Clave hasta el nivel de la especie	12
4.1.3	Comparación de <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> con especies similares	18
4.2	Identificación molecular	20
4.2.1	PCR-RFLP de las regiones ITS	21
4.2.2	PCR convencional	23
4.2.3	PCR en tiempo real	25
4.2.4	Pruebas moleculares basadas en el ARN para la detección de <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> vivos	28
4.2.5	LAMP	30
4.2.6	Controles para las pruebas moleculares	32
4.2.7	Interpretación de los resultados de la PCR	33
4.2.8	Secuenciación	33
5.	Registros	34
6.	Puntos de contacto para información adicional	35
7.	Agradecimientos	36
8.	Referencias	37

9. Figuras	44
------------------	----

1. Información sobre la plaga

Bursaphelenchus xylophilus (Steiner y Buhrer, 1934) Nickle, 1970 -el nematodo de la madera del pino- es el agente causal de la enfermedad del marchitamiento de los pinos. Se cree que es originario de América del Norte, con amplia distribución en el Canadá y los Estados Unidos (Ryss *et al.*, 2005) y, al parecer, limitada en México (Dwinell, 1993). Las especies de pino norteamericanas son resistentes, o al menos tolerantes, a *B. xylophilus*, pero las especies exóticas plantadas en América del Norte, especialmente en las zonas más cálidas del sur de los Estados Unidos, mueren cuando son atacadas por el nematodo.

B. xylophilus fue llevado a Japón a comienzos del siglo XX, presumiblemente en madera de construcción exportada de América del Norte, y se convirtió en una de las plagas forestales más perjudiciales del país, donde aún ocasiona grandes pérdidas de pinos (*Pinus densiflora*, *P. thunbergii* y *P. luchuensis*) en la actualidad. También fue introducido en China (incluido Taiwán) y en Corea, donde se detectó en la segunda mitad de la década de 1980. En 1999, se detectó por primera vez en Europa (Portugal) en *P. pinaster*, especie que el nematodo mata en pocos meses (Mota *et al.*, 1999; Fonseca *et al.*, 2012). *B. xylophilus* también se ha detectado en *P. nigra* y *P. radiata* en Portugal y en España, respectivamente (Inácio *et al.*, 2014; Zamora *et al.*, 2015); en España se detectó por primera vez en 2008 (Abelleira *et al.*, 2011).

B. xylophilus es transmitido de un árbol a otro por escarabajos de la madera del género *Monochamus* (Coleoptera: Cerambycidae) (Linit, 1990; Evans *et al.*, 1996). Los nematodos penetran en el cuerpo de los insectos poco después de que emergen de la pupación y justo antes de que hagan un orificio y abandonen el árbol hospedante (Wingfield, 1987). Los escarabajos vuelan a la copa de árboles sanos y se alimentan de las hojas y brotes jóvenes (alimentación de maduración). A continuación se aparean y las hembras buscan, dependiendo de la especie de *Monochamus*, un árbol debilitado o recién muerto, o bien troncos o ramas más grandes (incluidos los desperdicios de corta), donde depositan los huevos a través de la corteza. Las larvas de escarabajo que nacen de los huevos se alimentan, durante varios meses, del tejido del cámbium, justo por debajo de la corteza. Cuando alcanzan la madurez, perforan la madera hacia capas más profundas donde pupan y completan su ciclo biológico. *B. xylophilus* aprovecha este ciclo para su transporte a nuevos árboles hospedantes (Wingfield, 1987). Su introducción en el nuevo árbol podrá tener lugar durante la oviposición del escarabajo (este parece ser el único medio de transmisión de varias especies de *Bursaphelenchus* que colonizan árboles muertos) (Edwards y Linit, 1992). Sin embargo, *B. xylophilus* parece ser excepcional entre estas especies, ya que su transmisión a un nuevo árbol también puede ocurrir durante la alimentación de maduración de los escarabajos, y el marchitamiento de los pinos puede aparecer como consecuencia de la transmisión a través de los brotes jóvenes (Wingfield, 1987).

Cuando la transmisión de *B. xylophilus* tiene lugar durante la oviposición, los nematodos permanecen relativamente cerca del lugar de introducción. Pero cuando la transmisión se produce a través de brotes jóvenes o cuando el árbol sucumbe a la enfermedad del marchitamiento de los pinos, los nematodos se distribuyen por todo el árbol, destruyendo tejidos de la madera tales como las células epiteliales, las células del parénquima de los canales resiníferos axiales y radiales, el cámbium y el floema. *B. xylophilus* también puede estar presente en las raíces, incluso cuando la parte aérea del árbol ya está muerta o seca, o ha sido cortada. Que un árbol contraiga o no el marchitamiento de los pinos depende de la especie de que se trate (en general, solo afecta a *Pinus* spp. que no son oriundas de América), de su estado sanitario y de las condiciones climáticas (en particular, de la temperatura y de la disponibilidad de agua). Estos factores también influyen en la distribución de los nematodos dentro del árbol, que puede ser localizada o irregular, lo cual debe tenerse en cuenta en las estrategias de muestreo (Schröder *et al.*, 2009).

B. xylophilus también puede encontrarse en árboles muertos de los géneros *Abies*, *Chamaecyparis*, *Cedrus*, *Larix*, *Picea* y *Pseudotsuga* y en otras coníferas (excepto *Thuja* spp.), pero no se conocen casos de marchitamiento de los pinos en ninguno de estos géneros; no obstante, las pruebas de patogenicidad en plántulas muestran reacciones notables, incluso la muerte (Evans *et al.*, 1996).

B. xylophilus tiene como vector casi exclusivo a especies de *Monochamus*, que varían de una región geográfica a otra; por ejemplo, *M. alternatus* en China y el Japón, *M. saltuarius* en el Japón, *M. carolinensis* en América del Norte y *M. galloprovincialis* en Portugal. Se ha detectado ocasionalmente la presencia de larvas dauer del nematodo en el cuerpo de otros escarabajos de la familia Cerambycidae u otros Coleoptera, pero no hay evidencias de que desempeñen la función de vectores en la diseminación del nematodo (Evans *et al.*, 1996).

Se sabe que la principal ruta de dispersión de *B. xylophilus* a mayores distancias es la actividad humana, y en varias ocasiones se han interceptado tanto el nematodo como sus vectores en el comercio internacional de madera, de productos derivados de la madera y, especialmente, de embalajes de madera maciza de coníferas. Hay, por lo tanto, riesgo alto de dispersión internacional.

Aunque el principal riesgo de dispersión de *B. xylophilus* es el asociado a los escarabajos vectores, pueden producirse movimientos de *B. xylophilus* de madera infestada a madera o árboles no infestados en determinadas circunstancias: contacto directo entre madera donante y receptora, alto contenido de humedad de la madera receptora o heridas en los árboles receptores (Sousa *et al.*, 2011; Hopf y Schroeder, 2013).

En las siguientes monografías se describe de forma más detallada la biología de *B. xylophilus*, sus vectores, la enfermedad del marchitamiento de los pinos, su distribución geográfica, sus repercusiones comerciales y económicas, y las estrategias de manejo: Kishi (1995); Mota y Vieira (2004); Mota y Vieira (2008); y Zhao *et al.* (2008).

2. Información taxonómica

Nombre:	<i>Bursaphelenchus xylophilus</i> (Steiner y Buhner, 1934) Nickle, 1970
Sinónimos:	<i>Aphelenchoides xylophilus</i> Steiner y Buhner, 1934 <i>Paraphelenchoides xylophilus</i> (Steiner y Buhner, 1934) Haque, 1967 <i>Bursaphelenchus lignicolus</i> Mamiya y Kiyohara, 1972
Posición taxonómica:	Nematoda, Rhabditida, Tylenchina, Aphelenchoidea, Aphelenchoididae, Parasitaphelenchinae, <i>Bursaphelenchus</i>
Nombres comunes:	nematodo de la madera del pino, nematodo del pino

3. Detección

B. xylophilus presenta seis estados biológicos: el huevo, cuatro estadios juveniles y el adulto. El primer estadio juvenil (J1) muda al segundo estadio juvenil (J2) en el huevo. Las larvas J2 nacen del huevo y pasan por dos estadios juveniles más (J3 y J4) antes de alcanzar el estado adulto. Aparecen diferentes tipos de estadios juveniles en función de las condiciones. En condiciones favorables, a 25 °C, *B. xylophilus* se desarrolla en cuatro días desde el huevo hasta el estado adulto, pasando por cuatro estadios juveniles propagativos (J1 a J4) (Hasegawa y Miwa, 2008) (Figura 1).

En condiciones desfavorables, en lugar del estadio J3 se desarrolla el estadio de dispersión J_{III}. Este estadio probablemente no se alimenta: tiene lípidos acumulados en las células del intestino (Kondo y Ishibashi, 1978) y puede sobrevivir en condiciones desfavorables como la sequía, la temperatura baja o la falta de alimento. Normalmente, este estadio muda al estadio de dispersión J_{IV} (larva dauer), que los escarabajos vectores transmiten a nuevos árboles. No obstante, si las condiciones se vuelven adecuadas para el desarrollo de los nematodos, por ejemplo, si se pone el estadio J_{III} en placas de cultivo con hongos, los nematodos se desarrollan al estadio juvenil propagativo J4 (Wingfield *et al.*, 1982).

Se pueden encontrar *B. xylophilus* vivos en diversos tipos de madera de las especies hospedantes, en particular en árboles en pie o caídos, madera en rollo, madera aserrada y productos derivados de la madera como embalajes de madera de coníferas, así como en serrín, astillas y partículas de madera, residuos de madera, y mobiliario y artesanías no tratados. En las siguientes secciones se proporciona información específica relativa a la detección de *B. xylophilus* en árboles, en madera y productos

derivados de la madera y en sus escarabajos vectores. Aunque un muestreo correcto es fundamental para obtener un material que tenga la máxima probabilidad de estar infestado con *B. xylophilus*, en el presente protocolo no se incluye orientación sobre el muestreo. Se han publicado en Schröder *et al.* (2009) y EPPO (2012) orientaciones generales sobre muestreo en las que se hace referencia a las especies europeas de *Monochamus* como vectores.

3.1 Detección en árboles

Cuando no se sepa si en un área hay presencia de *B. xylophilus*, el muestreo se debería centrar en los árboles cercanos a lugares de alto riesgo; por ejemplo, puertos donde se manipulen importaciones de países con infestaciones por *B. xylophilus* conocidas, aeropuertos, aserraderos, instalaciones de procesamiento de madera, lugares donde se almacene madera y áreas en las que se hayan producido incendios forestales (que atraen a los escarabajos *Monochamus*).

Para tener la mayor posibilidad de detectar a *B. xylophilus* en un área, se recomienda concentrar el muestreo en pinos moribundos o que hayan muerto recientemente (figuras 2 y 3), los cuales podrán estar en pie o caídos. También se podrán utilizar como material de muestreo los árboles y los residuos de una temporada de corta reciente (p. ej., los presentes en lugares en los que se hayan realizado talas uno o dos años antes) que hayan sido colonizados después de la corta por escarabajos *Monochamus*. Deberían buscarse los siguientes síntomas: cambio de color de las acículas (p. ej., amarilleo), marchitez, indicios de ataque de insectos (p. ej., presencia de virutas de madera en el suelo o sobresaliendo de grietas de la corteza, de larvas de cabeza plana de *Monochamus* debajo de la corteza, de galerías superficiales debajo de la corteza con orificios de entrada ovales orientados en el sentido longitudinal del tallo, de orificios redondos de salida de los adultos), proliferación de hongos del azulado de la madera y ausencia de flujo de oleoresina de las heridas. El flujo de oleoresina se debería comprobar mientras los árboles aún están verdes, retirando parte de la corteza de la capa del cámbium. En los árboles sanos la superficie de la madera se cubrirá de resina en una hora, mientras que en los árboles infestados no habrá flujo de resina o será escaso. Sin embargo, estos síntomas varían entre distintas especies de pino y no son específicos para *B. xylophilus*, ya que podrán estar causados por otros patógenos o por factores físicos. Actualmente no hay ningún método que permita distinguir visualmente entre los árboles moribundos a causa del marchitamiento de los pinos y los que mueren por otras causas. Se deberían muestrear preferentemente árboles con indicios de ataque por *Monochamus*, ya sea en la fase de alimentación de maduración o en la de reproducción, pero se debería al menos tener constancia de la presencia de especies de *Monochamus* en el área donde se van a tomar las muestras.

La distribución de los nematodos en los árboles puede ser localizada, sobre todo al poco tiempo de haber sido introducidos por la oviposición o por la alimentación de maduración del escarabajo vector, pero cuando el árbol contrae la enfermedad del marchitamiento de los pinos, los nematodos pueden

dispersarse rápidamente y generar poblaciones muy numerosas en todas las partes del árbol excepto en las acículas, las piñas y las semillas. *B. xylophilus* invade también el sistema radicular y puede sobrevivir en él durante cierto tiempo cuando el árbol ya está muerto y seco o ha sido talado. Sin embargo, en los árboles que no son susceptibles, en condiciones climáticas desfavorables o en determinados estados fisiológicos del árbol, el ataque por *B. xylophilus* puede permanecer confinado a partes determinadas del individuo; por ejemplo, podrá existir infestación en la copa o en partes de la copa sin dispersión del nematodo a otras partes del árbol.

3.2 Detección mediante el uso de trampas para insectos y troncos trampa, y en muestras de aserraderos y de almacenes de madera

En los últimos años se han elaborado trampas para insectos con cebos para atraer a especies de *Monochamus*, que se pueden emplear también para el monitoreo (Sanchez-Husillos *et al.*, 2015). Cuando las trampas se utilizan para capturar escarabajos *Monochamus* e investigar su posible infestación por *B. xylophilus*, los escarabajos se deben atrapar vivos y no en un líquido que los mate.

En las áreas en las que se conoce que *Monochamus* está presente, los troncos talados durante el período de vuelo de los escarabajos se podrán utilizar como troncos trampa, ya que atraen a los escarabajos para la oviposición y se ha comprobado la transmisión de nematodos en tales situaciones (Dwinell, 1997; Luzzi *et al.*, 1984). Para monitorear la presencia de *B. xylophilus* en un área limitada, se puede muestrear la madera o los escarabajos emergidos. Los escarabajos pueden completar su ciclo biológico en este tipo de material. También es posible acelerar el desarrollo de los escarabajos llevando los troncos trampa al laboratorio en otoño: la emergencia de los escarabajos se adelantará varias semanas con respecto a la que tiene lugar en condiciones naturales.

La toma de muestras de madera, o de virutas o astillas de madera de aserraderos y almacenes podría dar mejores resultados que el muestreo de árboles en pie. Estas muestras podrán proceder de un área muy amplia porque los grandes aserraderos pueden obtener la madera de lugares alejados y procesar tanto madera nacional como importada. Por otra parte esto también es una desventaja, dado que podría ser difícil determinar el origen de una muestra positiva.

3.3 Detección directa en madera, productos derivados de la madera y embalajes de madera maciza

Todos los tipos de madera de coníferas, en especial los embalajes de madera maciza y particularmente los procedentes de países con presencia de *B. xylophilus*, se pueden muestrear mediante un taladro de velocidad baja, una barrena, una sierra, un hacha, un gancho u otros instrumentos. El muestreo se debería concentrar en las piezas con orificios larvarios circulares (de emergencia de los escarabajos) y con túneles larvarios y orificios de entrada ovales, en ocasiones bloqueados por partículas de madera.

Si la madera tiene corteza, su retirada podrá ayudar a detectar galerías. En el caso de la madera aserrada, normalmente no se observarán orificios de salida, pero se podrán observar túneles larvarios, aunque a veces son difíciles de detectar porque están bloqueados por virutas. Se deberían muestrear las piezas con mohos, especialmente las que presenten hongos del azulado. No obstante, se ha comprobado en varias intercepciones que pueden detectarse *B. xylophilus* vivos en muestras que no presentan las condiciones mencionadas (EPPO, 2012).

Los embalajes de madera maciza (p. ej., los palés) pueden entrar en contacto con el suelo durante su utilización. Se podrá producir, por tanto, contaminación superficial de la madera con tierra y con nematodos del suelo, que pueden sobrevivir a la desecación. Para evitar la contaminación de la muestra de madera extraída con estos nematodos, se debería retirar la parte externa de la madera antes de analizar la muestra (Schröder *et al.*, 2009).

3.4 Extracción de nematodos de muestras de madera

Los nematodos vivos se pueden extraer de la madera infestada mediante la técnica del embudo de Baermann o la técnica del embudo de Baermann modificada (Penas *et al.*, 2002; EPPO, 2013c). En la técnica del embudo de Baermann, se llena con agua un embudo de vidrio o de plástico en el que se ha cerrado el tubo estrecho de la base mediante un tubo de goma y una pinza. La muestra, constituida por pequeños trozos o virutas de madera, se dispone sobre un tamiz en el embudo. Se coloca sobre el tamiz un papel tisú permeable a los nematodos para evitar la contaminación del agua con residuos de madera. A continuación se llena el embudo con agua hasta cubrir la muestra y se deja durante 24 h a 48 h a temperatura ambiente o en una incubadora (en ambos casos a aproximadamente 25 °C). Durante ese tiempo los nematodos migran de la madera al agua y caen a la base del embudo, de donde se pueden recolectar dejando salir una pequeña cantidad del agua (aproximadamente 10 ml) del embudo a una pequeña placa.

El principio de la técnica del embudo de Baermann es el descrito más arriba, pero en la práctica se aplican varias modificaciones (EPPO, 2013c). Por ejemplo, las astillas de madera se pueden sumergir directamente en el agua o se pueden colocar en un filtro de algodón dispuesto en una cesta de plástico para la extracción de los nematodos. Además, los métodos descritos en EPPO (2013c) se pueden combinar con un aparato nebulizador.

Los nematodos se pueden transferir con una pipeta o una aguja, con ayuda de una lupa binocular, de la pequeña placa de Petri a un portaobjetos de vidrio para su observación con un microscopio de gran resolución.

La muestra podrá contener muy pocos nematodos, por lo que su detección puede ser difícil. Se recomienda permitir que los nematodos se multipliquen antes de la extracción. Para ello, se introduce la muestra de madera humedecida y sin nada de corteza en una bolsa de plástico, se cierra y se incuba

durante dos a tres semanas a aproximadamente 25 °C. A continuación se extraen los nematodos mediante la técnica del embudo de Baermann.

El principio de la técnica del embudo de Baermann se basa en la detección de los nematodos vivos cuando salen de la muestra de madera, pero durante el período recomendado de 24 h a 48 h, algunos mueren (Baermann, 1917). No obstante, se puede tener la certeza de que estaban vivos cuando comenzó la extracción, y hay que tenerlo en cuenta al analizar material de madera importado. Otros métodos de extracción (p. ej., un método de centrifugación que no se describe aquí pero que es mucho más rápido que la técnica del embudo de Baermann) extraerán también los nematodos que ya estaban muertos en la madera (Moens, 2000). El método de centrifugación se puede utilizar para monitorear un área con infestación por *B. xylophilus*, pero no para demostrar que la madera ha recibido un tratamiento fitosanitario satisfactorio (Moens, 2000).

3.5 Extracción de nematodos de los insectos vectores

Puede analizarse la presencia de nematodos en escarabajos del género *Monochamus* capturados mediante trampas (Pajares *et al.*, 2004; Ibeas *et al.*, 2007) o troncos trampa (Sección 3.2). Los escarabajos se deben atrapar vivos y no en un líquido que los mate, salvo que se vayan a utilizar para la detección molecular directa.

Suele haber nematodos juveniles en el estadio de dispersión J_{IV} (larva dauer) en la tráquea o sobre el cuerpo de los escarabajos. Las larvas dauer (J_{IV}) no tienen estilete. Para aislar los nematodos, se diseccionan y se trituran los escarabajos en una placa adecuada y se mantienen en agua durante 24 h a 48 h a aproximadamente 25 °C (Sousa *et al.*, 2001; EPPO, 2013c). Las larvas dauer abandonarán los escarabajos y se deberán transferir a esteras fúngicas de *Botryotinia fuckeliana* (anamorfo: *Botrytis cinerea*) cultivadas en agar malta (Sección 4.1.1) para que inicien la fase propagativa de su ciclo biológico, ya que la identificación morfológica posterior solo se puede llevar a cabo en nematodos adultos. Otra opción es utilizarlos directamente para la identificación molecular. Los nematodos también se podrán extraer de los escarabajos mediante la técnica del embudo de Baermann.

Los nematodos extraídos de la madera o de los insectos vectores de la forma descrita más arriba se pueden examinar morfológicamente o se pueden usar los extractos directamente en pruebas moleculares de detección de *B. xylophilus*. EPPO (2013b) describe un procedimiento de examen basado en un método de extracción de Baermann modificado seguido de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (RCP o PCR, por las siglas en inglés de *polymerase chain reaction*) en tiempo real (adaptado de François *et al.*, 2007).

Se han descrito también en varios informes métodos moleculares de detección en los que el ADN de *B. xylophilus* se extrae directamente de la madera antes de la amplificación (Takeuchi *et al.*, 2005; François *et al.*, 2007; Kikuchi *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2011; Kanetani *et al.*, 2011; Cardoso *et al.*,

2012). Sin embargo, en estos informes la cantidad de madera utilizada para la extracción del ADN varía entre 5 mg y 120 mg, que es muy poca en comparación con el tamaño de las muestras de madera que se analizan en forma rutinaria. Además, con este método de detección directa mediante análisis molecular se detectaría cualquier nematodo objetivo, tanto vivo como muerto, por lo cual los usuarios de este método deberían disponer de procedimientos definidos para confirmar la presencia de nematodos vivos en la muestra, en caso de que sea pertinente para el objetivo del análisis.

4. Identificación

Hasta la fecha se han descrito unas 110 especies del género *Bursaphelenchus* (Futai, 2013). Las reseñas más recientes son las de Ryss *et al.* (2005), Hunt (2008), Braasch *et al.* (2009) y Futai (2013). Hay dos métodos que permiten identificar *B. xylophilus* con certeza: el basado en las características morfológicas y el basado en técnicas de biología molecular. Aunque el número de especies de *Bursaphelenchus* descritas en los últimos años ha aumentado y algunas de ellas tienen caracteres morfológicos similares, en la mayoría de los casos puede determinarse la especie basándose en la morfología. Sin embargo, podrá ser difícil identificar de este modo la forma mucronada de *B. xylophilus*.

Para la identificación basada en las características morfológicas deben elaborarse preparaciones microscópicas de buena calidad, y se necesita un microscopio de gran resolución, así como una considerable experiencia en la taxonomía de los nematodos, especialmente en el pequeño grupo de especies estrechamente emparentadas con *B. xylophilus* (*B. mucronatus mucronatus*, *B. mucronatus kolymensis*, *B. fraudulentus* y otras). Para aplicar los métodos de identificación basados en la biología molecular se necesitan equipos y reactivos caros, pero se requiere menos experiencia técnica (y muy poca formación nematológica). Sin embargo, se requiere suficiente experiencia para garantizar que los escasos nematodos disponibles no se echen a perder durante el procedimiento. Así como para la identificación morfológica se necesitan especímenes adultos, la identificación molecular se puede llevar a cabo aunque solamente se disponga de estadios juveniles o de adultos de un solo sexo, lo cual supone una ventaja. Aunque los métodos de PCR basados en el ADN no diferencian entre nematodos vivos y muertos, los nuevos métodos basados en el ARNm pueden aclarar si el resultado positivo de un análisis corresponde a nematodos vivos (Leal *et al.*, 2013).

Un nematólogo, o un fitopatólogo experimentado con conocimientos de nematología, puede identificar a *B. xylophilus* basándose en las características morfológicas si dispone de especímenes adultos de ambos sexos y en buenas condiciones. Sin embargo, podrá haber situaciones en las que sea recomendable combinar las características morfológicas y la información molecular para lograr un mayor grado de certidumbre en la identificación de *B. xylophilus*. Por ejemplo, cuando se haya detectado en un área nueva; cuando sea la primera vez que un laboratorio detecta *B. xylophilus*; como

garantía de calidad para el cumplimiento de sistemas de certificación, y cuando se detecte *B. xylophilus* en envíos durante la inspección de importación, especialmente cuando se haya declarado que el país exportador está libre de esta especie. Además, *B. xylophilus* puede mostrar variaciones morfológicas que podrán hacer que sea necesario utilizar técnicas de biología molecular; por ejemplo, el extremo redondeado o mucronado de la cola de las hembras (Figura 4) o la posición del poro excretor. Cuando el número de nematodos aislados sea pequeño, se recomienda multiplicarlos en *B. fuckeliana* antes de la identificación, para obtener una cantidad de material suficiente para una identificación fiable (Sección 4.1.1).

4.1 Identificación morfológica

En un extracto acuoso de madera de conífera podrá haber numerosas especies de nematodos, especialmente si los tejidos han comenzado a descomponerse. Algunas de ellas serán especies saprófagas, cuyos adultos carecen del estilete típico de los nematodos de los órdenes Tylenchida, Aphelenchida y Dorylaimida. Las especies de *Bursaphelenchus* pertenecen al orden Aphelenchida, en el que la glándula esofágica dorsal desemboca en el metacorpus, a diferencia de las de Tylenchida, en el que la glándula se abre hacia el lumen del esófago, entre el bulbo y el estilete (Figura 4). Si el extracto solamente contiene juveniles, la identificación morfológica de *B. xylophilus* no será posible. En esos casos, las especies de Aphelenchoidea de tamaños similares al de los juveniles de *B. xylophilus* (véase, p. ej., Penas *et al.*, 2008) deberían separarse para, a continuación, multiplicarse en una placa de cultivo o utilizarse directamente para la identificación molecular.

Para la identificación con microscopio óptico se recomienda un aumento de 400× a 1000× (objetivo de inmersión en aceite). El uso de un microscopio diferencial de contraste de interferencia (DIC) podrá facilitar la observación.

4.1.1 Preparación de los especímenes

Para obtener material suficiente para la identificación podrá ser necesario multiplicar los nematodos extraídos. La mayoría de las especies de *Bursaphelenchus* se pueden cultivar sobre la forma esporulante del hongo *B. fuckeliana*. Algunas especies, especialmente las que pertenecen al grupo *sexdentati*, deben cultivarse sobre la forma no esporulante. Ambas formas del hongo se cultivan sobre un medio de agar extracto de malta (MEA) al 2 % (15 g de agar, 15 g de extracto de malta, 750 ml de agua; pH 7,0). Las placas de Petri (de 90 mm de diámetro) se rellenan con 25 ml de MEA esterilizado. En una mesa de trabajo limpia, se transfieren a las placas de Petri esporas del hongo o trozos de agar con micelio. Se recomienda incubar las placas con el hongo a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C). Los nematodos que se van a criar sobre la placa se transfieren en una pequeña gota que se deposita sobre el micelio con una pipeta u otro instrumento. Se recomienda

incubar los nematodos a aproximadamente 25 °C (dadas sus características biológicas), para generar una tasa de reproducción que permita obtener suficientes ejemplares adultos y juveniles.

4.1.1.1 Preparaciones temporales

Las preparaciones temporales, para la identificación rápida o para el estudio de características que se observan mejor en especímenes sin fijar, se realizan de la manera que se indica a continuación. Los especímenes vivos se transfieren a una pequeña gota de agua sobre un portaobjetos. El portaobjetos se calienta brevemente pasándolo sobre la llama de un mechero, comprobando frecuentemente el movimiento de los nematodos. Se debería dejar de calentar tan pronto como los especímenes dejen de retorcerse. Tras colocarse un cubreobjetos, la preparación está lista para su estudio. No se recomienda fijar el cubreobjetos, ya que podrá ser necesario mover posteriormente el cuerpo de los machos a la posición dorsoventral para observar la bursa.

4.1.1.2 Preparaciones permanentes

Las preparaciones permanentes para la identificación con un microscopio óptico se realizan de la siguiente manera. Los nematodos vivos, extraídos del material vegetal o criados en placas, se matan con calor suave, se fijan con fijador FAA (35 % de agua destilada, 10 % de formol [formaldehído al 40 %], 5 % de ácido acético glacial, 50 % de alcohol al 95 %) (Andrássy, 1984) o con fijador de trietanolamina y formol (TAF) (7 ml de formol [formaldehído al 40 %], 2 ml de trietanolamina, 91 ml de agua destilada), se tratan con glicerol anhidro (para su almacenamiento a largo plazo) y se montan sobre portaobjetos en glicerol anhidro según se describe en Seinhorst (1959) y en Goodey (1963). Ryss (2003) describió un método más rápido (1–1,5 h) para realizar preparaciones permanentes en el que se mata a los nematodos en una solución caliente de formaldehído al 4 %. Después se fijan las preparaciones a diferentes temperaturas en un regulador térmico programable, y luego se tratan con glicerol. Hay más información sobre la preparación de especímenes de nematodos y de montajes permanentes, con recetas de fijadores, en van Bezooijen (2006), disponible gratis en Internet.

4.1.2 Clave hasta el nivel de la especie

La siguiente clave, derivada parcialmente de Bongers (1989), se utiliza para determinar la subfamilia de los especímenes hembra. La clave para determinar el género *Bursaphelenchus*, de la subfamilia Parasitaphelenchinae, se ha adaptado de Hunt (2008). La clave correspondiente al grupo *xylophilus*, dentro del género *Bursaphelenchus*, es la descrita en Braasch *et al.* (2009). Otra opción es una clave simple y ampliamente utilizada, que ha sido establecida por consenso en la región de la Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas (OEPP, o EPPO, por sus siglas en inglés) y se encuentra disponible en su protocolo de diagnóstico para *B. xylophilus* (EPPO, 2013b).

Las definiciones de la terminología empleada en las secciones siguientes figuran en el documento *Diagnostic protocols for regulated pests: Pictorial glossary of morphological terms in nematology* (Protocolos de diagnóstico para las plagas reglamentadas: glosario ilustrado de términos morfológicos en nematología) de la OEPP (EPPO, 2013b).

4.1.2.1 Clave para las familias o subfamilias

1. Nematodo con lanza o estilete2
 - Nematodo sin lanza o estilete..... **ENPB**
2. Boca con estilete de los tilénquidos, esófago con metacarpus3
 - Boca con estilete de los doriláimidos, esófago cilíndrico o con forma de botella, sin metacarpus **ENPB**
3. Metacarpus con válvula.....4
 - Metacarpus sin válvula **ENPB**
4. Procorpúsculo claramente separado del metacarpus por una constricción5
 - Procorpúsculo y metacarpus no separados por una constricción; bulbo basal muy reducido; cutícula con anillos prominentes **ENPB**
5. Una gónada (vulva posterior).....6
 - Dos gónadas **ENPB**
6. Región labial sin setas7
 - Región labial con setas..... **ENPB**
7. Metacarpus conspicuo, muy muscular y desarrollado, claramente visible con pocos aumentos, de ovoide a rectangular redondeado; glándula esofágica dorsal abierta hacia el lumen del esófago en el metacarpus8
 - Metacarpus normal; glándula esofágica dorsal abierta hacia el lumen del esófago justo por detrás del estilete..... **ENPB**
8. Glándulas esofágicas que solapan el intestino dorsalmente9
 - Glándulas esofágicas en bulbo anexo **ENPB**
9. Extremo de la cola del macho envuelto por una pequeña ala de cutícula de tipo bursa (solo se observa cuando el nematodo está en posición dorsoventral).....10

– Sin ala de cutícula de tipo bursa..... **ENPB**

10. Nódulos del estilete habitualmente presentes, hembra con ano **Parasitaphelenchinae**

– Nódulos del estilete habitualmente no presentes, hembra sin ano **ENPB**

4.1.2.2 Clave para la subfamilia Parasitaphelenchinae

11. En la mayoría de las especies, juveniles J_{III} o larvas dauer J_{IV} asociados foréticamente con insectos; vulva posterior (habitualmente al 60–80 % de la longitud del cuerpo); espículas parcialmente fusionadas o separadas; cola del macho muy recurvada; bursa presente en la mayoría de las especies..... **Bursaphelenchus**

– Larvas dauer J_{IV}; vulva muy posterior (al 80–90 % de la longitud del cuerpo); espículas parcialmente fusionadas; cola del macho no muy recurvada; bursa presente..... **ENPB**

4.1.2.3 Clave para el género Bursaphelenchus

12. Vulva con membrana prominente; espículas largas, delgadas y semicirculares con lámina angular en el tercio posterior; manubrio aplanado con condylus pequeño y rostrum definido, cucullus normalmente presente; banda lateral con cuatro líneas..... **grupo xylophilus**

– Caracteres diferentes **No pertenece al grupo xylophilus**

4.1.2.4 Clave para el grupo xylophilus

Dentro del grupo *xylophilus* se puede utilizar la siguiente clave (enmendada según EPPO [2013b, 2014]) para distinguir entre especímenes de *B. xylophilus* extraídos de la madera y la corteza, y otras especies de *Bursaphelenchus* del mismo grupo. En Braasch y Schönfeld (2015) se describen de forma más detallada las otras especies que pertenecen al grupo *xylophilus*. El grupo *xylophilus* contiene también especies que no provienen de maderas de coníferas (p. ej., *B. populi*); estas se pueden excluir simplemente determinando la especie de la madera. La cría de los nematodos en placas de agar con hongos podrá aumentar la variabilidad de la cola de la hembra.

13. Cola de la hembra ampliamente subcilíndrica, con o sin mucrón (figuras 4 y 5) **14**

– Cola de la hembra cónica (Figura 6) o con estrechamiento pronunciado, con o sin mucrón **No es *B. xylophilus***

14. Longitud de la espícula <30 µm (medida desde el condylus hasta el extremo distal) **15**

– Longitud de la espícula >30 µm..... **No es *B. xylophilus***

15. Espícula con rostrum largo y puntiagudo, ramas de la espícula con curvatura angular (figuras 5C y 7) **16**

- Espícula con rostrum corto y puntiagudo, ramas de la espícula con curvatura redondeada **No es *B. xylophilus***
- 16. Membrana vulvar de la hembra recta, no terminada en un surco profundo (figuras 5G y 8)..... **17**
- Membrana vulvar de la hembra terminada en un surco profundo (Figura 9A)..... **No es *B. xylophilus***
- 17. Cola de la hembra con mucrón >3 µm (figuras 4c y 10d)..... **18**
- Cola de la hembra sin mucrón (figuras 5H y 4a) y con o sin una pequeña proyección <2 µm* (figuras 4b y 5I–J) ***B. xylophilus* (poblaciones de cola redondeada)**
- 18. Poro excretor en el metacorpus o posterior al metacorpus
..... ***B. mucronatus kolymensis* y *B. xylophilus* (poblaciones de cola mucronada**)**
- Poro excretor anterior al metacorpus **No es *B. xylophilus***

ENPB: especie no perteneciente a *Bursaphelenchus*.

* En algunas poblaciones de *B. fraudulentus*, se podrán encontrar hembras con una proyección pequeña o incluso sin mucrón (Figura 9B). Si no se sabe con certeza de qué especie es la madera de la que provienen los nematodos (*B. fraudulentus* está presente en madera de árboles caducifolios y también se ha encontrado en el alerce, pero no en el pino) se recomienda realizar pruebas moleculares.

** Las poblaciones mucronadas de *B. xylophilus* se encuentran principalmente en América del Norte y se recomienda realizar pruebas moleculares (Gu *et al.*, 2011) para distinguirlas de manera fiable del "tipo europeo" de *B. mucronatus*, es decir, *B. mucronatus kolymensis* (Braasch *et al.*, 2011).

Si no es posible discernir la posición del poro excretor, la identificación basada en los caracteres morfológicos podrá ser incorrecta. En esos casos se deberían realizar pruebas moleculares.

B. xylophilus tiene los caracteres generales del género *Bursaphelenchus* (Nickle, 1970; Hunt 2008): cuerpo delgado de aproximadamente 1 mm de longitud; región cefálica alta, diferenciada por una constricción y con seis labios; estilete bien desarrollado, habitualmente con pequeños engrosamientos basales; metacorpus bien desarrollado (figuras 11 y 5F); extremo de la cola del macho con una fuerte curvatura ventral, cónica y con una pequeña bursa terminal que se puede observar en posición dorsoventral (Figura 12); espículas robustas, con forma de espinas de rosa, habitualmente con apéndice y rostrum prominentes; gubernáculo ausente (figuras 7 y 10); vulva al 70–80 % de la longitud del cuerpo; saco post-uterino bien desarrollado (Figura 5A).

La mayoría de las poblaciones de *B. xylophilus* son de cola redondeada y pueden distinguirse de otras especies de *Bursaphelenchus* por la presencia de los tres caracteres siguientes (Figura 10). 1) Los machos de *B. xylophilus* (Figura 7) tienen espículas relativamente largas, curvadas uniformemente, con rostrum prominente y puntiagudo y cucullus (proyección con forma de disco) en los extremos distales de las espículas. 2) La cola de las hembras es subcilíndrica, con un extremo ampliamente

redondeado (Figura 4a), normalmente sin mucrón (pequeña proyección), pero ocasionalmente las hembras de poblaciones de cola redondeada tienen un mucrón en el extremo de la cola, habitualmente de menos de 2 μm (Figura 4b). 3) La vulva tiene un labio anterior largo y superpuesto (Figura 8).

Sin embargo, las hembras de las poblaciones mucronadas tienen por lo general un mucrón (1,5–4,2 μm) en el extremo de la cola (Figura 4c).

Los caracteres que se observan mejor al microscopio electrónico de barrido son las cuatro estrías (Figura 13) de la banda lateral y el número y la posición de las papilas caudales de los machos (Figura 14): un par adanal justo anterior al ano, dos pares postanales, justo antes del origen de la bursa, y una sola papila mediana justo preanal. Estos caracteres a veces son apenas apreciables con el microscopio óptico. Las figuras 13 y 14 son microfotografías electrónicas que ilustran estos dos caracteres, citados en la Sección 4.1.3 a efectos de la agrupación de las especies de *Bursaphelenchus* en el grupo *xylophilus*.

En el Cuadro 1 se proporcionan las medidas de los caracteres morfológicos de *B. xylophilus*.

Cuadro 1. Medidas (medias, e intervalos entre paréntesis) de los caracteres de *Bursaphelenchus xylophilus*

Machos					
Autor Carácter	Nickle <i>et al.</i> (1981) (<i>n</i> = 5) (Estados Unidos) [†]	Mamiya y Kiyohara (1972) (<i>n</i> = 40) (Japón) [†]	Mota <i>et al.</i> (1999) (<i>n</i> = 12) (Portugal) [†]	Penas <i>et al.</i> (2008) (<i>n</i> = 20) (Portugal) [†]	Penas <i>et al.</i> (2008) (<i>n</i> = 20) (Portugal) [‡]
Longitud (L), mm	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)
a (longitud del cuerpo / mayor diámetro corporal)	40,8 (35-45)	42,3 (36-47)	49,4 (44-56)	46,0 (40,2-58,5)	45,7 (41,3-48,9)
b (longitud del cuerpo / distancia entre la válvula anterior y la válvula esofágico)	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)

Machos					
Autor Carácter	Nickle <i>et al.</i> (1981) (<i>n</i> = 5) (Estados Unidos) [†]	Mamiya y Kiyohara (1972) (<i>n</i> = 40) (Japón) [†]	Mota <i>et al.</i> (1999) (<i>n</i> = 12) (Portugal) [†]	Penas <i>et al.</i> (2008) (<i>n</i> = 20) (Portugal) [†]	Penas <i>et al.</i> (2008) (<i>n</i> = 20) (Portugal) [‡]
intestinal)					
c (longitud del cuerpo / longitud de la cola)	24,4 (21-29)	26,4 (21-31)	28,0 (24-32)	21,6 (19,1-24,6)	26,8 (23,6-31,4)
Estilete, µm	13,3 (12,6-13,8)	14,9 (14-17)	12,6 (11-16)	11,0 (10-14)	14,0 (12-15)
Espículas, µm	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)

Hembras					
Autor Carácter	Nickle <i>et al.</i> (1981) (<i>n</i> = 5) (Estados Unidos) [†]	Mamiya y Kiyohara (1972) (<i>n</i> = 30) (Japón) [†]	Mota <i>et al.</i> (1999) (<i>n</i> = 12) (Portugal) [†]	Penas <i>et al.</i> (2008) (<i>n</i> = 20) (Portugal) [†]	Penas <i>et al.</i> (2008) (<i>n</i> = 20) (Portugal) [‡]
Longitud (L), mm	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)
a (longitud del cuerpo / mayor diámetro corporal)	42,6 (37-48)	40,0 (33-46)	50,0 (41-58)	41,9 (32,8-50,6)	45,6 (39,4-50,3)
b (longitud del cuerpo /	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)

distancia entre la válvula anterior y la válvula esofágico intestinal)					
c (longitud del cuerpo / longitud de la cola)	27,2 (23-31)	26,0 (23-32)	26,6 (22-32)	25,4 (20,2-29,0)	28,1 (21,9-34,4)
Estilete, µm	12,8 (12,6-13,0)	15,9 (14-18)	12,3 (11-15)	11,2 (10,0-12,5)	14,4 (12-16)
Posición de la vulva (V), % de L	74,7 (73-78)	72,7 (67-78)	73,3 (70-76)	71,5 (70,1-72,9)	72,6 (70,4-74,5)

† Nematodos extraídos de un sustrato hospedador natural.

‡ Nematodos criados en cultivo de hongos durante un año.

4.1.3 Comparación de *Bursaphelenchus xylophilus* con especies similares

Existen claves para la determinación de las especies de *Bursaphelenchus* (p. ej., Ryss *et al.*, 2005), pero las dos que figuran en Ryss *et al.* (2005) tienen la desventaja de que las descripciones iniciales de las especies de este género están incompletas o se basan en pocos especímenes. Véanse las descripciones originales de 74 especies de *Bursaphelenchus* en Vieira *et al.* (2003).

B. xylophilus es una especie del grupo *xylophilus sensu* Braasch (2001). Aunque actualmente existe controversia entre los taxónomos sobre el número de especies del grupo, en abril de 2015 se consideraba que este incluye al menos 15 especies o subespecies, teniendo en cuenta el número de líneas laterales (Figura 9); el número y la posición de las papilas caudales y las características de la espícula, y la gran membrana vulvar (Gu *et al.*, 2005; Ryss *et al.*, 2005; Braasch *et al.*, 2009; Braasch y Schönfeld, 2015). Recientemente se ha propuesto añadir al menos dos especies de *Bursaphelenchus* (*B. tryphloei* Tomalak y Filipiak, 2011 y *B. masseyi* Tomalak, Worrall y Filipiak, 2013) al grupo *xylophilus*; no obstante, en el presente protocolo se aplica el agrupamiento más reciente de Braasch y Schönfeld (2015), quienes no consideraban a esas especies miembros válidos del grupo debido a la morfología de su espícula. Por tanto, los miembros del grupo *xylophilus* son:

- *B. xylophilus* (Steiner y Buhner, 1934) Nickle, 1970

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

B. xylophilus se puede dividir en dos formas o poblaciones: de cola redondeada y mucronadas (Gu *et al.*, 2011) (Figura 4). Las poblaciones mucronadas se encuentran principalmente en América del Norte y son muy similares a *B. mucronatus kolymensis*.

Las 15 especies o subespecies del grupo *xylophilus* se diferencian de todas las demás especies de *Bursaphelenchus* por la forma de las espículas de los machos y por la presencia de una membrana vulvar con una forma característica en las hembras. Para diferenciar a *B. xylophilus* de las otras 14 especies del grupo se puede utilizar la forma de la cola de la hembra (de subcilíndrica a cilíndrica con extremo normalmente redondeado y ausencia de mucrón). En Braasch y Schönfeld (2015) figura una clave detallada para todas las especies del grupo *xylophilus*, con dibujos de los principales caracteres. En todas las demás especies del grupo, la cola de las hembras es cónica o mucronada. Sin embargo, en América del Norte hay unas pocas poblaciones mucronadas de *B. xylophilus* que son difíciles de diferenciar morfológicamente de otras especies mucronadas (Figura 4). Además, las hembras de *B. xylophilus* procedentes de cultivos de laboratorio normalmente muestran un extremo de la cola típicamente redondeado, mientras que las cepas procedentes de árboles infestados o inoculados artificialmente podrán contener hembras con mucrones de longitud variable, además de hembras de cola redondeada (Figura 4). La cuestión se describe de forma más detallada en Gu *et al.* (2011).

Las especies del grupo *xylophilus* con una distribución más amplia son *B. mucronatus mucronatus* y *B. mucronatus kolymensis*. Su distribución abarca toda Europa y Asia y también están presentes en

Canadá (Ryss *et al.*, 2005). Por lo tanto, la diferenciación más frecuente será probablemente entre *B. xylophilus* y *B. mucronatus mucronatus* o *B. mucronatus kolymensis* (figuras 6 y 10).

La colección de cultivos de *Bursaphelenchus* del Instituto Julius Kühn (Centro Federal de Investigación de Plantas Cultivadas), en el Instituto de Sanidad Vegetal Nacional e Internacional (Braunschweig, Alemania) cuenta con cultivos de referencia de 50 especies de *Bursaphelenchus*, incluidas 41 cepas de *B. xylophilus* de diversos lugares del mundo.

4.2 Identificación molecular

Esta sección contiene información sobre pruebas moleculares que permiten la identificación de *B. xylophilus* a partir de nematodos aislados. Por lo general, las pruebas se realizan después de un examen morfológico, a fin de confirmar los resultados obtenidos. En las siguientes subsecciones se presentan distintos tipos de pruebas que abordan aspectos específicos, según se describe al inicio de cada sección.

Hay muchos métodos de identificación de *B. xylophilus* disponibles. Las pruebas moleculares que se describen a continuación son las recomendadas en el momento de la elaboración del protocolo, pero se podrán realizar otras. La identificación molecular se puede llevar a cabo mediante métodos basados en la PCR convencional (Sección 4.2.2) o en la PCR en tiempo real (Sección 4.2.3). Todas estas técnicas, en particular la de los polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (PLFR o RFLP, por sus siglas en inglés) de las regiones del espaciador transcrito interno (ETI o ITS, por sus siglas en inglés) (Sección 4.2.1), se han utilizado satisfactoriamente en laboratorios de todo el mundo, pero hasta la fecha no han sido evaluadas mediante una prueba interlaboratorios. Para la detección directa y la identificación del nematodo objetivo a partir de la madera, se ha desarrollado una prueba de amplificación isotérmica mediada por asas (LAMP, por su acrónimo en inglés) (Sección 4.2.5). El método de identificación molecular más reciente se basa en la secuenciación y en el análisis basado en el código de barras de ADN (Sección 4.2.8). Para aplicar este método se debe tener acceso a instalaciones de secuenciación y a secuencias fiables (como las disponibles en la base de datos Q-bank, <http://www.q-bank.eu/Nematodes/>), así como disponer de personal muy especializado capaz de analizar las secuencias de tal modo que se eviten resultados falsos.

Cuando se utilizan técnicas moleculares para la detección de *B. xylophilus* en productos derivados de la madera con fines cuarentenarios, es crucial distinguir entre nematodos vivos y muertos. Diversos tratamientos fitosanitarios matan a *B. xylophilus* en la madera y con los actuales métodos de detección basados en el ADN no es posible diferenciar si un resultado positivo se debe al ADN de nematodos vivos o a residuos de ADN de nematodos muertos. Para cuestiones relativas a la reglamentación de la cuarentena son preferibles los métodos moleculares basados en el ARN, que permiten distinguir entre los nematodos vivos y muertos presentes en la madera (Leal *et al.*, 2013) (Sección 4.2.4). Este

problema debe tenerse en cuenta al elegir el método de extracción de los nematodos (p. ej., para la técnica del embudo de Baermann debe haber nematodos vivos; véanse las Secciones 3.4 y 3.5) y la técnica molecular para la determinación. Siempre que sea posible, un resultado positivo de las pruebas moleculares se debería validar mediante identificación morfológica.

En este protocolo de diagnóstico, los métodos (incluidas las referencias a nombres comerciales) se describen según se publicaron, ya que en la publicación se definió el nivel inicial de sensibilidad, especificidad y/o reproducibilidad alcanzado. El uso de nombres de reactivos, productos químicos o equipo en estos protocolos de diagnóstico no implica su aprobación ni la exclusión de otros que también podrán ser adecuados. Los procedimientos de laboratorio presentados en los protocolos podrán ajustarse a las normas de los laboratorios individuales, siempre que estén adecuadamente validadas.

4.2.1 PCR-RFLP de las regiones ITS

Burgermeister *et al.* (2005, 2009) utilizaron una técnica de PCR-RFLP de las regiones ITS para diferenciar a *B. xylophilus* de otras 43 especies de *Bursaphelenchus*. En casi todas las descripciones de especies nuevas de *Bursaphelenchus* publicadas después de 2009 figuran los patrones de PCR-RFLP de las regiones ITS basados en el método desarrollado por Burgermeister *et al.* (2009). De todas las técnicas moleculares del presente protocolo, esta es la que se ha demostrado efectiva para un rango más amplio de especies de *Bursaphelenchus*.

El ADN se extrae de nematodos en diversas etapas de desarrollo biológico (hembras y machos adultos, juveniles) utilizando el QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen¹). Las muestras de nematodos (de 1 a 30 especímenes) se colocan en 5 µl de agua en tubos Eppendorf¹ y se congelan a –20 °C hasta la extracción. Antes de la extracción, la muestra se descongela, se mezcla con 10 µl de tampón ATL (Qiagen¹) y se homogeneiza en el tubo Eppendorf¹ con una micromano o micromaja de mortero (Eppendorf¹). A continuación, se realiza el proceso de extracción del ADN siguiendo las recomendaciones del fabricante (Protocolo de aislamiento de ADN genómico de tejidos [Isolation of genomic DNA from tissues] del manual QIAamp DNA Micro Kit Handbook, de Qiagen¹), con las siguientes excepciones: en el paso 4, la incubación dura 3 h; en el paso 12 (elución), se añaden a la membrana 20 µl (para la extracción de un único espécimen de nematodo) a 100 µl (para la extracción de hasta 30 especímenes) de tampón AE (Qiagen¹), y el eluido que contiene el ADN extraído se almacena a –20 °C hasta su uso.

¹ En este protocolo de diagnóstico, los métodos (incluidas las referencias a nombres comerciales) se describen según se publicaron, ya que en la publicación se definió el nivel inicial de sensibilidad, especificidad y/o reproducibilidad adquirido. El uso de nombres de reactivos, productos químicos o equipo en estos protocolos de diagnóstico no implica su aprobación ni la exclusión de otros que también podrán ser adecuados. Los procedimientos de laboratorio presentados en los protocolos podrán ajustarse a las normas de los laboratorios individuales, siempre que estén adecuadamente validadas.

El análisis PCR-RFLP de las regiones ITS se lleva a cabo realizando una PCR del ADN extraído y analizando a continuación los RFLP del producto de la PCR. Se amplifica mediante la PCR un segmento de ADN ribosómico (ADNr) del nematodo que contiene las regiones ITS1 e ITS2 utilizando el siguiente par de cebadores:

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

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

La mezcla de la PCR (50 µl) contiene 0,6 µM de cada cebador, 2 U de ADN polimerasa de Taq (Stratagene¹ o Fermentas¹), 10 mM de Tris-HCl (pH 8,8), 50 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) y 2 ng de molde de ADN. La amplificación se realiza en un termociclador, con los siguientes parámetros de ciclado: desnaturalización durante 2,5 min a 94 °C, 40 ciclos de reacción de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C y 2 min a 72 °C, y una extensión final de 5 min a 72 °C. Una vez finalizada la PCR, se analizan mediante electroforesis en gel alícuotas de 5 µl del producto de la reacción. Se digieren alícuotas adecuadas del ADN amplificado con 3 U de las endonucleasas de restricción *AluI*, *HaeIII*, *HinfI*, *MspI* y *RsaI*, siguiendo las instrucciones del fabricante.

La identificación de *B. xylophilus* se basa en los patrones de fragmentos de restricción del ADN propios de la especie (Figura 15). Se han descrito (Gu, 2014) el número y tamaños de los fragmentos de restricción del ADN de al menos las siguientes especies de *Bursaphelenchus*: *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* (anteriormente *B. mucronatus* de tipo asiático), *B. mucronatus kolymensis* (anteriormente *B. mucronatus* de tipo europeo), *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* y *B. yuyaoensis*.

Se ha propuesto el reagrupamiento de *B. hunanensis* y *B. lini* y, por tanto, ya no pertenecen al género *Bursaphelenchus*. Burgermeister *et al.* (2009) proporcionan una síntesis exhaustiva de los patrones y los tamaños de los fragmentos de ADN resultantes del análisis RFLP de las regiones ITS correspondientes a 44 especies de *Bursaphelenchus*. En el Cuadro 2 se presenta un ejemplo de diferenciación entre especies basada en los patrones de fragmentos de restricción del análisis RFLP de

las regiones ITS de cepas aisladas de *B. xylophilus*, *B. mucronatus mucronatus* y *B. mucronatus kolymensis*.

Cuadro 2. Patrones de polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de especies de *Bursaphelenchus*

Especie	Producto de la PCR (pares de bases)	Fragmentos de restricción (pares de bases) producidos por la enzima de restricción				
		<i>RsaI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>MspI</i>	<i>HinfI</i>	<i>AluI</i>
<i>B. mucronatus</i> de tipo asiático = <i>B. mucronatus mucronatus</i>	920	486 412 12	621 299	355 302 263	408 232 121 86 49 24	674 246
<i>B. mucronatus</i> de tipo europeo = <i>B. mucronatus kolymensis</i>	925	413 263 227 22	625 195 105	356 303 266	412 232 121 87 49 24	678 247
<i>B. xylophilus</i>	925	483 420 22	728 197	562 363	263 232 142 139 125 24	433 256 142 96

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

4.2.2 PCR convencional

Las siguientes pruebas de PCR permiten identificar la especie *B. xylophilus*, pero no determinar la presencia de alguna otra especie de *Bursaphelenchus*.

4.2.2.1 PCR convencional dirigida a las regiones ITS del ADNr

Matsunaga y Togashi (2004) describieron un método específico para identificar la especie *B. xylophilus* centrado en las regiones ITS1–ITS2 del ADNr. Este método se evaluó con cinco

poblaciones japonesas de *B. xylophilus* y con cuatro de *B. mucronatus*. El protocolo experimental es el siguiente.

Los nematodos se colocan individualmente en 5 µl de tampón de lisis (50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl [pH 8,2], 2,5 mM de MgCl₂, 0,45 % [p/v] de Nonidet P-40, 0,45 % [p/v] de Tween 20, 0,01 % [p/v] de gelatina y 0,06 mg/ml de proteinasa K) en tubos de reacción MicroAmp de 0,2 ml (Applied Biosystems¹) y se dejan durante 10 min a una temperatura de -70 °C o inferior (extracción de ADN adaptada de Barstead *et al.*, 1991). Tras la descongelación a temperatura ambiente, la solución de ADN se calienta durante 1 h a 60 °C y luego durante 15 min a 95 °C. El extracto bruto de ADN resultante se utiliza como molde en una PCR específica que se lleva a cabo utilizando el siguiente par de cebadores:

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

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

La PCR se realiza en 10 µl de una mezcla de reacción que contiene el molde de ADN preparado previamente (5 µl de extracto bruto de ADN), 50 mM de KCl, 10 mM de Tris (pH 8,3), 1,5 mM de MgCl₂, 0,001 % de gelatina, 200 µM de cada dNTP, 5 pmol de cada cebador y 0,25 U de ADN polimerasa de Taq (AmpliTaq Gold, Applied Biosystems¹) en un termociclador Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystems¹). Después de la desnaturalización durante 5 min a 94 °C, se realiza un ciclo de 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 55,9 °C y 1 min a 72 °C, con una extensión final de 6 min a 72 °C.

Esta reacción produce un amplicón de ADN de 557 pares de bases (pb) en todas las cepas aisladas de *B. xylophilus* analizadas.

4.2.2.2 PCR convencional dirigida al ADN satélite

Castagnone *et al.* (2005) describieron un método específico para identificar la especie *B. xylophilus* utilizando una técnica de PCR basada en el ADN satélite, cuya especificidad se evaluó con especies de *Bursaphelenchus* (*B. leoni*, *B. mucronatus* y *B. tusciae*) distintas de la especie objetivo y con una población japonesa y dos canadienses de *B. xylophilus*.

Para la amplificación se utilizan especímenes individuales de nematodos preparados según un procedimiento de PCR modificado de Williams *et al.* (1992). En resumen, se transfieren especímenes individuales de nematodos a un tubo para PCR y se cubren con 2,5 µl de tampón de lisis (50 mM de KCl, 10 mM de Tris [pH 8,2], 2,5 mM de MgCl₂, 60 mg/ml de proteinasa K, 0,45 % de Nonidet P-40, 0,45 % de Tween 20 y 0,01 % de gelatina). Los tubos se dejan durante 45 min a -80 °C; inmediatamente después, se transfieren a un termociclador en el que se ponen durante 60 min a 60 °C

y luego 15 min a 95 °C. El extracto bruto de ADN resultante se utiliza como molde en una PCR específica.

Los cebadores para la PCR utilizados en la reacción corresponden a lugares cercanos a ambos extremos de la secuencia del monómero de 160 pb de la familia de ADN satélite caracterizada previamente en *B. xylophilus* (Tarès *et al.*, 1993; número de registro en 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'

La PCR se realiza en 25 µl de una mezcla de reacción que contiene el molde de ADN preparado previamente (5 µl de extracto bruto de ADN), 50 mM de KCl, 10 mM de Tris (pH 8,2), 2,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 250 ng de cada cebador y 1 U de ADN polimerasa de Taq (QBiogene¹). Después de la desnaturalización durante 5 min a 94 °C, se realiza un ciclado de 25 ciclos de 30 s a 94 °C, 1 min a 64 °C y 1 min a 72 °C, con una extensión final de 5 min a 72 °C.

Dado que, según se ha comprobado, la familia de ADN satélite está formada por unidades repetidas organizadas en alineamientos en tándem (Tarès *et al.*, 1993), tras realizar una PCR tomando como molde el ADN de *B. xylophilus* se obtiene un patrón en escalera de múltiplos del monómero de 160 pb. Por el contrario, para otras especies de *Bursaphelenchus* no se detecta amplificación, obteniéndose así un resultado sencillo y fiable para la detección de *B. xylophilus*, que será claramente positivo o claramente negativo (Castagnone *et al.*, 2005).

4.2.3 PCR en tiempo real

Pueden realizarse pruebas de PCR en tiempo real para la identificación específica de *B. xylophilus*. Por lo general, este tipo de pruebas son más sensibles y requieren menos tiempo que las técnicas convencionales de PCR descritas en las Secciones 4.2.1 y 4.2.2.

4.2.3.1 PCR en tiempo real dirigida a las secuencias de ADN satélite

François *et al.* (2007) describieron un método específico para identificar la especie *B. xylophilus* utilizando secuencias del ADN satélite. Este método es muy sensible: permitió detectar incluso 1 pg de ADN genómico y especímenes individuales de nematodos en muestras mixtas en las que se asociaron *B. xylophilus* y la especie estrechamente emparentada *B. mucronatus*, hasta el límite del 0,01 % y el 1 % de la mezcla, respectivamente. Con este método también se detectó *B. xylophilus* directamente en muestras de 100 mg de madera.

El ADN se extrae de nematodos aislados procedentes de cultivos puros mediante un procedimiento simplificado, según se ha descrito anteriormente (Castagnone *et al.*, 2005), con una ligera

modificación: no se utiliza un volumen de tampón de lisis constante, sino que se adapta en función del número de nematodos (3 µl para uno a cuatro nematodos y 20 µl para un número mayor).

Para la extracción del ADN de madera infestada con *B. xylophilus* se utiliza un ChargeSwitch genomic DNA Plant Kit (Invitrogen¹). Se corta aproximadamente 0,1 g de madera infestada en pequeños trozos y se introduce en una bolsa de plástico con 5 ml de tampón de lisis CST que contiene un 1 % de polivinilpirrolidona y 20 mM de cloruro de calcio. La muestra se disgrega ligeramente con un martillo y, a continuación, se retira 1 ml del lisado y se procesa siguiendo las instrucciones del fabricante. Resumidamente, se añaden 100 µl de dodecil sulfato sódico al lisado, después se incuba durante 5 min a temperatura ambiente y luego se añaden 400 µl de tampón de precipitación y se centrifuga durante 5 min a máxima velocidad (aproximadamente 18 000 g). Se retira aproximadamente 1 ml de sobrenadante y se añaden al sobrenadante 100 µl de detergente CST y 40 µl de microesferas CST. Las microesferas CST y el ADN ligado se transfieren, con un PickPen 8-M (Bio-Nobile¹), pasando por dos etapas de lavado (con 1 ml de tampón de lavado CST en cada etapa), a 150 µl de tampón de elución CST en una placa de pocillos profundos de 2,2 ml. A continuación se retiran las partículas magnéticas. El ADN se analiza inmediatamente o bien se almacena a -20 °C para futuros análisis.

En este método se utilizan los siguientes cebadores y sonda TaqMan:

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

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

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

La PCR se realiza en un volumen total de 25 µl que contiene 1 µl de ADN genómico. Cada reacción contiene 2,5 µl de tampón de reacción 10× (qPCR Core Kit, Eurogentec¹), 5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,5 U de polimerasa de Taq (qPCR Core Kit¹) y 200 nM de cada cebador y de la sonda. Las pruebas de PCR en tiempo real se realizan en un termociclador DNA Engine Opticon 2 (MJ Research¹). Los parámetros de ciclado son: 10 min a 95 °C, seguidos de 30 ciclos de 15 s a 95 °C y 30 s a 59 °C. Los datos se analizan con la versión 3.1 del programa informático Opticon 2 Monitor¹ conforme a las instrucciones del fabricante. Los extractos se analizan sin diluir y diluidos 1:10 en agua libre de nucleasas.

La prueba de extractos de madera mediante la PCR en tiempo real se realiza en un SmartCycler II (Cepheid¹). La mezcla de reacción contiene 0,025 U/µl de Hot Taq (Biogene¹), tampón de PCR 1×, 0,2 mM de cada dNTP, 5,5 mM de MgCl₂, 5 % de trehalosa (p/v), 300 nM de cada cebador y 100 nM de la sonda. Las condiciones de ciclado son: 10 min a 95 °C, seguidos de 40 ciclos de dos pasos: 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C. Los datos se analizan con el umbral predeterminado establecido en el programa

informático del SmartCycler II¹ (30 unidades de fluorescencia). Los extractos se analizan sin diluir y diluidos 1:10 en agua libre de nucleasas.

4.2.3.2 PCR en tiempo real dirigida a la secuencia del gen *hsp70*

Leal *et al.* (2007) desarrollaron un método de PCR en tiempo real basado en el gen de una proteína de choque térmico (*hsp70*). Se comprobó que este método era específico para *B. xylophilus* (se probó en cinco aislamientos de *B. xylophilus*) al no observarse amplificación en siete especies de *Bursaphelenchus* distintas de la especie objetivo. Esta PCR dirigida al gen *hsp70* es lo suficientemente sensible como para detectar al menos 0,005 ng de ADN genómico de *B. xylophilus*, así como el ADN extraído de especímenes individuales del nematodo.

Para la extracción del ADN se utiliza el método de Burgermeister *et al.* (2005) con los siguientes cambios: 1) la incubación del homogeneizado de la muestra, a 56 °C, no se realiza durante 3 h, sino durante una noche; 2) el ARN transportador (*carrier*) solo se utiliza cuando el ADN se extrae de especímenes de nematodos individuales; 3) se aplica a la membrana de la minicolumna tampón de elución (10 mM de Tris-HCl, pH 8,0) y se incuba durante 5 min antes de la centrifugación para eluir el ADN de la muestra; 4) los extractos de ADN se calientan durante 5 min a 55 °C para eliminar todo el etanol residual que podría afectar posteriormente a la medición de la cantidad y la calidad del ADN y a la amplificación mediante la PCR, y 5) las muestras se eluyen en volúmenes de 30 µl (muestras que contienen un solo espécimen de nematodo) y de 50 µl (muestras que contienen más de un nematodo).

En este método se utilizan los siguientes cebadores y sonda TaqMan (los ácidos nucleicos bloqueados se indican con minúsculas):

BxLNAF: 5'-TAA GAT GTc TTT tAc AGA TGc CAA G-3'

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

Sonda con marcación dual TaqMan BxLNAP: 5'-FAM-AtT GgC CGC AAA TtC GaT GAa CC-IAbkFQ-3'

La PCR se realiza en un volumen de reacción de 20 µl que contiene 5 µl del molde, 50 mM de Tris (pH 8,3), 0,25 mg/ml de albúmina sérica bovina (ASB, o BSA por sus siglas en inglés) no acetilada (Sigma¹), 0,1 µM de la sonda, 0,7 µM del cebador directo, 0,5 µM del cebador inverso, 0,4 mM de cada dNTP (Roche¹), 5,0 mM de MgCl₂ y 1,0 U de ADN polimerasa de Taq FastStart (Roche¹). La amplificación se lleva a cabo en el termociclador LightCycler 1.5 (Roche Diagnostics¹), con los siguientes parámetros: desnaturalización inicial y activación de la ADN polimerasa de Taq FastStart (Roche Diagnostics¹) durante 10 min a 95 °C, seguida de 45 ciclos de desnaturalización durante 5 s a 94 °C, hibridación durante 20 s a 62 °C y extensión durante 10 s a 72 °C. Los datos se analizan con la versión 3.5 del programa informático del LightCycler¹.

Para confirmar la calidad del ADN genómico de nematodo purificado que se utiliza en esta prueba, se realiza una amplificación mediante PCR convencional con los cebadores de control ITS1-F e ITS2-R (descritos en la Sección 4.2.1). Los 25 µl de mezcla de reacción para la PCR se componen de 5 µl del molde, 2,5 µl de tampón de reacción 10× (50 mM de Tris-HCl, 10 mM de KCl, 5 mM de (NH₄)₂SO₄; pH 8,3), 1,5 mM de MgCl₂, 1 µM de cada cebador, 1,6 µg de BSA, 0,2 mM de cada dNTP y 1 U de ADN polimerasa de Taq FastStart (Roche¹). Los parámetros de ciclado incluyen una etapa inicial de desnaturalización durante 5 min a 94 °C, seguida de 40 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C y 2 min a 72 °C, con una extensión final de 5 min a 72 °C.

4.2.4 Pruebas moleculares basadas en el ARN para la detección de *Bursaphelenchus xylophilus* vivos

Las pruebas siguientes detectan solamente nematodos vivos. Las dos pruebas son de PCR con transcripción inversa (RT-PCR, por sus siglas en inglés), una convencional y otra en tiempo real

4.2.4.1 RT-PCR convencional dirigida a la secuencia del gen *hsp70* del ADN

Leal *et al.* (2013) describieron un método de RT-PCR convencional para la detección de *B. xylophilus* vivos basado en una secuencia del gen *hsp70*. En esta prueba, los cebadores directo e inverso se disponen a ambos lados del intrón *hsp70* de manera que se puede diferenciar fácilmente el ADN genómico del ADNc por el tamaño de los amplicones. La especificidad de la prueba se evaluó con seis especies de *Bursaphelenchus* distintas de la especie objetivo y con seis cepas aisladas de *B. xylophilus*. El límite de detección de esta prueba es de 0,4 nematodos por reacción, con medición en tres de tres repeticiones.

Se extraen el ARN y el ADN genómico de al menos 20 nematodos. La extracción simultánea del ARN y el ADN genómico se realiza con el AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen¹) siguiendo el protocolo del fabricante, con las siguientes modificaciones: los gránulos de nematodos que se habían almacenado a –80 °C se trituran con una mano de mortero Kontes Pellet Pestle (Kimble Chase Life Science and Research Products¹) y se añade a cada gránulo 350 µl de tampón de lisis RLT (del equipo de extracción Qiagen¹). La homogeneización se realiza con columnas de centrífuga QIAshredder Mini (Qiagen¹). El ARN se eluye de cada columna con 20 µl de agua libre de ribonucleasas y el ADN se eluye con 50 µl de tampón de elución Buffer EB precalentado (del kit de extracción Qiagen¹). El eluido se deja reposar en la membrana de la columna durante aproximadamente 3 min para facilitar la máxima elución con una única centrifugación.

En esta prueba se utilizan los siguientes cebadores específicos para *B. xylophilus* y, a partir del molde de ADNc, se obtiene un amplicón de 473 pb:

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

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

Para comprobar que la prueba se desarrolla según lo previsto al analizar el ADN genómico aislado, pueden incluirse los siguientes cebadores de control, dirigidos al gen de la actina, que producen un amplicón de 228 pb:

BxActF3: 5'-TCG TCA CCA ACT GGG ATG ATA-3'

BxActR3: 5'-CAC CAG TGG TAC GAC CG-3'

Se aplica un protocolo de RT-PCR en dos pasos. La reacción RT se realiza con el Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics¹), aplicando el protocolo del cebador oligo (dT)18 anclado. Para la síntesis del ADNc se utilizan 12 µl de ARN como material de partida. Se incluye el paso opcional, recomendado por el fabricante del kit, de desnaturalizar el ARN y los cebadores durante 10 min a 65 °C y enfriar en hielo inmediatamente después. Una vez completada la síntesis del ADNc, las muestras se almacenan a -20 °C para su uso posterior como moldes.

Los 25 µl de mezcla de reacción para la PCR contienen 2 µl de ADNc como molde, 19 µl de tampón de PCR GoTaq Flexi (Promega¹), 1,5 mM de MgCl₂, 0,20 mM de cada dNTP (Roche Diagnostics¹), 1,25 U de GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega¹) y 0,4 µM de cada cebador (Hsp23F1 y Hsp19R2). La amplificación se realiza aplicando los siguientes parámetros de ciclado: una etapa inicial de desnaturalización durante 5 min a 95 °C, seguida de 35 ciclos de amplificación (desnaturalización durante 30 s a 95 °C, hibridación durante 30 s a 60 °C y extensión durante 1 min a 72 °C) y una extensión final durante 5 min a 72 °C. Para la amplificación con los cebadores de control se utilizan 25 µl de la misma mezcla de reacción para la PCR anterior, excepto que se emplean 1 µl de ADN genómico (40 ng/µl) y 1 µM de cada cebador (BxActF3 y BxActR3). La amplificación se realiza aplicando los siguientes parámetros de ciclado: una etapa inicial de desnaturalización durante 5 min a 95 °C, seguida de 35 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 52 °C y 1 min a 72 °C, y una extensión final durante 5 min a 72 °C.

4.2.4.2 RT-PCR en tiempo real dirigida a la secuencia del gen hsp70 del ADNc

Leal *et al.* (2013) describieron una prueba de RT-PCR en tiempo real con detección con SYBR Green para identificar a *B. xylophilus* vivos exclusivamente mediante la detección de la presencia del ARNm del gen *hsp70* como marcador de viabilidad. Esta prueba detecta la amplificación específica del ADNc retrotranscrito a partir del gen *hsp70* de *B. xylophilus*, dado que el cebador inverso se fija en una unión intrón-exón, de modo que se excluye la amplificación del ADN genómico. Su especificidad se evaluó

con seis especies de *Bursaphelenchus* distintas de la especie objetivo y con seis aislamientos de *B. xylophilus*. El límite de detección de esta prueba es de 0,25 nematodos por reacción, con medición en tres de tres repeticiones.

El protocolo para la extracción simultánea del ARN y el ADN genómico se aplica de igual manera que en el método de la PCR convencional (Sección 4.2.4.1).

En esta prueba se utilizan los siguientes cebadores:

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

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

Se podrán incluir los siguientes cebadores de control interno para comprobar que la prueba se desarrolla según lo previsto:

BxActF3: 5'-TCG TCA CCA ACT GGG ATG ATA-3'

BxActR3: 5'-CAC CAG TGG TAC GAC CG-3'

Se aplica un protocolo de RT-PCR en dos pasos y la síntesis del ADNc se realiza del mismo modo que en el método de la PCR convencional (Sección 4.2.4.1), excepto que se utiliza el cebador oligo (dT)18 anclado o bien el cebador específico de la secuencia (HspexR3). Una vez completada la síntesis del ADNc, las muestras se almacenan a -20 °C para su uso posterior como moldes.

Los 20 µl de mezcla de reacción para la PCR se componen de 5 µl de molde de ADNc (diluido 1:10 en 10 mM de Tris, pH 8,0), 0,6 µM de cebador directo (HspexF3) y 0,4 µM de cebador inverso (HspexR3), y 4 µl de LightCycler FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green 1 Mix 5× (Roche Diagnostics¹). La amplificación en tiempo real se realiza en un LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics¹) utilizando la versión 4.1 del programa informático del LightCycler¹ con los siguientes parámetros: desnaturalización inicial y activación durante 10 min a 95 °C, seguida de 40 ciclos de 15 s a 95 °C, 10 s a 66 °C y 15 s a 72 °C. Para la amplificación con los cebadores de control, se utilizan 20 µl de una mezcla de reacción para PCR igual a la anterior, excepto que se emplean 0,5 µM de cada cebador (BxActF3 y BxActR3). La amplificación se realiza aplicando los siguientes parámetros de ciclado: desnaturalización inicial y activación durante 10 min a 95 °C, seguida de 45 ciclos de 15 s a 95 °C, 10 s a 52 °C y 15 s a 72 °C.

4.2.5 LAMP

Kikuchi *et al.* (2009) describieron un método para detectar *B. xylophilus* en muestras de madera mediante LAMP. Estos autores desarrollaron el método para una detección de *B. xylophilus* más rápida y con mayor sensibilidad que la de la prueba de PCR en tiempo real con sonda TaqMan,

también desarrollada por su grupo. La especificidad de los cebadores y de la prueba de LAMP se confirmaron con ADN de material biológico de especies distintas de la especie objetivo: diez especies de nematodos emparentadas con *B. xylophilus*, seis géneros de nematodos distintos del género objetivo, *P. thunbergii*, *P. densiflora* y *B. fuckeliana*. Se determinó que la sensibilidad de la prueba de LAMP es de diez copias del gen objetivo (ITS) y de $2,5 \times 10^{-5}$ partes de nematodo aislado de un cultivo puro.

Las muestras de madera (aproximadamente 0,12 g de madera en el procedimiento experimental) se incuban durante 20 min a 55 °C en 800 µl de tampón de extracción, que contiene proteinasa K y ditiotretitol incluido en el kit para la detección de *B. xylophilus* (Nippon Gene¹), y a continuación durante 10 min a 95 °C.

En este método se utilizan los siguientes cebadores LAMP:

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'

La reacción de la prueba de LAMP se realiza de la manera descrita por Notomi *et al.* (2000) con el Loopamp DNA Amplification Kit (Eiken Chemical¹). Los 25 µl de mezcla de reacción contienen 2 µl del ADN extraído, 5 pmol de cada uno de los cebadores F3 y B3, 40 pmol de cada uno de los cebadores FIP y BIP, 20 pmol del cebador LF, 12,5 µl de la mezcla de reacción 2×, 1 µl de ADN polimerasa de Bst y 1 µl del reactivo de detección fluorescente (Eiken Chemical¹). La mezcla de reacción se incuba durante 60 min a 120 min a 63 °C y la incubación finaliza con un período de 2 min a 80 °C. Los amplicones generados se detectan por cambios de color de la solución de reacción al exponerla a luz ultravioleta.

Otra posibilidad es evaluar los productos amplificados mediante un sistema de detección basado en sondas. Para la reacción de LAMP se utiliza la forma biotinilada 5' del cebador FIP. Después de la reacción de LAMP se añaden a la mezcla de reacción 10 µl de sonda marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (10 pmol/µl; 5'-GGC GAG AGG GCT TCG TGC TCG ATT GTC GTG C-3'), diseñada para hibridar con una región interna de la secuencia objetivo, se incuba durante 5 min a 95 °C y luego se enfría lentamente hasta 25 °C. La mezcla de reacción se diluye con 100 µl de tampón

de electroforesis (solución salina con tampón fosfato con un 3 % de Tween) y se aplica directamente a tiras reactivas HybriDetect (Milenia Biotec¹) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las tiras HybriDetect detectan fragmentos que contienen tanto biotina como FITC resultantes de la amplificación específica. Por el contrario, si se ha producido una amplificación inespecífica no se observa en la tira reactiva una línea indicadora de un resultado positivo.

4.2.6 Controles para las pruebas moleculares

Para considerar fidedigno el resultado de las pruebas, en cada serie de aislamiento de ácidos nucleicos y de amplificación del ácido nucleico de la plaga objetivo se deberían tener en cuenta los controles adecuados, que dependerán del tipo de prueba utilizada y del grado de certidumbre requerido. Para las pruebas moleculares, deberían utilizarse, como mínimo, un control positivo de ácido nucleico, un control negativo de amplificación (control sin molde) y, cuando sea pertinente, (p. ej., en la detección directa del nematodo) un control interno. Para la RT-PCR (convencional o en tiempo real), se debería incluir un control positivo de la transcripción inversa.

Control positivo de ácido nucleico. Este control se utiliza para determinar si la prueba se desarrolló o no según lo previsto en las condiciones experimentales y con los parámetros establecidos. Un control positivo puede ser cualquier ácido nucleico que contenga la secuencia objetivo de la prueba; es decir, un ácido nucleico de *B. xylophilus* que haya resultado positivo con anterioridad, un plásmido que contenga la secuencia objetivo clonada, ARN transcrito *in vitro*, un producto de una reacción de amplificación anterior o un oligonucleótido largo o ADN bicatenario sintético.

Control negativo de amplificación (control sin molde). Este control es necesario para la PCR a fin de descartar falsos positivos por contaminación durante la preparación de la mezcla de reacción o por amplificación inespecífica. En la fase de amplificación se añade el agua de calidad apta para PCR que se utilizó para preparar la mezcla de reacción.

Control interno. Para la PCR convencional, la PCR en tiempo real y la prueba LAMP, se pueden utilizar controles endógenos tales como la región del ITS, la subunidad 18S del ARNr o los genes de la actina β o COX a fin de descartar la posibilidad de falsos negativos debido a deficiencias en la extracción del ácido nucleico o a su degradación, o a la presencia de inhibidores de la PCR.

En el caso de la RT-PCR, debería incorporarse un control sin transcriptasa inversa para verificar que las muestras de ARN no están contaminadas con ADN genómico. Este control contiene todos los reactivos de la RT-PCR excepto la enzima transcriptasa inversa. En ausencia de contaminación con ADN genómico, con este control no debería producirse ninguna señal tras la amplificación.

En la RT-PCR debería incorporarse un control positivo de transcriptasa inversa para verificar que la enzima transcriptasa inversa funciona correctamente. Este control contiene todos los reactivos de la

RT-PCR y un extracto de ARN que incluye la secuencia objetivo de la prueba (p. ej., un extracto de ARN preparado por el laboratorio y que se ha confirmado previamente que es positivo). Con este control se debería producir una señal tras la amplificación.

Tanto para la RT-PCR como para la prueba LAMP, deben adoptarse precauciones a fin de evitar la contaminación cruzada por aerosoles procedentes del control positivo o de las muestras positivas.

4.2.7 Interpretación de los resultados de la PCR

4.2.7.1 PCR convencional

La prueba de PCR específica del patógeno solo se considera válida si:

- el control positivo produce un producto de la amplificación del tamaño esperado para el nematodo objetivo
- el control negativo de extracción y el control negativo de amplificación no producen un producto de la amplificación del tamaño esperado para el nematodo objetivo.

Si se utilizan cebadores de control interno, en el caso de las reacciones simples, los controles positivos y todas las muestras de la prueba deberían producir un producto de amplificación del tamaño esperado. En el caso de las reacciones múltiplex, todas las muestras negativas deberían producir un producto de la amplificación del tamaño esperado. En algunos casos, las muestras positivas para el nematodo también pueden producir un producto de la amplificación del tamaño esperado con los cebadores de control interno.

La prueba realizada a una muestra se considerará positiva si produce un producto de la amplificación del tamaño correcto.

4.2.7.2 PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real solo se considera válida si:

- el control positivo produce una curva de amplificación con los cebadores específicos del nematodo objetivo
- los controles negativos no producen una curva de amplificación

Si se utilizan cebadores de control interno, el control positivo y todas las muestras de la prueba deberían producir una curva de amplificación.

4.2.8 Secuenciación

Se han secuenciado directamente varias regiones genómicas de nematodos aislados (secuenciación de especímenes particulares en el caso de Wu *et al.* [2013] o secuenciación poblacional a partir de cultivos sobre hongos en el de Ye *et al.* [2007]) a efectos de la identificación de *B. xylophilus* y de la

diferenciación de las diversas especies de *Bursaphelenchus*. Entre estas regiones se incluyen los espaciadores transcritos internos (ITS-1, ITS-2, 5,8S) del ADNr (Abelleira *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2013) o la región D2–D3 del gen 28S del ARNr (Ye *et al.*, 2007). La región objetivo se amplifica mediante PCR y los amplicones se secuencian directamente o después de ser clonados. A continuación, los datos de las secuencias se pueden analizar con el programa de alineación de secuencias BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), disponible en el Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y compararse con las secuencias de *Bursaphelenchus* disponibles en la base de datos del NCBI (p. ej., los números de accesoión HQ646254 y KC460340 para las regiones ITS mencionadas anteriormente y números AY508105 a AY508109 para la región 28S del ARNr).

Para el gen del ITS, si la divergencia en el alineamiento de las secuencias de pares de bases de la muestra es menor del 2 % respecto de las secuencias conocidas de *B. xylophilus* pero mayor del 2 % con respecto a todas las demás especies, se identifica como *B. xylophilus*. Para el gen 28S, si la divergencia en el alineamiento de las secuencias de pares de bases de la muestra es menor del 0,5 % con respecto a las secuencias conocidas de *B. xylophilus* pero mayor del 0,5 % con respecto a todas las demás especies, se identifica como *B. xylophilus*. Cualquier otro resultado debería investigarse más a fondo.

También se puede utilizar para la identificación de la especie la región correspondiente a la subunidad I de la citocromo oxidasa (COI). En el Q-bank (<http://www.q-bank.eu/Nematodes/>) figura una secuencia de referencia (secuencia Q38) obtenida de material de referencia, y se ofrece orientación sobre la metodología, incluido el programa BLAST.

5. Registros

Los registros y las evidencias deberían conservarse según lo descrito en la Sección 2.5 de la NIMF 27 (*Protocolos de diagnóstico para las plagas reglamentadas*).

En los casos en que los resultados de los diagnósticos puedan afectar negativamente a otras partes contratantes, en particular en casos de incumplimiento (NIMF 13: *Directrices para la notificación del incumplimiento y acción de emergencia*) y en áreas en las que se detecte *B. xylophilus* por primera vez, deberían conservarse por lo menos durante un año, de un modo que garantice su plena rastreabilidad, los siguientes registros y evidencias, así como el material adicional:

- Una muestra de los nematodos, ya sea montada en forma de preparación permanente o fijada con fijador TAF o en una solución de glicerina. En los casos en que se detecte *B. xylophilus* por primera vez en un área, sería útil para investigaciones futuras de la vía el establecimiento de un cultivo de *B. xylophilus* vivos multiplicados en *B. cinerea*. También podrá ser útil conservar

especímenes o ADN para la realización de pruebas moleculares en el futuro, incluso cuando la identificación haya sido morfológica.

- Si la identificación se basó en técnicas moleculares, el ADN extraído se podrá conservar a -20°C y el ARN extraído a -80°C .
- En los casos de presencia de *B. xylophilus* en la madera o en productos derivados de la madera, incluido el embalaje de madera, en lugar de la información geográfica del muestreo se deberían conservar datos relativos al origen, el material (p. ej., madera en rollo, embalaje de madera) y las condiciones de importación (p. ej., la presencia simultánea de escarabajos vectores). Téngase en cuenta que el embalaje de madera no tiene necesariamente el mismo origen que el envío. Según la NIMF 15 (*Reglamentación del embalaje de madera utilizado en el comercio internacional*), el embalaje de madera utilizado en el comercio internacional debería llevar una marca en la cual las dos primeras letras representan el código ISO del país en el que se produjo el embalaje de madera.

6. Puntos de contacto para información adicional

Puede obtenerse información adicional sobre este organismo y sobre este protocolo en las siguientes fuentes:

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

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

ANSES Plant Health Laboratory, 7 rue Jean Dixméras, 49044 Angers Cedex 01, Francia (Geraldine Anthoine; correo electrónico: geraldine.anthoine@anses.fr).

Canadian Forest Service, 506 West Burnside Road, Victoria, BC V8Z 1M5, Canadá (Isabel Leal; correo electrónico: ileal@nrcan.gc.ca).

Canadian Food Inspection Agency, 3851 Fallowfield Road, Ottawa, ON K2H 8P9, Canadá (Fencheng Sun; correo electrónico: sunfc@inspection.gc.ca).

Además de los expertos mencionados arriba, en el Cuadro 3 figura una lista de expertos regionales en este nematodo.

Cuadro 3. Lista de expertos regionales y nacionales en *Bursaphelenchus xylophilus* (no exhaustiva)

Región o país	Información de contacto del experto
África	Forestry and Agricultural Biotechnology Institute (FABI), University of Pretoria, Pretoria 0002, Sudáfrica (Michael J. Wingfield; correo electrónico: mike.wingfield@fabi.up.ac.za)
Australia	CSIRO Ecosystem Sciences-Black Mountain Laboratories, Clunies Ross Street, Black Mountain, ACT 2601, Australia (Mike Hodda; correo electrónico: Mike.Hodda@csiro.au)
China	Department of Forest Protection, Nanjing Forestry University, No. 159 Longpan Road, Nanjing, 210037 China (Boguang Zhao; correo electrónico:) 13505186675@126.com)
Unión Europea	NemaLab-ICAM, Departamento de Biologia, Universidade de Évora, 7002-554 Évora, Portugal (Manuel Mota; correo electrónico: mmota@uevora.pt)
Japón	Forest Pathology Laboratory, Forestry and Forest Products Research Institute, Tsukuba, Ibaraki 305-8687, Japón (Mitsuteru Akiba; correo electrónico: akiban@ffpri.affrc.go.jp)
República de Corea (Corea del Sur)	Division of Forest Insect Pests and Disease, Korea Forest Research Institute, 207 Cheongnyangni 2-dong, Dongdaemun-gu, Seoul 130-712, Corea (ROK) (Hyerim Han; correo electrónico: hrhan@forest.go.kr)

Podrán presentar una solicitud de revisión de un protocolo de diagnóstico las organizaciones nacionales de protección fitosanitaria (ONPF), las organizaciones regionales de protección fitosanitaria (ORPF) o los órganos auxiliares de la Comisión de Medidas Fitosanitarias (CMF) a través de la Secretaría de la CIPF (ippc@fao.org), que a su vez remitirá la solicitud al Grupo técnico sobre protocolos de diagnóstico (GTPD).

7. Agradecimientos

El presente protocolo de diagnóstico fue redactado por Thomas Schröder (JKI, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for National and International Plant Health, Alemania [véase la sección anterior]), Geraldine Anthoine (ANSES Plant Health Laboratory, Francia [véase la sección anterior]), Isabel Leal (Canadian Forest Service, Canadá [véase la sección anterior]), Jianfeng Gu (Technical Center, Ningbo Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, China [véase la sección anterior]) y Fengcheng Sun (Canadian Food Inspection Agency, Canadá [véase la sección anterior]).

Vladimir Gaar (Diagnostic Laboratory, State Phytosanitary Administration, República Checa) y David McNamara (anteriormente funcionario de la OEPP) participaron en una etapa inicial de la redacción del protocolo.

La descripción de la técnica de RFLP de las regiones ITS fue redactada inicialmente por Wolfgang Burgermeister (Institut für Pflanzenvirologie, Mikrobiologie und Biologische Sicherheit, JKI, Alemania). Philippe Castagnone-Sereno (UMR1064 INRA/UNSA/CNRS, Interactions Plantes-Microorganismes et Sante Vegetale, Francia) aportó la descripción inicial del método de identificación de *B. xylophilus* mediante la PCR convencional dirigida al ADN satélite.

El texto del presente protocolo de diagnóstico está basado parcialmente en el protocolo de diagnóstico de la OEPP para *B. xylophilus* (EPPO, 2001, 2013b).

8. Referencias

En el presente anexo se hace referencia a las normas internacionales para medidas fitosanitarias (NIMF). Las NIMF están disponibles en el Portal fitosanitario internacional (PFI):

<https://www.ippc.int/core-activities/standards-setting/ispms>.

Abelleira, A., Picoaga, A., Mansilla, J.P. y 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)*. En *Bestimmungsbücher zur Bodenfauna Europas*, págs. 24-25. Stuttgart (Alemania), Gustav Fischer Verlag. 509 págs.

Baermann, O. 1917. [A simple method of discovering ankylostomo (nematode) larvae in faeces.] *Med. Geneesl. Lab. Weltevreden*, 1917: 41–47 (en alemán).

Barstead, R. J., Kleiman, L. y 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 (Países Bajos), Departamento de Nematología, Universidad de Wageningen. 112 págs. Disponible en https://www.wageningenur.nl/upload_mm/4/e/3/f9618ac5-ac20-41e6-9cf1-c556b15b9fa7_MethodsandTechniquesforNematology.pdf.

Bongers, T. 1989. [*The nematodes of the Netherlands*] (traducido del holandés por J. van de Haar). Wageningen (Países Bajos), Universidad de Agricultura de Wageningen. 83 págs.

Braasch, H. 2001. *Bursaphelenchus* species in conifers in Europe: Distribution and morphological relationships. *EPPO Bulletin*, 31: 127–142.

Braasch, H., Burgermeister, W. y 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. y 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. y 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. y Woldt, E.** 2009. ITS-RFLP analysis, an efficient tool for identification of *Bursaphelenchus* species. *Nematology*, 11: 649–668.
- Burgermeister, W., Metge, K., Braasch, H. y 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. y 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. y 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. First report of pinewood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) in Mexico. *Plant Disease*, 77: 846.
- Dwinell, L. D.** 1997. The pinewood nematode: Regulation and mitigation. *Annual Review of Phytopathology*, 35: 153–166.
- Edwards, O. R. y Linit, M. J.** 1992. Transmission of *Bursaphelenchus xylophilus* through oviposition wounds of *Monochamus carolinensis* (Coleoptera: Cerambycidae). *Journal of Nematology*, 24(1): 133–139.
- EPPO** (Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas). 2001. *Bursaphelenchus xylophilus*. Diagnostics PM 7/4 (1). *EPPO Bulletin*, 31(1): 61–69.
- EPPO** (Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas). 2012. *Bursaphelenchus xylophilus* and its vectors: Procedure for official control. National regulatory control systems PM 9/1 (5). *EPPO Bulletin*, 42(3): 477–485.
- EPPO** (Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas). (2013a). *Diagnostic protocols for regulated pests: Pictorial glossary of morphological terms in nematology*. Documento técnico de la EPPO N.º 1056 (rev. 4). París, EPPO. 21 págs.
- EPPO** (Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas). 2013b. *Bursaphelenchus xylophilus*. Diagnostics PM 7/4 (3). *EPPO Bulletin*, 43(1): 105–118.

- EPPO** (Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas). 2013c. *Nematode extraction*. Diagnostics PM 7/119 (1). *EPPO Bulletin*, 43(3): 471–496.
- EPPO** (Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas). 2014. *Bursaphelenchus xylophilus*. Adición a Diagnostics PM 7/4 (3). *EPPO Bulletin*, 44(1): 105.
- EPPO/CABI**. 1996. *Bursaphelenchus xylophilus*. En I.M. Smith, D.G. McNamara y P.R. Scott, eds. *Quarantine pests for Europe*, 2.^a edición. Wallingford (Reino Unido), CABI. 1425 págs.
- Evans, H. F., McNamara, D. G., Braasch, H., Chadoeuf, J. y 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. y 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. y 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. y 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. Londres, HMSO. 72 págs.
- Gu, J., ed.** 2014. [*Identification of Bursaphelenchus xylophilus and its closely related species.*] Xiamen, China, Xiamen University Press (en chino).
- Gu, J., Wang, J., Braasch, H., Burgermeister, W. y 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. y Miwa, J.** 2008. Embryology and cytology of *Bursaphelenchus xylophilus*. En B.G. Zhao, K. Futai, J.R. Sutherland y Y. Takeuchi, eds. *Pine wilt disease*, págs. 81–104. Tokio, Springer. 459 págs.

- Hopf, A. y Schroeder, T.** 2013. Non vector spread of *Bursaphelenchus xylophilus* via wood chips. En T. Schroeder, ed. Pine Wilt Disease Conference, 15 al 18 de octubre de 2013, Braunschweig (Alemania). *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. y 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. y 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. y 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. y 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. y 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. Tokio, Thomas Company Limited. 302 págs.
- Kondo, E. y Ishibashi, N.** 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. y 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. y 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. y 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. 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. y 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. Informe final del proyecto de investigación FAIR1-CT95-0034 de la UE. 102 págs.
- Mota, M., Braasch, H., Bravo, M. A., Penas, A. C., Burgermeister, W., Metge, K. y Sousa, E.** 1999. First record of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. *Nematology*, 1: 727–734.
- Mota, M. y Vieira, P., eds.** 2004. The pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. Proceedings of an international workshop, Universidad de Évora (Portugal), 20 al 22 de agosto de 2001. *En Nematological monographs and perspectives*, Vol. 1. Leiden (Países Bajos), Brill. 291 págs.
- Mota, M. y Vieira, P., eds.** 2008. *Pine wilt disease: A worldwide threat to forest ecosystems*. Berlin, Springer Verlag. 405 págs.
- 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. y Wergin, W. P.** 1981. On the taxonomy and morphology of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Buhrer, 1934) Nickle (1970). *Journal of Nematology*, 13: 385–392.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. y Hase, T.** 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28: e63.
- Pajares, J. A., Ibeas, F., Diez, J. J. y 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. y 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. y 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: 257–260.
- Ryss, A., Viera, P., Mota, M. y Kulinich, 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. y 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. y 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. y 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. y 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. y 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. y 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. y Filipiak, A.** 2011. *Bursaphelenchus singaporensis* 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. y 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. y 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. y 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. En M.J. Wingfield, ed. *Pathogenicity of the pine wood nematode*. Symposium Series, págs. 81–90. Saint Paul, MN, APS Press. 122 págs.
- Wingfield, M. J., Blanchette, R. A., Nicholls, T. H. y 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. y 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. y 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. y 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. y Takeuchi, Y.** 2008. *Pine wilt disease*. Berlín, Springer. 459 págs.

9. Figuras

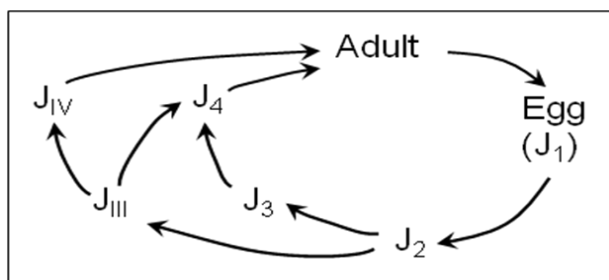


Figura 1. Ciclo biológico de *Bursaphelenchus xylophilus*, del huevo al nematodo adulto.

JX: larva en estadio juvenil X.

Fuente: Modificado de Wingfield et al. (1982).



Figura 2. Evolución de los síntomas del pino (*Pinus pinaster*) infestado por *Bursaphelenchus xylophilus*, de árbol sano a muerto.

Fotografías por gentileza de T. Schröder, Instituto Julius Kühn, Alemania.

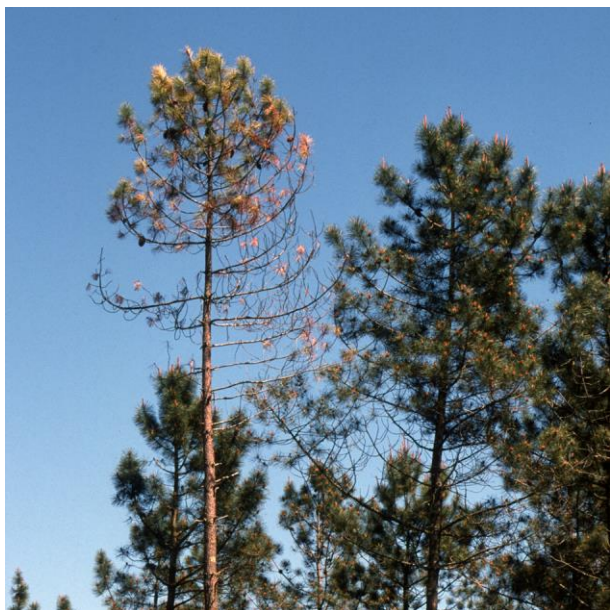


Figura 3. Síntomas del marchitamiento de los pinos causada por *Bursaphelenchus xylophilus* en *Pinus pinaster*. Fotografía por gentileza de T. Schröder, Instituto Julius Kühn, Alemania.

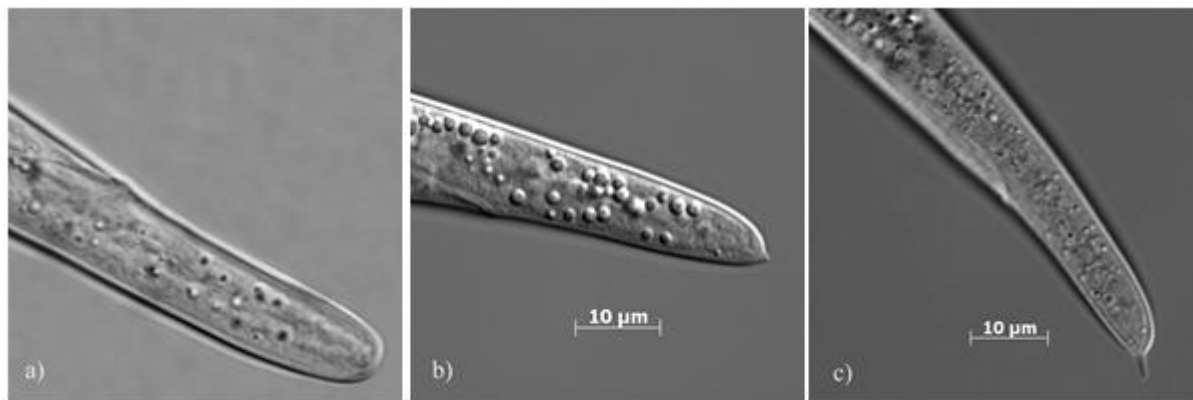


Figura 4. Colas de hembras de *Bursaphelenchus xylophilus*: a) redondeada (aumento de $\times 1\,000$); b) con una pequeña proyección; y c) mucronada.

Fotografía a) por gentileza de T. Schröder, Instituto Julius Kühn, Alemania, y fotografías b) y c) por gentileza de J. Gu, Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau de Ningbo (China).

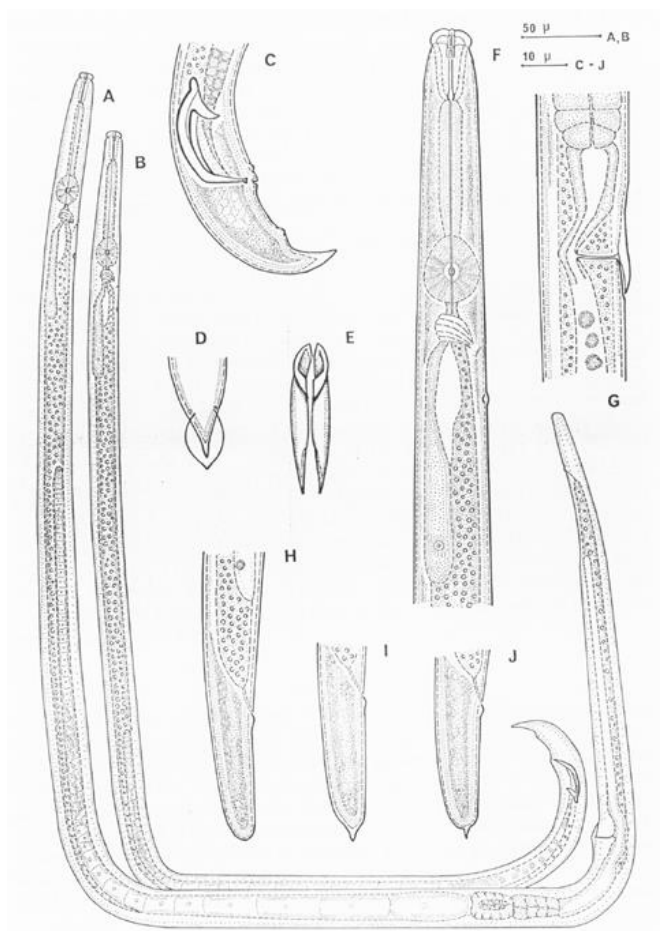


Figura 5. *Bursaphelenchus xylophilus*: A) hembra; B) macho; C) cola del macho; D) vista ventral de la cola del macho, extremo con bursa; E) vista ventral de las espículas; F) hembra, región anterior; G) vulva de la hembra; y H), I) y J) cola de la hembra.

Fuente: Mamiya y Kiyohara (1972).

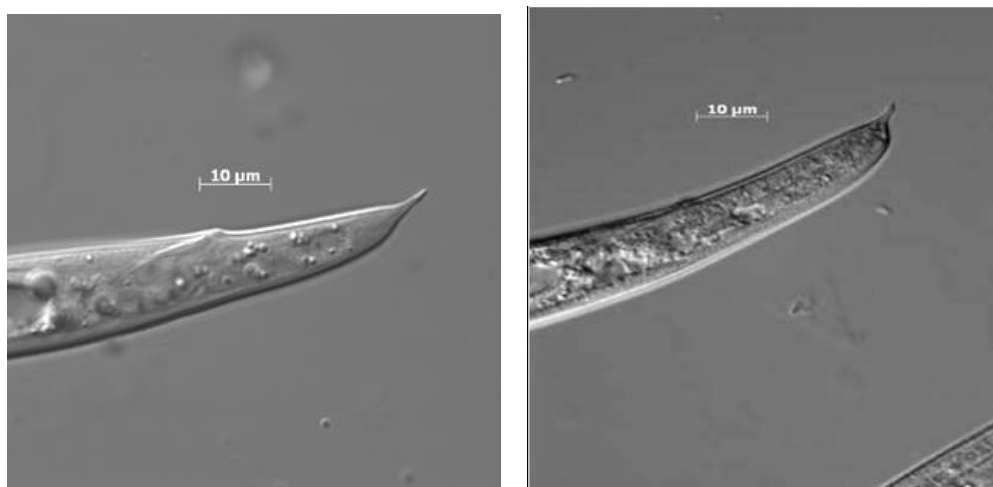


Figura 6. Cola de la hembra de *Bursaphelenchus mucronatus mucronatus* (izquierda) y de *B. mucronatus kolymensis* (derecha).

Fotografías por gentileza de J. Gu, Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau de Ningbo (China).

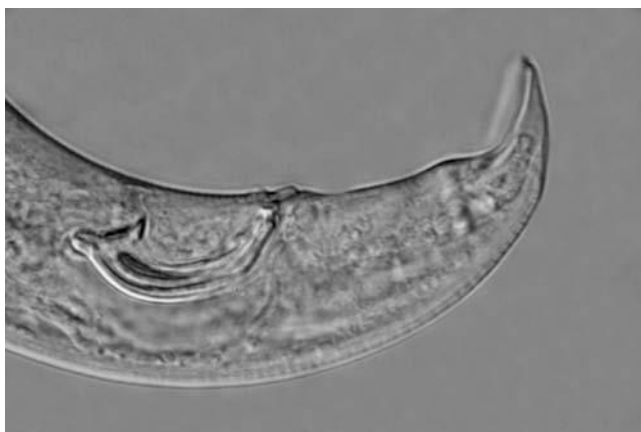


Figura 7. Cola con espículas (aumento de $\times 1\,000$) de macho de *Bursaphelenchus xylophilus*.
Fotografía por gentileza de T. Schröder, Instituto Julius Kühn, Alemania.

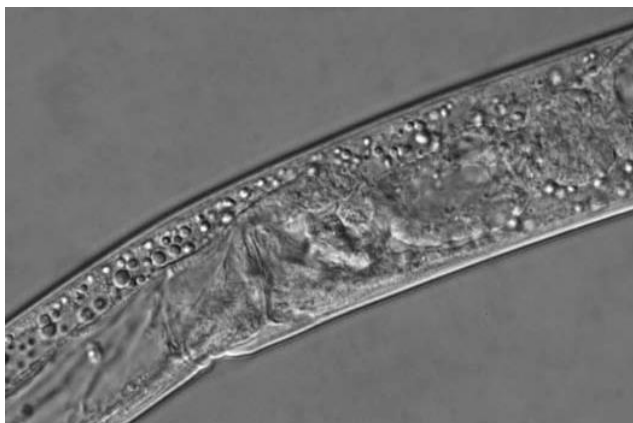


Figura 8. Hembra de *Bursaphelenchus xylophilus* con membrana vulvar (aumento de $\times 640$).
Fotografía por gentileza de T. Schröder, Instituto Julius Kühn, Alemania.

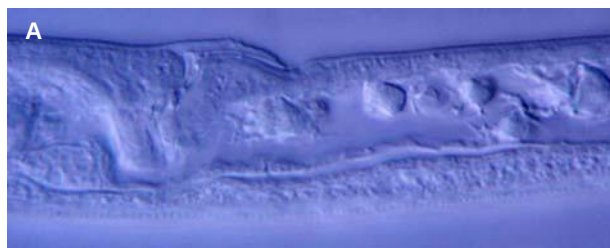


Figura 9. Especies del grupo *xylophilus* que no son *Bursaphelenchus xylophilus*: A) membrana vulvar de hembra, curvada y terminada en un surco profundo y B) cola de hembra de *B. fraudulentus* con una pequeña proyección (izquierda) y sin proyección (derecha) (aumento de $\times 1\,000$).
Fotografías por gentileza de M. Tomalak, Institute of Plant Protection - National Research Institute (Instituto de protección fitosanitaria del Instituto nacional de investigación), Polonia.

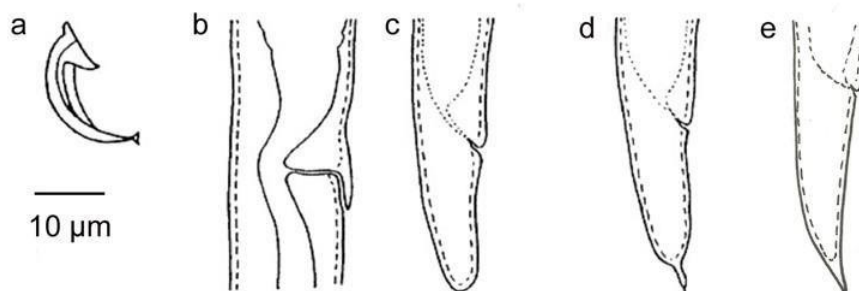


Figura 10. Caracteres de diagnóstico para *Bursaphelenchus xylophilus*, *B. mucronatus mucronatus* y *B. mucronatus kolymensis*: a) espículas de las tres especies; b) membrana vulvar de las tres especies; c) extremo de la cola de la hembra de *B. xylophilus*, forma redondeada; d) extremo de la cola de la hembra de *B. mucronatus kolymensis* y e) extremo de la cola de la hembra de *B. mucronatus mucronatus*.
Fuente: Modificado de EPPO/CABI (1996).

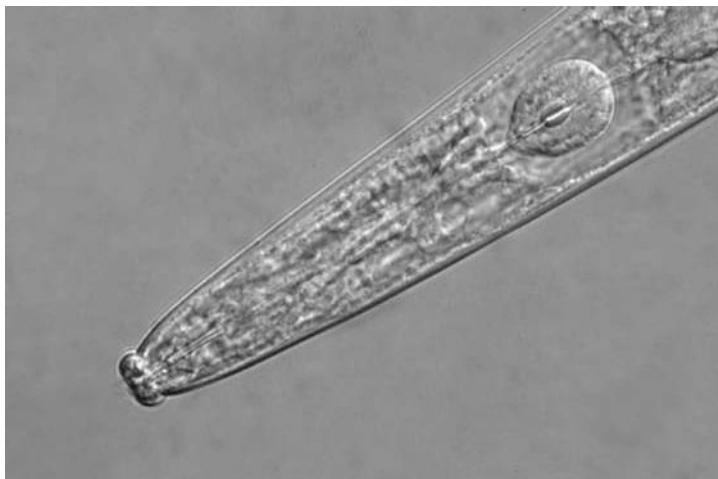


Figura 11. Región anterior de *Bursaphelenchus xylophilus* con estilete y metacarpus (aumento de $\times 640$).
Fotografía por gentileza de T. Schröder, Instituto Julius Kühn, Alemania.

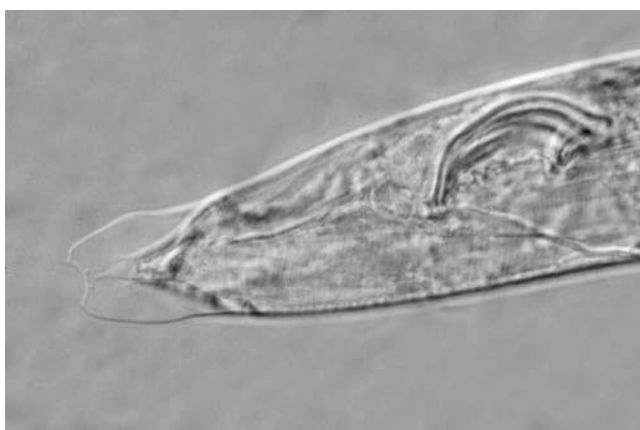


Figura 12. Vista de la cola del macho de *Bursaphelenchus xylophilus* en posición dorsoventral con bursa (aumento de $\times 1\,000$).
Fotografía por gentileza de T. Schröder, Instituto Julius Kühn, Alemania.

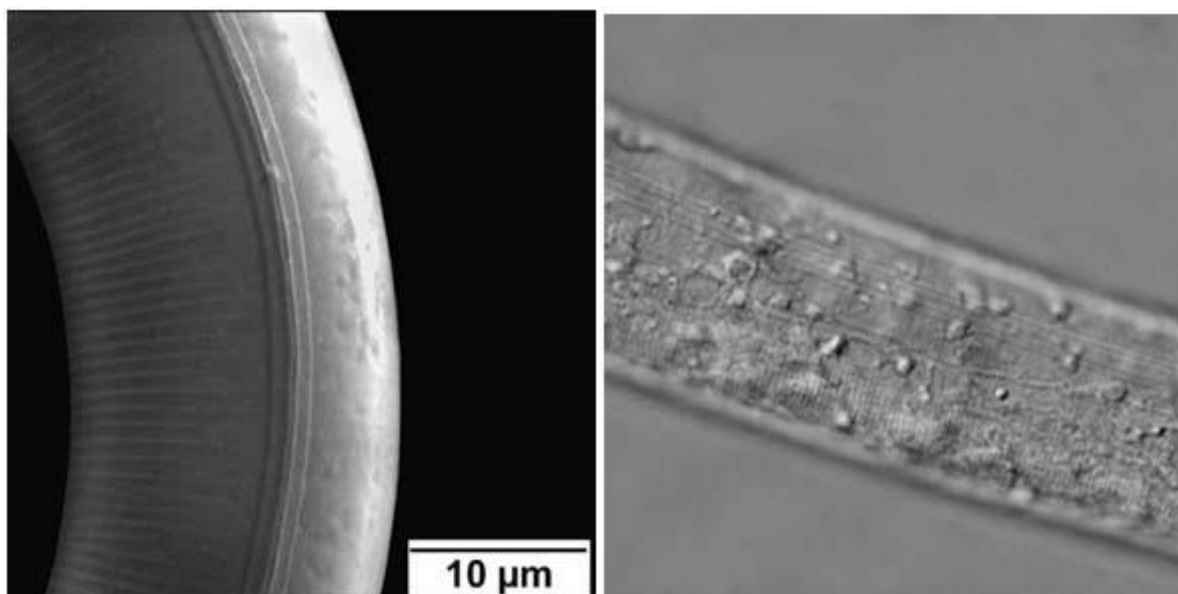


Figura 13. Banda lateral de *Bursaphelenchus xylophilus* vista con microscopio electrónico de barrido (izquierda) y con microscopio óptico (derecha, aumento de $\times 1\,600$).

Fotografía izquierda por gentileza de M. Brandstetter, Centro Austríaco de Investigaciones Forestales, Austria y fotografía derecha por gentileza de T. Schröder, Instituto Julius Kühn, Alemania.

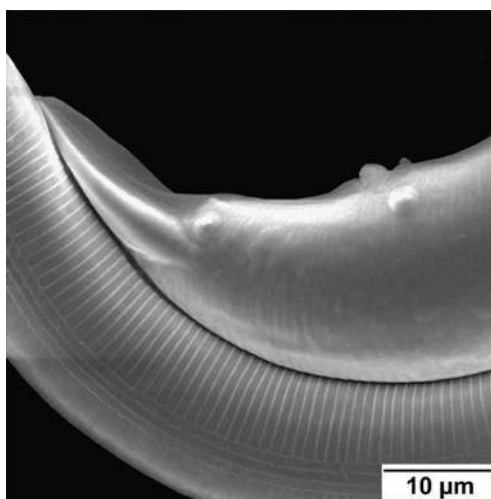


Figura 14. Papilas caudales de *Bursaphelenchus xylophilus*, microfotografía electrónica de barrido.

Fotografía por gentileza de M. Brandstetter, Centro Austríaco de Investigaciones Forestales, Austria.

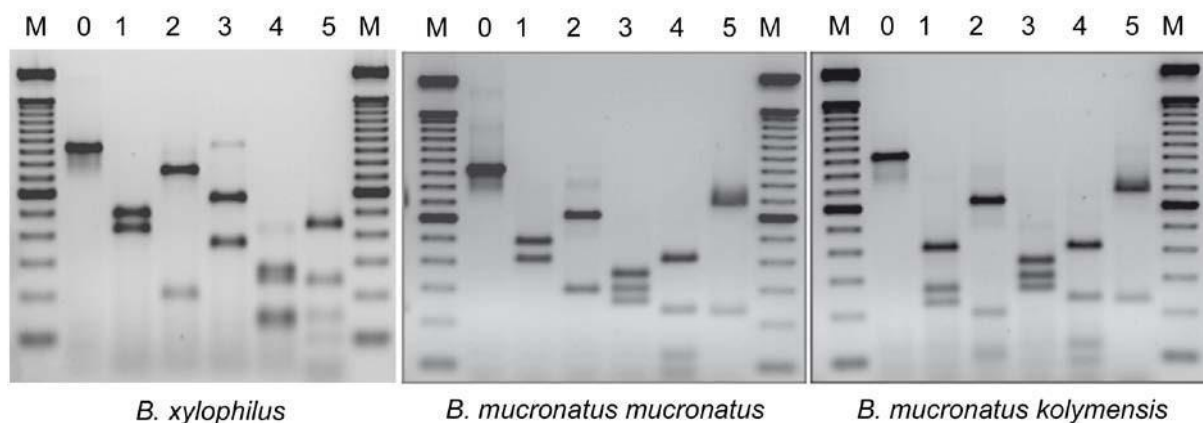


Figura 15. Patrones de polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del espaciador transcrito interno (ITS) de *Bursaphelenchus xylophilus* (izquierda), *B. mucronatus mucronatus* (centro) y *B. mucronatus kolymensis* (derecha). Los fragmentos de restricción se obtuvieron mediante digestión del fragmento de ADNr (ribosómico) amplificado (0) con *RsaI* (1), *HaeIII* (2), *MspI* (3), *HinfI* (4) y *AluI* (5).

M: marcador de ADN (patrón en escalera de 100 pares de bases).

Fotografías por gentileza de W. Burgermeister, Instituto Julius Kühn, Alemania.

Historia de la publicación

Esta no es una parte oficial de la norma.

2004-11: El CN añadió la cuestión: *Bursaphelenchus xylophilus* (2004-016).

2006-04: La CMF-1 (2006) añadió este tema al programa de trabajo: Nematodos (2006-008).

2007-09: El GTPD examinó el proyecto.

2008-06: El GTPD examinó el proyecto con el autor principal.

2013-09: Se creó un nuevo grupo de redacción del PD.

2014-03: Consulta de expertos.

2014-10: El CN aprobó presentar el texto para consulta a los miembros (2014_eSC_Nov_11).

2015-02: Consulta a los miembros.

2015-10: Aprobado por el GTPD y remitido al CN para que adoptara por medios electrónicos, una decisión sobre su adopción (eTPDP_Oct_02).

2015-11: El CN aprobó el período de notificación del PD (2015_eSC_Nov_08).

2016-01: El CN adoptó el PD en nombre de la CMF (no se recibieron objeciones formales).

NIMF 27. Anexo 10. *Bursaphelenchus xylophilus* (2016). Roma, CIPF, FAO.

2018-01: El GRE para el español y el Servicio de Traducción de la FAO revisaron este PD y la Secretaría de la CIPF incorporó las modificaciones conformemente.

2018-04: La CMF-13 (2018) ha tomado nota que el Grupo de Revisión de Idiomas para el español ha revisado este Anexo.

Última actualización de la historia de la publicación: 2018-11.

CIPF

La Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF) es un acuerdo internacional de sanidad vegetal que tiene como objetivo proteger las plantas cultivadas y silvestres previniendo la introducción y propagación de plagas. Los viajes y el comercio internacional hoy son más abundantes que nunca antes. En el desplazamiento de personas y mercancías por todo el mundo, los acompañan organismos que representan riesgos para las plantas.

La organización

- ◆ Hay más de 180 partes contratantes de la CIPF
- ◆ Cada parte contratante tiene una organización nacional de protección fitosanitaria (ONPF) y un contacto oficial de la CIPF
- ◆ Nueve organizaciones regionales de protección fitosanitaria (ORPF) obran para facilitar la aplicación de la CIPF en los países
- ◆ La CIPF se enlaza con las organizaciones internacionales pertinentes a fin de contribuir a la creación de capacidad regional y nacional
- ◆ La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) proporciona la Secretaría de la CIPF

Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF)

Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Roma, Italia

Tel. +39 06 5705 4812

Correo electrónico: ippc@fao.org | Web: www.ippc.int

