



Organisation des Nations Unies
pour l'alimentation
et l'agriculture



Convention internationale pour la protection des végétaux
Protéger les ressources végétales contre les organismes nuisibles

PD 10: *Bursaphelenchus* *xylophilus*

Produit par le Secrétariat de la Convention internationale
pour la protection des végétaux (CIPV)

Cette page est intentionnellement laissée vierge

NIMP 27

Protocoles de diagnostic pour les organismes réglementés

PD 10: *Bursaphelenchus xylophilus*

Adopté en 2016; publié en 2016

TABLE DES MATIÈRES

1.	Informations relatives à l'organisme nuisible	2
2.	Données taxonomiques	3
3.	Détection.....	3
3.1	Détection dans les arbres.....	4
3.2	Détection au moyen de pièges à insectes et de bûches pièges et dans des échantillons provenant de scieries et de dépôts de bois	5
3.3	Détection directe dans le bois, les produits ligneux et les matériaux d'emballage en bois plein	5
3.4	Extraction de nématodes à partir d'échantillons de bois	5
3.5	Extraction des nématodes à partir d'insectes vecteurs	6
4.	Identification.....	7
4.1	Identification morphologique.....	7
4.1.1	Préparation des spécimens	8
4.1.2	Clé d'identification de l'espèce.....	9
4.1.3	Comparaison entre <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> et des espèces similaires.....	13
4.2	Identification moléculaire	14
4.2.1	ITS-PCR PLFR	15
4.2.2	PCR classique.....	17
4.2.3	PCR en temps réel.....	18
4.2.4	Analyses moléculaires fondées sur l'ARN pour la détection de <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> vivants.	20
4.2.5	Analyse LAMP.....	22
4.2.6	Témoins employés dans les analyses moléculaires	23
4.2.7	Interprétation des résultats de la PCR	24
4.2.8	Séquençage.....	24
5.	Données à conserver	25
6.	Points de contact pour tout complément d'informations.....	25
7.	Remerciements	26
8.	Références	27
9.	Figures	32

1. Informations relatives à l'organisme nuisible

Le nématode du bois de pin, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhrer, 1934) Nickle 1970, est l'agent causal du dépérissement du pin. *B. xylophilus* serait originaire d'Amérique du Nord, où il est très répandu au Canada et aux États-Unis (Ryss *et al.*, 2005) et apparemment peu présent au Mexique (Dwinell, 1993). Les espèces de pin d'Amérique du Nord sont résistantes ou au moins tolérantes à *B. xylophilus*, mais les espèces exotiques plantées en Amérique du Nord, notamment dans les zones méridionales des États-Unis où le climat est plus doux, périssent lorsqu'elles sont attaquées par le nématode.

B. xylophilus a pénétré au Japon au début du XX^e siècle, probablement véhiculé par du bois importé d'Amérique du Nord, et est devenu l'un des organismes nuisibles forestiers les plus nocifs du Japon où, aujourd'hui encore, il provoque des dégâts importants dans les peuplements de pins (*Pinus densiflora*, *P. thunbergii* et *P. luchuensis*). *B. xylophilus* a également été introduit en Chine (notamment Taiwan) et en Corée, où sa présence a été découverte pendant la deuxième moitié des années 1980. En 1999, *B. xylophilus* a été observé pour la première fois en Europe (au Portugal) sur *P. pinaster*, qui est tué par le nématode en quelques mois (Mota *et al.*, 1999; Fonseca *et al.*, 2012). *B. xylophilus* a aussi été détecté sur *P. nigra* et *P. radiata* au Portugal et en Espagne, respectivement (Inácio *et al.*, 2014; Zamora *et al.*, 2015). En 2008, *B. xylophilus* a fait son apparition en Espagne (Abelleira *et al.*, 2011).

B. xylophilus est transmis d'un arbre à l'autre par des coléoptères lignicoles du genre *Monochamus* (Coleoptera: Cerambycidae) (Linit, 1990; Evans *et al.*, 1996). Les nématodes pénètrent dans le corps de l'insecte peu après que celui-ci a émergé de la pupaison et juste avant qu'il ne commence à creuser sa galerie de sortie de l'arbre hôte (Wingfield, 1987). Les coléoptères volent vers la cime d'arbres sains et s'y nourrissent de jeunes pousses et de jeunes feuilles (stade de la nutrition de maturation). Puis les insectes s'accouplent et les femelles cherchent, soit un arbre affaibli ou qui vient de mourir, soit des troncs ou de grosses branches (y compris des déchets d'abattage), selon l'espèce de *Monochamus*, et y pondent leurs œufs en transperçant l'écorce. Après leur sortie de l'œuf, les larves de coléoptères se nourrissent pendant plusieurs mois de tissu cambial dans la zone subcorticale. Arrivées à maturité, les larves creusent plus profondément dans le bois pour se métamorphoser, bouclant ainsi leur cycle de développement. *B. xylophilus* tire parti de ce cycle de développement pour se faire transporter vers de nouveaux arbres hôtes (Wingfield, 1987). Son introduction dans le nouvel hôte peut avoir lieu au moment de la ponte du coléoptère (il semble que ce soit le seul mode de transmission de plusieurs espèces de *Bursaphelenchus* qui colonisent les arbres morts) (Edwards et Linit, 1992). *B. xylophilus*, cependant, semble être la seule de ces espèces à pouvoir aussi être transmise à un nouvel arbre lors du stade de la nutrition de maturation des coléoptères, le dépérissement des pins pouvant alors résulter d'une transmission par l'intermédiaire des jeunes pousses (Wingfield, 1987).

Quand *B. xylophilus* est transmis lors de la ponte, les nématodes restent relativement proches du site d'introduction. En revanche, lorsque la transmission passe par les jeunes pousses et que l'arbre succombe au dépérissement des pins, les nématodes se répandent partout dans l'arbre, détruisant les tissus ligneux, notamment les cellules épithéliales, les cellules parenchymateuses des canaux à résine axiaux et radiaux, le cambium et le phloème. On peut aussi trouver *B. xylophilus* dans les racines, même si la partie aérienne de l'arbre est déjà morte, desséchée ou abattue. Le fait qu'un arbre développe ou non la maladie du dépérissement des pins dépend de l'essence de l'arbre (en général, seules les espèces *Pinus* spp. non originaires d'Amérique sont touchées), de son état sanitaire et des conditions climatiques (en particulier la température et l'humidité). Ces facteurs influent aussi sur la répartition des nématodes dans l'arbre qui peut être localisée ou irrégulière, ce dont il faut tenir compte dans les stratégies d'échantillonnage (Schröder *et al.*, 2009).

B. xylophilus peut aussi être présent dans des arbres morts des genres *Abies*, *Chamaecyparis*, *Cedrus*, *Larix*, *Picea* et *Pseudotsuga* ainsi que d'autres conifères (à l'exception de *Thuja* spp.), mais aucun de ces genres n'est connu pour être touché par la maladie du dépérissement des pins, bien que les essais de pathogénicité effectués sur de jeunes plants provoquent des réactions notables, voire la mort (Evans *et al.*, 1996).

B. xylophilus est transporté quasi exclusivement par des espèces de *Monochamus*, lesquelles varient en fonction de la zone géographique; par exemple, *M. alternatus* en Chine et au Japon, *M. saltuarius* au Japon, *M. carolinensis* en Amérique du Nord et *M. galloprovincialis* au Portugal. À l'occasion, on a pu observer d'autres coléoptères de la famille des Cerambycidae ou d'autres Coleoptera transportant sur leur corps des juvéniles «dauer» du nématode, mais rien ne permet d'affirmer qu'ils jouent un rôle de vecteur dans la dissémination du nématode (Evans *et al.*, 1996).

L'activité humaine est connue pour être la principale voie de dispersion de *B. xylophilus* sur de longues distances et *B. xylophilus* et ses vecteurs ont été interceptés à plusieurs reprises dans le contexte du commerce international du bois, des produits ligneux et, surtout, des matériaux d'emballage en bois de conifères plein. En conséquence, le risque de poursuite de la dissémination à l'échelle internationale est élevé.

L'association de *B. xylophilus* et des coléoptères vecteurs constitue le principal risque de dissémination, cependant *B. xylophilus* est susceptible de migrer depuis du bois infesté jusque dans du bois ou des arbres non infestés, dans des circonstances déterminées: contact direct entre le bois infesté et le bois récepteur, teneur élevée en humidité du bois récepteur ou présence de blessures sur les arbres récepteurs (Sousa *et al.*, 2011; Hopf et Schroeder, 2013).

On trouvera des informations plus détaillées sur la biologie de *B. xylophilus*, ses vecteurs, la maladie du dépérissement du pin, la répartition géographique, les incidences commerciales et économiques et les stratégies de lutte, dans les ouvrages exhaustifs suivants: Kishi (1995); Mota et Vieira (2004); Mota et Vieira (2008); Zhao *et al.* (2008).

2. Données taxonomiques

Nom:	<i>Bursaphelenchus xylophilus</i> (Steiner et Buhrer, 1934) Nickle, 1970
Synonymes:	<i>Aphelenchoides xylophilus</i> Steiner et Buhrer, 1934 <i>Paraphelenchoides xylophilus</i> (Steiner et Buhrer, 1934) Haque, 1967 <i>Bursaphelenchus lignicolus</i> Mamiya et Kiyohara, 1972
Classement taxonomique:	Nematoda, Rhabditida, Tylenchina, Aphelenchoidea Aphelenchoididae, Parasitaphelenchinae, <i>Bursaphelenchus</i>
Nom commun:	Nématode du bois de pin, nématode des pins

3. Détection

Le cycle de développement de *B. xylophilus* compte six stades: l'œuf, puis quatre stades juvéniles précédant l'adulte. Le premier stade juvénile (J1) mue en deuxième stade juvénile (J2) à l'intérieur de l'œuf. J2 émerge de l'œuf, et deux autres stades juvéniles (J3 et J4) précèdent l'adulte. Différents types de stades juvéniles apparaissent en fonction des conditions qui prévalent. Quand les conditions sont favorables, avec une température de 25°C, *B. xylophilus* se développe à partir de l'œuf en passant par quatre stades juvéniles de propagation (J1 à J4) pour parvenir au stade adulte en quatre jours (Hasegawa et Miwa, 2008) (Figure 1).

Quand les conditions ne sont pas favorables, le troisième stade juvénile de dispersion (J_{III}) se développe à la place de J3. J_{III} est probablement un stade pendant lequel le juvénile ne s'alimente pas. Des lipides sont accumulés dans ses cellules intestinales (Kondo et Ishibashi, 1978) et il peut survivre dans des conditions défavorables, telles que sécheresse, froid ou manque de nourriture. Normalement, ce stade mue en stade de dispersion J_{IV} (juvénile dauer), lequel est transmis à de nouveaux arbres par les coléoptères vecteurs. Cependant, si les conditions deviennent propices au développement du nématode, par exemple si l'on place les larves J_{III} sur des plaques de cultures fongiques, les nématodes muent en juvéniles de propagation J4 (Wingfield *et al.*, 1982).

Des spécimens vivants de *B. xylophilus* peuvent être observés dans divers types de bois des essences hôtes, notamment: arbres sur pied et chablis, grumes, bois scié, et produits ligneux tels que les matériaux d'emballage en bois de conifère, ou encore sciure, copeaux et particules de bois, déchets ligneux, mobilier non traité et articles artisanaux. On trouvera ci-après des informations précises sur la détection de *B. xylophilus* dans les arbres, le bois et les produits ligneux ainsi que dans les coléoptères qui en sont les vecteurs. Il est essentiel de procéder à un échantillonnage correct pour obtenir du matériel où l'infestation par *B. xylophilus* soit la plus probable, cependant, les indications relatives à l'échantillonnage sortent du cadre du présent protocole. Des indications générales sur l'échantillonnage, s'agissant des espèces européennes de *Monochamus* dans leur rôle de vecteur, ont été publiées par Schröder *et al.* (2009) et par l'Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes (OEPP) (2012).

3.1 Détection dans les arbres

En l'absence d'informations sur la présence éventuelle de *B. xylophilus* dans une zone donnée, l'échantillonnage doit être effectué en priorité sur les arbres situés à proximité de sites à risque élevé; par exemple, ports accueillant des importations en provenance de pays où l'infestation par *B. xylophilus* est connue, aéroports, scieries, installations de transformation du bois, lieux de stockage de bois et zones ayant été touchées par des incendies de forêt (*Monochamus* est attiré par les incendies de forêt).

Pour que la probabilité de détecter *B. xylophilus* dans une zone soit maximale, il est souhaitable de concentrer l'échantillonnage sur les pins mourants ou morts depuis peu (figures 2 et 3), qu'ils soient sur pied ou à l'état de chablis. Les arbres et les déchets de bois issus d'une coupe récente (c'est-à-dire de sites forestiers exploités un ou deux ans auparavant) qui ont été colonisés, après l'abattage, par des coléoptères *Monochamus* peuvent aussi être employés comme matériel d'échantillonnage. Les symptômes à rechercher sont les suivants: coloration anormale (par exemple, jaunissement) des aiguilles, flétrissement, signes tangibles d'attaques d'insectes (par exemple, copeaux de bois sur le sol ou dépassant de fissures de l'écorce, larves à tête aplatie de *Monochamus* sous l'écorce, galeries de surface sous l'écorce avec des trous d'entrée ovales orientés dans l'axe longitudinal du rameau, trous de sortie ronds des adultes), développement fongique de champignons du bleuissement du bois et absence d'écoulement d'oléorésine des blessures. On devrait vérifier la vitesse de l'écoulement d'oléorésine quand les arbres sont encore verts, en détachant une partie de l'écorce de la couche cambiale. Un arbre sain recouvrira la surface du bois avec de la résine en moins d'une heure, tandis qu'un arbre infesté produira un écoulement de résine faible, voire nul. Cependant, ces symptômes varient selon les essences de pin et ne sont pas propres à *B. xylophilus* car ils peuvent être causés par d'autres agents pathogènes ou par des facteurs physiques. À l'heure actuelle, aucune méthode ne permet de distinguer visuellement des arbres mourant de dépérissement du pin et des arbres mourant pour d'autres raisons. Il serait préférable que les arbres à échantillonner soient associés à une attaque de *Monochamus* aux stades de la nutrition de maturation ou de la reproduction et sinon, au minimum, il faudrait que la présence d'espèces de *Monochamus* dans la zone où les échantillons seront prélevés soit connue.

Les nématodes peuvent avoir une répartition très localisée à l'intérieur de l'arbre, en particulier peu après leur introduction, que ce soit par ponte ou au cours de la nutrition de maturation du coléoptère vecteur. En cas de maladie du flétrissement du pin, les nématodes peuvent se diffuser rapidement pour se multiplier abondamment dans toutes les parties de l'arbre, à l'exception des aiguilles, des cônes et des graines. *B. xylophilus* envahit aussi le système racinaire et est capable d'y survivre pendant un certain temps alors que l'arbre est déjà mort et sec ou qu'il a été abattu. Cependant, dans des arbres peu sensibles, en cas de conditions climatiques défavorables ou à certains stades physiologiques de l'arbre, l'attaque de *B. xylophilus* peut rester limitée du point de vue de la répartition à l'intérieur de l'arbre; par exemple, il est possible qu'une infestation de *B. xylophilus* soit déjà établie dans la couronne, ou certaines zones de la couronne, et qu'elle n'ait pas gagné d'autres parties de l'arbre.

3.2 Détection au moyen de pièges à insectes et de bûches pièges et dans des échantillons provenant de scieries et de dépôts de bois

Des pièges à insectes dotés de leurres attirant les espèces de *Monochamus* ont été mis au point ces dernières années et peuvent également être employés à des fins de surveillance (Sanchez-Husillos *et al.*, 2015). Quand les pièges à *Monochamus* sont employés pour recueillir des coléoptères qui serviront à la détection d'une infestation potentielle de *B. xylophilus*, il faut que les coléoptères soient capturés vivants et non placés dans un liquide létal.

Dans les zones où l'existence d'une population de coléoptères *Monochamus* est connue, les bûches coupées pendant la période de vol des coléoptères peuvent tenir lieu de bûches pièges. Les coléoptères prêts à pondre sont attirés par ces bûches et il a été démontré que la transmission du nématode se produirait à la faveur de la ponte (Dwinell, 1997; Luzzi *et al.*, 1984). On peut prélever des échantillons de bois ou de coléoptères émergents pour surveiller la présence de *B. xylophilus* dans une zone circonscrite. Les coléoptères peuvent achever leur cycle de développement sur ce type de substrat. Il est également possible d'accélérer le développement des coléoptères en apportant les bûches pièges au laboratoire en automne: les coléoptères émergeront plusieurs semaines avant le moment auquel ils auraient émergé dans la nature.

La collecte d'échantillons de bois, de copeaux ou d'éclats de bois provenant de scieries et de dépôts de bois est susceptible d'être plus fructueuse que le prélèvement d'échantillons issus d'arbres sur pied. Ces types d'échantillons peuvent provenir d'une très vaste zone, parce que les grandes scieries se procurent leur bois parfois très loin et travaillent du bois d'origine nationale et du bois importé. Le revers de la médaille est qu'il peut s'avérer difficile d'établir une corrélation entre un échantillon positif et la zone d'origine.

3.3 Détection directe dans le bois, les produits ligneux et les matériaux d'emballage en bois plein

Il est possible de prélever des échantillons sur tous types de bois de conifère, notamment les matériaux d'emballage en bois plein, qui proviennent en particulier de pays où *B. xylophilus* est présent, au moyen d'une perceuse à basse vitesse, d'une tarière, d'une scie, d'une hache, d'un crochet, etc. Le prélèvement d'échantillons devrait être concentré sur les pièces présentant des trous de larves circulaires (c'est-à-dire les trous de sortie des coléoptères) ainsi que des trous d'entrée ovales et des galeries larvaires, parfois comblées par des particules de bois. On peut enlever l'écorce quand il y en a pour détecter plus facilement les galeries. S'agissant de bois scié, normalement on ne verra pas de trous de sortie mais on pourra observer des galeries larvaires, parfois difficiles à déceler parce que comblées par des copeaux. Des prélèvements d'échantillons devraient être faits sur les pièces présentant un développement fongique, notamment de champignons du bleuissement. Quoi qu'il en soit, plusieurs interceptions ont montré que des spécimens vivants de *B. xylophilus* pouvaient être détectés dans des échantillons, sans que les indications susmentionnées aient été suivies (OEPP, 2012).

Les emballages en bois plein (par exemple, les palettes) peuvent entrer en contact avec le sol pendant leur utilisation. Ce contact est susceptible d'aboutir à une contamination superficielle par de la terre et des nématodes terricoles capables de survivre à la dessiccation. Pour éviter que ces nématodes ne contaminent l'échantillon de bois prélevé, il faudrait examiner celui-ci après élimination de la partie externe du bois (Schröder *et al.*, 2009).

3.4 Extraction de nématodes à partir d'échantillons de bois

Des nématodes vivants peuvent être extraits de bois infesté au moyen de la technique de l'entonnoir de Baermann ou de la technique de l'entonnoir de Baermann modifiée (Penas *et al.*, 2002; OEPP, 2013c). Dans le cas de la technique de l'entonnoir de Baermann, un entonnoir en verre ou en plastique dont le tube étroit est obturé à la base par un tuyau en caoutchouc et une pince de serrage, est rempli d'eau. L'échantillon consistant en petits morceaux ou en copeaux de bois est posé sur un tamis dans l'entonnoir. On place un papier filtre laissant passer les nématodes sur le tamis afin d'éviter la contamination de l'eau par des débris de bois. De l'eau est versée dans l'entonnoir de manière à recouvrir l'échantillon.

L'échantillon est laissé de 24 à 48 heures à température ambiante ou dans un incubateur (dans les deux cas, à environ 25°C). Pendant ce laps de temps, les nématodes migrent du bois dans l'eau et tombent à la base de l'entonnoir où on peut les recueillir en relâchant une faible quantité d'eau (approximativement 10 ml) dans une petite boîte.

Le principe décrit ci-dessus constitue la base de la technique de l'entonnoir de Baermann mais, dans la pratique, plusieurs modifications sont apportées (OEPP, 2013c). Par exemple, les copeaux de bois peuvent être directement immergés dans l'eau ou bien être placés sur un filtre en coton hydrophile déposé dans une corbeille en plastique d'extraction de nématodes. De plus, chacune des méthodes décrites dans OEPP (2013c) peut être associée à l'emploi d'un appareil brumisateur.

Sous une loupe binoculaire et à l'aide d'une pipette ou d'une aiguille, on peut prélever les nématodes dans la petite boîte de Pétri et les placer sur une lame en verre pour les examiner avec un microscope à fort grossissement.

Il arrive que les nématodes soient présents en très petit nombre dans l'échantillon, de sorte que la détection risque d'être difficile. Il est recommandé de laisser les nématodes se multiplier avant l'extraction. À cet effet, l'échantillon de bois humidifié et dépouillé de tout fragment d'écorce est placé à l'intérieur d'un sachet en plastique hermétique et mis à incuber à environ 25°C pendant deux à trois semaines. Les nématodes sont alors extraits au moyen de la technique de l'entonnoir de Baermann.

Le principe de la technique de l'entonnoir de Baermann consiste à détecter les nématodes vivants quand ils sortent de l'échantillon de bois mais, pendant la période de 24 à 48 heures recommandée, certains nématodes meurent (Baermann, 1917). Cependant, on peut être sûr qu'ils étaient vivants au début du processus d'extraction. C'est un point qu'il convient de garder présent à l'esprit quand on procède à l'analyse de matériel ligneux importé. Certaines autres méthodes d'extraction – par exemple, une méthode de centrifugation (non décrite ici; beaucoup plus rapide que la technique de l'entonnoir de Baermann) – entraîneront aussi l'extraction de nématodes qui étaient déjà morts dans le bois (Moen, 2000). La méthode de centrifugation peut être employée pour surveiller une zone infestée par *B. xylophilus* mais pas pour démontrer la réussite d'un traitement phytosanitaire sur du bois (Moen, 2000).

3.5 Extraction des nématodes à partir d'insectes vecteurs

Des coléoptères du genre *Monochamus* capturés au moyen de pièges (Pajares *et al.*, 2004; Ibeas *et al.*, 2007) ou de bûches pièges, peuvent être examinés aux fins de la détection du nématode (section 3.2). Les insectes doivent être capturés vivants et ne pas être placés dans un liquide létal, à moins qu'ils ne soient destinés à une détection moléculaire directe.

Les juvéniles de nématodes sont généralement présents au stade de dispersion J_{IV} (juvéniles d'adulte) dans la trachée et sur le corps des coléoptères. Les juvéniles d'adulte J_{IV} sont dépourvus de stylet. Pour isoler les nématodes, on dissèque les coléoptères et on les broie dans un conteneur adapté, puis on les conserve dans l'eau pendant 24 à 48 heures à environ 25°C (Sousa *et al.*, 2001; OEPP, 2013c). Les juvéniles d'adulte migreront hors des coléoptères. Les juvéniles d'adulte J_{IV} doivent être transférées sur des «nattes» fongiques de *Botryotinia fuckeliana* (anamorphe: *Botrytis cinerea*) cultivées sur gélose à l'extrait de malt (partie 4.1.1), afin que les juvéniles entrent dans le cycle de développement de propagation, car la suite de l'identification morphologique ne peut être effectuée que sur des nématodes adultes. Une autre méthode consiste à soumettre directement les juvéniles à une identification moléculaire. La technique de l'entonnoir de Baermann peut également être utilisée pour extraire les nématodes des coléoptères.

Les nématodes extraits de bois ou d'insectes vecteurs, comme décrit plus haut, peuvent faire l'objet d'un examen morphologique, à moins qu'une analyse moléculaire permettant de détecter *B. xylophilus* puisse être réalisée directement sur les extraits. Le document OEPP (2013b) rend compte d'une procédure de détermination fondée sur une méthode d'extraction de Baermann modifiée, suivie d'une amplification en chaîne par polymérase (PCR) en temps réel (adapté de François *et al.*, 2007).

Plusieurs rapports font également état de méthodes de détection moléculaire, dans le cadre desquelles l'ADN de *B. xylophilus* est extrait directement du bois avant d'être soumis à une amplification (Takeuchi *et al.*, 2005; François *et al.*, 2007; Kikuchi *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2011; Kanetani *et al.*, 2011; Cardoso *et al.*, 2012). Cependant, selon ces rapports, la quantité de bois employée pour extraire l'ADN varie de 5 à 120 mg, ce qui est très peu comparé à la taille des échantillons de bois qui sont habituellement analysés. De plus, cette approche de détection directe par analyse moléculaire conduit à détecter tout nématode ciblé, qu'il soit vivant ou mort. En conséquence, les utilisateurs de cette approche devraient avoir défini des procédures à suivre pour confirmer la présence de nématodes vivants dans l'échantillon, si cette confirmation est nécessaire aux fins de l'analyse.

4. Identification

À ce jour, quelque 110 espèces du genre *Bursaphelenchus* ont été décrites (Futai, 2013). On trouvera les inventaires les plus récents chez Ryss *et al.* (2005), Hunt (2008), Braasch *et al.* (2009) et Futai (2013). *B. xylophilus* peut donner lieu à une identification avec l'une ou l'autre des deux méthodes suivantes: celle qui repose sur les caractéristiques morphologiques et celle qui repose sur les techniques de biologie moléculaire. Le nombre d'espèces de *Bursaphelenchus* décrites ces dernières années a augmenté et certaines espèces ont des caractères morphologiques analogues cependant, une détermination fondée sur la morphologie est possible dans la plupart des cas. L'identification morphologique de la forme mucronée de *B. xylophilus* peut toutefois s'avérer difficile.

L'identification fondée sur les caractères morphologiques suppose la préparation de lames de microscope de bonne qualité, l'accès à un microscope de forte puissance et une expérience considérable en matière de taxonomie des nématodes, notamment au sein du petit groupe d'espèces étroitement apparentées à *B. xylophilus* (*B. mucronatus mucronatus*, *B. mucronatus kolymensis*, *B. fraudulentus* et d'autres). Les méthodes d'identification fondées sur la biologie moléculaire demandent un matériel et des réactifs onéreux, mais moins d'expérience technique (et très peu de connaissances sur les nématodes). Une expérience suffisante est toutefois nécessaire pour faire en sorte de ne pas gaspiller la quantité limitée de matériel de nématode pendant la procédure. Alors que l'identification morphologique doit être réalisée sur des spécimens adultes, l'identification moléculaire peut être effectuée même dans les cas où seuls des stades juvéniles ou des adultes d'un seul sexe sont disponibles, ce qui constitue un avantage. Les méthodes PCR fondées sur l'ADN ne permettent pas de différencier les nématodes morts et les nématodes vivants, mais de nouvelles méthodes fondées sur l'ARN messager (ARNm) peuvent permettre de préciser si la détection est due, oui ou non, à des nématodes vivants (Leal *et al.*, 2013).

Si les spécimens disponibles sont des adultes mâles et femelles en bonne condition, *B. xylophilus* peut être identifié au moyen des caractéristiques morphologiques, soit par un nématologiste, soit par un phytopathologiste chevronné ayant des connaissances en nématologie. Cependant, dans certaines situations, il est recommandé d'associer les caractéristiques morphologiques aux données moléculaires pour améliorer le niveau de certitude de l'identification; par exemple, quand *B. xylophilus* a été détecté dans une nouvelle zone, quand *B. xylophilus* a été observé par un laboratoire pour la première fois, auquel cas le contrôle constitue une assurance qualité visant la conformité avec les systèmes de certification, et quand *B. xylophilus* est trouvé dans des envois pendant l'inspection à l'importation, en particulier si le pays exportateur a été déclaré exempt de *B. xylophilus*. De plus, *B. xylophilus* peut présenter des variations morphologiques susceptibles de rendre nécessaire le recours aux techniques de biologie moléculaire; par exemple, s'agissant de l'extrémité de la queue des femelles qui peut être arrondie ou mucronée (Figure 4), ou s'agissant de la position du pore excréteur. Quand seul un petit nombre de nématodes a été isolé, il est recommandé de les multiplier sur *B. fuckeliana* avant de procéder à l'identification, afin de disposer de suffisamment de matériel pour rendre l'identification fiable (section 4.1.1).

4.1 Identification morphologique

De nombreuses espèces de nématodes peuvent être présentes dans un extrait aqueux de bois de conifère, en particulier si la putréfaction des tissus a commencé. Certaines de ces espèces seront saprophages et les spécimens adultes seront dépourvus du stylet dont la présence est typique chez les nématodes

appartenant aux ordres Tylenchida, Aphelenchida et Dorylaimida. Les espèces *Bursaphelenchus* appartiennent aux Aphelenchida, chez qui la glande pharyngienne dorsale débouche dans le bulbe médian, alors que chez les Tylenchida, la glande débouche dans la cavité du pharynx entre le bulbe et le stylet (Figure 4). Si l'extrait ne contient que des juvéniles, il ne sera pas possible de procéder à l'identification morphologique de *B. xylophilus*. Dans ce cas, les juvéniles des espèces d'aphelenchoides dont la taille correspond à la fourchette de taille des juvéniles de *B. xylophilus* (voir, par exemple, Penas *et al.*, 2008) devraient être séparées et, soit être multipliées sur une plaque de culture, soit être directement soumises à une identification moléculaire.

Pour une identification au microscope optique, un grossissement de 400× à 1 000× (objectif à immersion dans l'huile) est recommandé. Le contraste interférentiel différentiel est susceptible de faciliter l'observation.

4.1.1 Préparation des spécimens

Il peut s'avérer nécessaire de multiplier les nématodes extraits afin de disposer de suffisamment de matériel pour procéder à l'identification. La plupart des espèces de *Bursaphelenchus* peuvent être cultivées sur la forme sporulante du champignon *B. fuckeliana*. Certaines espèces, notamment celles qui appartiennent au groupe des *sexdentati*, doivent être cultivées sur la forme non sporulante. Les deux formes sont cultivées sur de la gélose contenant 2% d'extrait de malt (milieu MEA) (15 g d'agar-agar, 15 g d'extrait de malt, 750 ml d'eau; pH 7,0). 25 ml de milieu MEA stérilisé sont versés dans des boîtes de Pétri (de 90 mm de diamètre). Puis, soit des spores fongiques, soit des fragments de gélose associés à une culture fongique sont placés dans les boîtes de Pétri sur une paillasse propre. Il est recommandé de faire incuber les cultures fongiques à la température ambiante (environ 25°C). Les nématodes à multiplier sont transférés à l'aide d'une pipette ou par d'autres moyens dans une petite goutte qui est déposée sur le mycélium. Il est recommandé de faire incuber les nématodes à environ 25°C (compte tenu de la biologie du nématode), température qui garantit un taux de reproduction suffisant pour obtenir un nombre convenable de spécimens adultes et de juvéniles.

4.1.1.1 Préparations temporaires

Les montages temporaires, permettant une identification rapide ou une étude des caractéristiques plus faciles à observer chez des spécimens non fixés, sont préparés comme suit. Des spécimens vivants sont transférés dans une petite goutte d'eau sur une lame en verre. La lame est brièvement chauffée sur une lampe à alcool, en même temps que l'on contrôle fréquemment l'activité des nématodes. Le chauffage devrait cesser dès que les spécimens cessent de se mouvoir. Une lamelle est appliquée et la lame est prête à être examinée. Il est recommandé de ne pas fixer la lamelle car il peut s'avérer nécessaire de déplacer ensuite les corps des nématodes mâles pour les mettre en position dorso-ventrale, afin que l'on puisse observer la bourse.

4.1.1.2 Préparations permanentes

Les préparations permanentes destinées à l'identification au microscope optique sont réalisées comme suit. Les nématodes vivants extraits de matériel végétal ou d'un élevage de nématodes sont tués par une chaleur modérée, fixés dans de l'alcool formolé acétique (fixateur AFA) (35% d'eau distillée, 10% de formol à 40%, 5% d'acide acétique glacial, 50% d'alcool à 95%) (Andrássy, 1984) ou dans un fixateur composé de triéthanolamine et de formol (fixateur TAF) (7 ml de formol (à 40% de formaldéhyde), 2 ml de triéthanolamine, 91 ml d'eau distillée), transférés dans de la glycérine anhydre (pour une conservation de longue durée) et montés sur des lames dans de la glycérine anhydre, selon la description de Seinhorst (1959) et Goodey (1963). Une méthode plus rapide (1 heure à 1 heure et demie) de préparation de lames permanentes, qui a été décrite par Ryss (2003), repose sur l'emploi d'une solution chaude de formaldéhyde à 4% pour tuer les nématodes. La fixation est alors effectuée à différentes températures dans une étuve à température programmable, avant le transfert dans la glycérine. On pourra trouver des informations plus détaillées sur la préparation des spécimens de nématodes et des lames permanentes, et notamment des recettes de fixateurs, dans l'ouvrage de van Bezooijen (2006), qui est disponible en ligne gratuitement sur Internet.

4.1.2 Clé d'identification de l'espèce

La clé d'identification ci-après, partiellement reprise de Bongers (1989), est employée pour déterminer la sous-famille des spécimens femelles. La clé de détermination du genre *Bursaphelenchus* au sein de la sous-famille des Parasitaphelenchinae, est adaptée de Hunt (2008). La clé de détermination du groupe *xylophilus* au sein du genre *Bursaphelenchus* est citée de Braasch *et al.* (2009). Sinon, une clé d'identification relativement simple, qui a été établie par consensus dans la région de l'Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes (OEPP) et qui est couramment utilisée, est disponible dans le protocole de diagnostic de *B. xylophilus* élaboré par l'OEPP (OEPP, 2013b).

On trouvera les définitions des termes employés dans les parties ci-après, dans le document de l'OEPP intitulé: *Diagnostic protocols for regulated pests: Pictorial glossary of morphological terms in nematology* (OEPP, 2013a) (Protocoles de diagnostic pour des organismes nuisibles réglementés: glossaire illustré des termes morphologiques en nématologie. En anglais uniquement).

4.1.2.1 Clé d'identification des familles et des sous-familles

1. Nématode avec pièce buccale en forme de pointe de lance ou avec stylet.....2
 - Nématode sans pièce buccale en forme de pointe de lance ni stylet **NEB**
2. Bouche avec stylet de type tylenchide, pharynx avec bulbe médian.....3
 - Bouche avec stylet de type dorylaimide, pharynx cylindrique ou en forme de bouteille, sans bulbe médian **NEB**
3. Bulbe médian présentant des plaques valvulaires4
 - Bulbe médian sans plaque valvulaire apparente..... **NEB**
4. Procorpus (partie antérieure de l'œsophage) clairement séparé du bulbe médian par une constriction5
 - Procorpus et bulbe médian non séparés par une constriction, bulbe basal fortement réduit, cuticule visiblement annelée **NEB**
5. Une seule gonade (vulve postérieure)6
 - Deux gonades **NEB**
6. Région des lèvres dépourvue de soies7
 - Région des lèvres avec soies **NEB**
7. Bulbe médian très musculeux et manifestement bien développé, clairement visible à faible grossissement, ovoïde à rectangulaire arrondi, glande pharyngienne dorsale débouchant dans la cavité du pharynx à l'intérieur du bulbe médian.....8
 - Bulbe médian normal, glande pharyngienne dorsale débouchant dans la cavité du pharynx juste à l'arrière du stylet **NEB**
8. Glandes pharyngiennes recouvrant l'intestin dorsalement9
 - Glandes pharyngiennes à l'intérieur du bulbe adjacent..... **NEB**
9. Extrémité de la queue du mâle enveloppée par un petit rabat de cuticule en forme de bourse (qui ne peut être observé que si le nématode est placé en position dorso-ventrale)10
 - Pas de rabat de cuticule en forme de bourse..... **NEB**
10. Boutons du stylet généralement présents, femelle avec anus..... **Parasitaphelenchinae**

– Boutons du stylet généralement absents, femelle sans anus..... **NEB**

4.1.2.2 Clé de détermination au sein de la sous-famille des *Parasitaphelenchinae*

11. Dans la plupart des espèces, juvéniles d'auver J_{III} et J_{IV} ayant des liens phorétiques avec les insectes; vulve postérieure (généralement située à 60–80% de la longueur du corps); spicules soit partiellement fusionnés soit séparés; queue du mâle fortement incurvée; bourse présente chez la plupart des espèces..... **Bursaphelenchus**

– Larves d'auver J_{IV}; vulve très postérieure (située à 80–90% de la longueur du corps); spicules partiellement fusionnés; queue du mâle peu incurvée; bourse présente..... **NEB**

4.1.2.3 Clé de détermination au sein du genre *Bursaphelenchus*

12. Vulve avec rabat proéminent; spicules longs, fins et semi-circulaires avec lame anguleuse dans le tiers postérieur, capitulum (partie antérieure) aplati avec petit condyle et rostre distinct, cucullus (structure en disque) généralement présent; champ latéral présentant quatre lignes..... **Groupe des xylophilus**

– Caractères différents..... **Non groupe des xylophilus**

4.1.2.4 Clé de détermination au sein du groupe des *xylophilus*

Au sein du groupe des *xylophilus*, la clé de détermination suivante (modifiée selon les indications figurant dans OEPP (2013b, 2014)) peut être employée pour distinguer *B. xylophilus* extrait de bois ou d'écorce, d'autres espèces de *Bursaphelenchus* appartenant au même groupe. On trouvera des informations supplémentaires concernant les autres espèces du groupe des *xylophilus* dans Braasch et Schönfeld (2015). Le groupe des *xylophilus* comprend aussi des espèces qui ne proviennent pas de bois de conifère (par exemple, *B. populi*); celles-ci peuvent être exclues simplement, au moyen de la détermination de l'essence du bois. Le fait d'élever les nématodes sur des plaques gélosées de cultures de champignons peut contribuer à accroître la variabilité de la queue des femelles.

13. Queue de la femelle globalement quasi-cylindrique, avec ou sans mucron (Figures 4 et 5)..... **14**

– Queue de la femelle conique (Figure 6) ou très effilée, avec ou sans mucron..... **Non B. xylophilus**

14. Longueur des spicules <30 µm (du condyle à l'extrémité distale)..... **15**

– Longueur des spicules >30 µm..... **Non B. xylophilus**

15. Spicule avec rostre long et pointu, lames du spicule présentant une incurvation anguleuse (Figures 5 C) et 7)..... **16**

– Spicule avec rostre court et pointu, lames du spicule présentant une incurvation arrondie..... **Non B. xylophilus**

16. Chez la femelle, rabat vulvaire droit, ne finissant pas dans une dépression marquée (Figures 5 G) et 8)..... **17**

– Chez la femelle, rabat vulvaire finissant dans une dépression marquée (Figure 9 A))..... **Non B. xylophilus**

17. Queue de la femelle avec mucron >3 µm (Figures 4 c) et 10 d))..... **18**

– Queue de la femelle sans mucron (Figures 5 H) et 4 a)) et avec ou sans petite projection <2 µm* (Figures 4 b) et 5 I)– J))..... **B. xylophilus (forme à queue arrondie)**

18. Pore excréteur situé au niveau du bulbe médian ou derrière..... **B. mucronatus kolymensis et B. xylophilus (forme mucronée**)**

– Pore excréteur situé avant le bulbe médian **Non *B. xylophilus***

NEB, non espèce de *Bursaphelenchus*.

* Chez certaines populations de *B. fraudulentus*, on peut trouver des femelles dont la queue présente une projection de petite taille, on est même dépourvue de mucron (Figure 9 B)). Si les essences de bois où les nématodes sont présents ne sont pas connues avec certitude (*B. fraudulentus* se développe dans le bois d'arbres à feuillage caduc mais a aussi été observé dans du bois de mélèze, mais non pas dans du bois de pin), une analyse moléculaire est recommandée.

** La forme mucronée de *B. xylophilus* est présente essentiellement en Amérique du Nord et il est recommandé de procéder à des analyses moléculaires (Gu *et al.*, 2011) pour établir une distinction fiable entre cette forme et le «type européen» de *B. mucronatus*, c'est-à-dire *B. mucronatus kolymensis* (Braasch *et al.*, 2011).

Si la position du pore excréteur n'est pas discernable, une identification fondée sur les caractères morphologiques peut être incorrecte. Dans ce cas, des analyses moléculaires devraient être effectuées.

B. xylophilus présente les caractères généraux du genre *Bursaphelenchus* (Nickle, 1970; Hunt 2008): environ 1 mm de longueur, corps fin; région céphalique haute, distinguée du reste du corps par une constriction, et dotée de six lèvres; stylet bien développé, généralement avec petits renflements basaux; bulbe médian bien développé (Figures 11 et 5 F)); extrémité de la queue du mâle fortement incurvée ventralement, de forme conique, avec une petite bourse terminale qui peut être observée dans la position dorso-ventrale (Figure 12); spicules robustes, en forme d'épine de rosier, généralement avec apex et rostre proéminents; gubernaculum absent (Figures 7 et 10); vulve située à 70–80% de la longueur du corps; sac post-utérin bien développé (Figure 5 A)).

La plupart des populations de *B. xylophilus* ont une queue arrondie et peuvent être distinguées des autres espèces de *Bursaphelenchus* par la présence des trois caractères ci-après (Figure 10). 1) Les mâles de *B. xylophilus* (Figure 7) ont des spicules relativement grands, arqués régulièrement, avec un rostre pointu proéminent et un cucullus (structure en disque) à l'extrémité distale des spicules. 2) La queue des femelles est quasi-cylindrique, avec une extrémité plutôt arrondie (Figure 4 a)) normalement dépourvue de mucron (petite projection) mais, occasionnellement, des femelles de populations à queue arrondie présentent à l'extrémité de la queue un mucron dont la taille est généralement inférieure à 2 µm (Figure 4 b)). 3) La vulve présente une lèvre antérieure longue et couvrante (Figure 8).

Cependant, les femelles des populations mucronées présentent généralement un mucron (1,5–4,2 µm) à l'extrémité de la queue (Figure 4 c)).

Les caractères les plus visibles au microscope électronique à balayage sont quatre incisures (Figure 13) sur le champ latéral et, chez les mâles, le nombre et la position des papilles caudales (Figure 14): une paire ad-anale juste avant l'anus, deux paires post-anales juste avant le départ de la bourse, et une unique papille médiane juste pré-anale. Parfois, ces caractères sont à peine visibles au microscope optique. Les figures 13 et 14 sont des micrographies électroniques illustrant ces deux caractères, parce que ceux-ci sont mentionnés dans la partie 4.1.3 comme déterminant le classement des espèces *Bursaphelenchus* dans le groupe des *xylophilus*.

Le Tableau 1 présente des mesures des caractères morphologiques de *B. xylophilus*.

Tableau 1. Mesures (moyenne, et fourchette de valeurs entre parenthèses) des caractères de *Bursaphelenchus xylophilus*

Mâles					
Auteur Caractère	Nickle <i>et al.</i> (1981) (n = 5) (États-Unis) [†]	Mamiya et Kiyohara (1972) (n = 40) (Japon) [†]	Mota <i>et al.</i> (1999) (n = 12) (Portugal) [†]	Penas <i>et al.</i> (2008) (n = 20) (Portugal) [†]	Penas <i>et al.</i> (2008) (n = 20) (Portugal) [‡]
Longueur (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)

Mâles					
Auteur Caractère	Nickle <i>et al.</i> (1981) (<i>n</i> = 5) (États-Unis) [†]	Mamiya et Kiyohara (1972) (<i>n</i> = 40) (Japon) [†]	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) [‡]
a (longueur du corps/diamètre maximal du corps)	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 (longueur du corps/distance entre la valve antérieure et la valve pharyngo- intestinale)	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)
c (longueur du corps/longueur de la queue)	24,4 (21–29)	26,4 (21–31)	28,0 (24–32)	21,6 (19,1–24,6)	26,8 (23,6–31,4)
Stylet, µm	13,3 (12,6–13,8)	14,9 (14–17)	12,6 (11–16)	11,0 (10–14)	14,0 (12–15)
Spicules, 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)

Femelles					
Auteur Caractère	Nickle <i>et al.</i> (1981) (<i>n</i> = 5) (États-Unis) [†]	Mamiya et Kiyohara (1972) (<i>n</i> = 30) (Japon) [†]	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) [‡]
Longueur (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 (longueur du corps/diamètre maximal du corps)	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 (longueur du corps/distance entre la valve antérieure et la	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)

Femelles					
Auteur Caractère	Nickle <i>et al.</i> (1981) (n = 5) (États-Unis) [†]	Mamiya et Kiyohara (1972) (n = 30) (Japon) [†]	Mota <i>et al.</i> (1999) (n = 12) (Portugal) [†]	Penas <i>et al.</i> (2008) (n = 20) (Portugal) [†]	Penas <i>et al.</i> (2008) (n = 20) (Portugal) [‡]
valve pharyngo- intestinale)					
c (longueur du corps/longueur de la queue)	27,2 (23–31)	26,0 (23–32)	26,6 (22–32)	25,4 (20,2–29,0)	28,1 (21,9–34,4)
Stylet, 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)
Position de la vulve (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)

[†] Nématodes extraits d'un substrat hôte naturel.

[‡] Nématodes élevés sur des cultures fongiques pendant un an.

4.1.3 Comparaison entre *Bursaphelenchus xylophilus* et des espèces voisines

Il existe des clés de détermination des différentes espèces de *Bursaphelenchus* (par exemple, Ryss *et al.*, 2005), mais les deux clés qui figurent dans Ryss *et al.* (2005) ont un inconvénient: les premières descriptions des espèces de *Bursaphelenchus* sont incomplètes ou reposent sur un petit nombre de spécimens. Voir Vieira *et al.* (2003) pour les descriptions initiales de 74 espèces de *Bursaphelenchus*.

B. xylophilus correspond à une espèce du groupe des *xylophilus sensu* Braasch (2001). Le nombre d'espèces appartenant à ce groupe fait encore débat chez les taxonomistes, mais au moins 15 espèces ou sous-espèces (en avril 2015) appartiennent au groupe des *xylophilus* si l'on considère le nombre de lignes latérales (Figure 9), le nombre et la position des papilles caudales et les caractéristiques du spicule, et enfin la présence d'un grand rabat vulvaire (Gu *et al.*, 2005; Ryss *et al.*, 2005; Braasch *et al.*, 2009; Braasch et Schönfeld, 2015). Il a été récemment proposé d'ajouter au moins deux espèces de *Bursaphelenchus* (*B. tryphloei* Tomalak et Filipiak, 2011 et *B. masseyi* Tomalak, Worrall et Filipiak, 2013) au groupe des *xylophilus*; cependant, le présent protocole se réfère à la dernière classification de Braasch et Schönfeld (2015), dans laquelle ces espèces ne sont pas considérées comme des membres valides du groupe en raison de la morphologie de leur spicule. En conséquence, les membres du groupe des *xylophilus* sont les suivants:

- *B. xylophilus* (Steiner et Buhrer, 1934) Nickle, 1970;
- *B. fraudulentus* Rühm, 1956 (Goodey, 1960);
- *B. mucronatus mucronatus* (Mamiya et Enda, 1979) Braasch, Gu et Burgermeister, 2011;
- *B. mucronatus kolymensis*, Braasch, Gu et Burgermeister, 2011;
- *B. conicaudatus* Kanzaki, Tsuda et Futai, 2000;
- *B. baujardi* Walia, Negi, Bajaj et Kalia, 2003;
- *B. luxuriosae* Kanzaki et Futai, 2003;
- *B. doui* Braasch, Gu, Burgermeister et Zhang, 2004;
- *B. singaporensis* Gu, Zhang, Braasch et Burgermeister, 2005;
- *B. macromucronatus* Gu, Zheng, Braasch et Burgermeister, 2008;

- *B. populi* Tomalak et Filipiak, 2010;
- *B. paraluxuriosae* Gu, Wang et Braasch, 2012;
- *B. firmiae* Kanzaki, Maehara, Aikawa et Matsumato, 2012;
- *B. koreanus* Gu, Wang et Chen, 2013;
- *B. gillanii* Schönfeld, Braasch, Riedel et Gu, 2013.

L'espèce *B. xylophilus* peut être scindée en deux formes ou populations: la forme à queue arrondie et la forme mucronée (Gu *et al.*, 2011) (Figure 4). Les populations mucronées s'observent essentiellement en Amérique du Nord et sont très semblables à *B. mucronatus kolymensis*.

Les 15 espèces ou sous-espèces du groupe des *xylophilus* peuvent être distinguées de toutes les autres espèces de *Bursaphelenchus* par la forme des spicules du mâle et par la présence chez la femelle d'un rabat vulvaire de forme caractéristique. Pour distinguer *B. xylophilus* des 14 autres espèces du groupe, on peut utiliser la forme de la queue de la femelle (forme quasi-cylindrique à cylindrique avec extrémité généralement arrondie et absence de mucron). On trouvera une clé d'identification détaillée de toutes les espèces du groupe des *xylophilus*, assortie de croquis des principaux caractères, dans Braasch et Schönfeld (2015). Dans toutes les autres espèces du groupe des *xylophilus*, les femelles ont une queue soit conique, soit mucronée. Cependant, il existe en Amérique du Nord quelques rares populations mucronées de *B. xylophilus*, difficiles à différencier sur le plan morphologique des autres espèces mucronées (Figure 4). De plus, les femelles de *B. xylophilus* issues de cultures de laboratoire présentent normalement une queue à extrémité arrondie typique, alors que les souches issues d'arbres infestés ou inoculés artificiellement peuvent compter, outre les femelles à queue arrondie, des femelles dotées de mucrons de longueur variable (Figure 4). On trouvera des informations supplémentaires à ce sujet dans Gu *et al.* (2011).

Les espèces les plus répandues du groupe des *xylophilus* sont *B. mucronatus* et *B. mucronatus kolymensis*. Elles sont réparties dans toute l'Europe et dans toute l'Asie et sont également présentes au Canada (Ryss *et al.*, 2005). C'est pourquoi, il est probable que la différenciation la plus fréquente concernera *B. xylophilus* et *B. mucronatus mucronatus* ou *B. mucronatus kolymensis* (Figures 6 et 10).

Des cultures de référence de 50 espèces de *Bursaphelenchus*, notamment 41 souches de *B. xylophilus* d'origines différentes provenant du monde entier, sont disponibles dans la collection de cultures de *Bursaphelenchus* du Julius Kühn-Institut, Centre fédéral de recherche pour les plantes cultivées, Institut pour la santé nationale et internationale des végétaux de Braunschweig (Allemagne).

4.2 Identification moléculaire

On trouvera dans cette partie des informations sur les analyses moléculaires permettant d'identifier *B. xylophilus* à partir des nématodes isolés. Les analyses sont généralement réalisées à l'issue d'un examen morphologique, dans le but de confirmer les résultats obtenus. Les sous-parties ci-après portent sur différents types d'analyses qui permettent de traiter des questions spécifiques, comme indiqué au début de chaque partie.

Les méthodes d'identification de *B. xylophilus* sont nombreuses. Les analyses moléculaires décrites ci-après sont celles qui sont recommandées au moment de la rédaction du présent protocole. Il est possible d'effectuer d'autres analyses. L'identification moléculaire peut se faire par les méthodes de la PCR classique (partie 4.2.2) ou de la PCR en temps réel (partie 4.2.3). Toutes ces techniques, notamment celles qui utilisent le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (PLFR) des espaceurs intergéniques transcrits (ITS) (section 4.2.1), ont été employées avec succès par des laboratoires du monde entier mais n'ont pas donné lieu, jusqu'à aujourd'hui, à une évaluation dans le cadre d'essais circulaires. Une analyse fondée sur l'amplification isotherme induite par boucle (loop-mediated isothermal amplification [LAMP]) (partie 4.2.5) a été mise au point aux fins de la détection et l'identification directes du nématode ciblé, à partir de bois.

L'approche d'identification moléculaire la plus récente repose sur le séquençage et l'analyse du «code-barres» génétique (partie 4.2.8). Pour mettre en œuvre cette approche, il faut avoir accès à des installations de séquençage et disposer de séquences fiables (telles que celles que l'on trouve dans la Q-bank, (<http://www.q-bank.eu/Nematodes/>), ainsi que de personnel très compétent capable d'analyser les séquences sans risque de produire des résultats erronés.

Quand on fait appel à des techniques moléculaires pour détecter *B. xylophilus* dans des produits ligneux à des fins de quarantaine, il est essentiel de pouvoir distinguer les nématodes vivants et les nématodes morts. Plusieurs traitements phytosanitaires tuent *B. xylophilus* dans le bois, et les méthodes actuelles de détection à partir de l'ADN ne permettent pas d'établir une différence entre un résultat positif dû à la présence de nématodes vivants et un résultat positif dû à des restes d'ADN de nématodes morts. L'emploi de méthodes moléculaires fondées sur l'ARN, qui permettent de distinguer les nématodes vivants et les nématodes morts présents dans le bois, est préférable lorsqu'il est question de réglementation de la quarantaine (Leal *et al.*, 2013) (partie 4.2.4). Ce problème doit être pris en compte quand on choisit la méthode d'extraction du nématode (par exemple, la technique de l'entonnoir de Baermann est fondée sur les nématodes vivants; voir les parties 3.4 et 3.5) et la technique moléculaire de détermination. Dans toute la mesure possible, un résultat positif d'analyse moléculaire devrait être validé par une identification morphologique.

Dans le présent protocole de diagnostic, les méthodes (et notamment la mention des noms commerciaux) sont indiquées telles que publiées, car ce sont elles qui définissent les niveaux de sensibilité, spécificité et/ou reproductibilité initialement obtenus. L'emploi de noms de réactifs, produits chimiques ou matériel dans le présent protocole de diagnostic n'implique aucune approbation de ceux-ci à l'exclusion d'autres qui peuvent aussi convenir. Les procédures de laboratoire présentées dans les protocoles peuvent être adaptées aux normes des divers laboratoires, sous réserve qu'elles soient validées de façon adéquate.

4.2.1 ITS-PCR PLFR

Burgermeister *et al.* (2005, 2009) ont employé une technique ITS-PLFR passant par une étape de PCR, pour différencier *B. xylophilus* de 43 autres espèces de *Bursaphelenchus*. Quasiment toutes les descriptions de nouvelles espèces de *Bursaphelenchus* publiées après 2009 font état de profils ITS-PCR PLFR fondés sur la méthode mise au point par Burgermeister *et al.* (2009). De toutes les techniques moléculaires figurant dans le présent protocole, celle-ci est la technique dont l'efficacité a été démontrée pour la plus large gamme d'espèces de *Bursaphelenchus*.

L'ADN est extrait de nématodes à divers stades de développement (adultes femelles et mâles, juvéniles) au moyen du kit QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen¹). Les échantillons de nématodes (1 à 30 spécimens) sont placés dans des tubes d'Eppendorf¹ contenant 5 µl d'eau, puis congelés à -20°C jusqu'à l'extraction. Avant l'extraction, l'échantillon est décongelé, mélangé à 10 µl de tampon de lyse ATL (Qiagen¹) et homogénéisé dans le tube d'Eppendorf¹ à l'aide d'un micro pilon (Eppendorf¹). Le processus d'extraction de l'ADN est ensuite réalisé selon les recommandations du fabricant (QIAamp DNA Micro Kit Handbook, Qiagen: «Isolation of genomic DNA from tissues»¹), à l'exception des étapes ci-après. À l'étape 4, l'incubation dure 3 heures. À l'étape 12 (élution), 20 µl (extraction à partir d'un seul nématode) à 100 µl (extraction à partir de deux à 30 nématodes) de tampon d'élution AE (Qiagen¹) sont appliqués à la membrane. L'éluat contenant l'ADN extrait est conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

¹ Dans le présent protocole de diagnostic, les méthodes (et notamment la mention des noms commerciaux) sont indiquées telles que publiées, car ce sont elles qui définissent les niveaux de sensibilité, spécificité et/ou reproductibilité initialement obtenus. L'emploi de noms de réactifs, produits chimiques ou matériel dans le présent protocole de diagnostic n'implique aucune approbation de ceux-ci à l'exclusion d'autres qui peuvent aussi convenir. Les procédures de laboratoire présentées dans les protocoles peuvent être adaptées aux normes des divers laboratoires, sous réserve qu'elles soient validées de façon adéquate.

L'analyse ITS-PCR PLFR consiste à soumettre l'ADN extrait à un processus de PCR puis à réaliser une analyse PLFR sur le produit de la PCR. Un segment d'ADN ribosomique (ADNr) du nématode, comprenant les régions ITS1 et ITS2, est amplifié par PCR avec le couple d'amorces suivant:

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

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

Le mélange de réaction pour la PCR (50 µl) contient 0,6 µM de chacune des amorces, 2 U de Taq ADN polymérase (Stratagene¹ ou Fermentas¹), 10 mM de Tris-HCl (pH 8,8), 50 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de désoxynucléotides triphosphates (dNTP) et 2 ng d'ADN matrice. L'amplification est réalisée dans un thermocycleur, dont les paramètres ont été réglés comme suit: dénaturation à 94°C pendant 2,5 minutes, 40 cycles de réaction (94°C pendant 1 minute, 55°C pendant 1 minute et 72°C pendant 2 minutes) et une phase finale d'élongation à 72°C pendant 5 minutes. À l'issue de la PCR, des parties aliquotes de 5 µl du produit de la PCR sont analysées par électrophorèse sur gel. Les parties aliquotes d'ADN amplifié qui conviennent sont digérées avec 3 U des endonucléases de restriction *AluI*, *HaeIII*, *HinfI*, *MspI* et *RsaI*, selon les instructions du fabricant.

B. xylophilus est identifié par les profils des fragments de restriction d'ADN, propres à l'espèce (Figure 15). Le nombre et la taille des fragments de restriction de l'ADN, au moins en ce qui concerne les espèces suivantes de *Bursaphelenchus*, ont été décrits (Gu, 2014): *B. abietinus*, *B. abruptus*, *B. africanus*, *B. anamurius*, *B. andrassyi*, *B. antoniae*, *B. arthuri*, *B. arthuroides*, *B. braaschae*, *B. burgermeisteri*, *B. chengi*, *B. conicaudatus*, *B. corneolus*, *B. doui*, *B. eggersi*, *B. eremus*, *B. fraudulentus*, *B. fuchsi*, *B. fungivorus*, *B. gerberae*, *B. gillanii*, *B. hellenicus*, *B. hildegardae*, *B. hofmanni*, *B. hylobianum*, *B. koreanus*, *B. leoni*, *B. luxuriosae*, *B. macromucronatus*, *B. masseyi*, *B. mucronatus mucronatus* (anciennement type est-asiatique de *B. mucronatus*), *B. mucronatus kolymensis* (anciennement type européen de *B. mucronatus*), *B. obeche*, *B. paraburgeri*, *B. paracorneols*, *B. paraluxuriosae*, *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* et *B. yuyaoensis*.

B. hunanensis et *B. lini* font l'objet d'une proposition de reclassement et n'appartiennent donc plus au genre *Bursaphelenchus*. On trouvera dans Burgermeister *et al.* (2009) un résumé exhaustif des profils et des tailles des fragments d'ADN résultant de l'ITS-PLFR, en ce qui concerne 44 espèces de *Bursaphelenchus*. Le Tableau 2 présente un exemple de différenciation entre espèces, fondée sur les profils des fragments de restriction résultant de l'ITS-PLFR, pour des isolats de *B. xylophilus*, de *B. mucronatus mucronatus* et de *B. mucronatus kolymensis*.

Tableau 2. Profils de polymorphisme de longueur des fragments de restriction (PLFR) de différentes espèces de *Bursaphelenchus*

Espèce	Produit de la PCR (paires de bases)	Fragments de restriction (paires de bases) produits par l'enzyme de restriction				
		<i>RsaI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>MspI</i>	<i>HinfI</i>	<i>AluI</i>
Type est-asiatique de <i>B. mucronatus</i> = <i>B. mucronatus mucronatus</i>	920	486	621	355	408	674
		412	299	302	232	246
		12		263	121	
					86	
					49	
					24	

Espèce	Produit de la PCR (paires de bases)	Fragments de restriction (paires de bases) produits par l'enzyme de restriction				
		<i>RsaI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>MspI</i>	<i>HinfI</i>	<i>AluI</i>
Type européen de <i>B. mucronatus</i> = <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

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

4.2.2 PCR classique

Les analyses PCR suivantes permettent une identification spécifique de l'espèce *B. xylophilus* mais ne permettent pas de déterminer la présence éventuelle d'autres espèces de *Bursaphelenchus*.

4.2.2.1 PCR classique ciblant l'ITS ADNr

Une méthode spécifique pour l'espèce, qui permet d'identifier *B. xylophilus* en ciblant la région ITS1–ITS2 de l'ADNr a été décrite par Matsunaga et Togashi (2004). Cette méthode a été évaluée avec cinq populations japonaises de *B. xylophilus* et quatre populations japonaises de *B. mucronatus*. Le protocole expérimental est le suivant.

Les nématodes sont placés individuellement dans 5 µl de tampon de lyse (50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,2), 2,5 mM de MgCl₂, 0,45% (poids/volume) de Nonidet P-40, 0,45% (poids/volume) de Tween 20, 0,01% (poids/volume) de gélatine et 0,06 mg/ml de protéinase-K) à l'intérieur de tubes de réaction MicroAmp de 0,2 ml (Applied Biosystems¹) et sont soumis à une température inférieure ou égale à –70°C pendant 10 minutes (extraction d'ADN adaptée de Barstead *et al.*, 1991). Après décongélation à température ambiante, la solution d'ADN est chauffée à 60°C pendant 1 heure puis à 95°C pendant 15 minutes. L'extrait d'ADN brut qui en résulte est utilisé comme matrice dans une PCR spécifique. La PCR est effectuée avec le couple d'amorces suivant:

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

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

La PCR est réalisée sur 10 µl de mélange de réaction composé comme suit: l'ADN matrice préalablement préparé (5 µl d'extrait d'ADN brut), 50 mM de KCl, 10 mM de Tris (pH 8,3), 1,5 mM de MgCl₂, 0,001% de gélatine, 200 µM de chaque dNTP, 5 pmol de chaque amorce et 0,25 U de Taq ADN polymérase (AmpliTaq Gold, Applied Biosystems¹), avec un thermocycleur Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystems¹). Une phase de dénaturation à 94°C pendant 5 minutes est suivie de 35 cycles (94°C pendant 30 secondes, 55,9°C pendant 30 secondes et 72°C pendant 1 minute), puis d'une phase finale d'élongation à 72°C pendant 6 minutes.

Cette réaction produit un amplicon d'ADN formé de 557 paires de bases (pb), à partir de tous les isolats de *B. xylophilus* soumis à l'analyse.

4.2.2.2 PCR classique ciblant l'ADN satellite

Une méthode spécifique pour l'espèce, qui permet d'identifier *B. xylophilus* au moyen d'une technique PCR fondée sur l'ADN satellite a été décrite par Castagnone *et al.* (2005). Sa spécificité a été évaluée avec des espèces de *Bursaphelenchus* non ciblées (*B. leoni*, *B. mucronatus* et *B. tusciae*) ainsi qu'avec une population japonaise et deux populations canadiennes de *B. xylophilus*.

L'amplification est effectuée à partir de nématodes individuels, préparés selon une procédure de PCR modifiée tirée de Williams *et al.* (1992). En bref, chaque nématode est transféré dans un tube à PCR et recouvert avec 2,5 µl de tampon de lyse (50 mM de KCl, 10 mM de Tris (pH 8,2), 2,5 mM de MgCl₂, 60 mg/ml de protéinase-K, 0,45% de Nonidet P-40, 0,45% de Tween 20 et 0,01% de gélatine). Les tubes sont soumis à une température de -80°C pendant 45 minutes et immédiatement transférés dans un thermocycleur pour être chauffés à une température de 60°C pendant 60 minutes, puis de 95°C pendant 15 minutes. L'extrait d'ADN brut qui en résulte est utilisé comme matrice dans une PCR spécifique.

Les amorces de PCR utilisées dans la réaction sont conçues pour être proches des deux extrémités de la séquence du monomère de 160 pb de la famille d'ADN satellite caractérisée au préalable chez *B. xylophilus* (Tarès *et al.*, 1993; identifiant 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 est réalisée dans 25 µl de mélange de réaction, composé comme suit: l'ADN matrice préalablement préparé (5 µl d'extrait d'ADN brut), 50 mM de KCl, 10 mM de Tris (pH 8,2), 2,5 mM de MgCl₂, 200 µM de chaque dNTP, 250 ng de chaque amorce et 1 U de Taq ADN polymérase (QBiogene¹). Une phase de dénaturation à 94°C pendant 5 minutes est suivie de 25 cycles (94°C pendant 30 secondes, 64°C pendant 1 minute et 72°C pendant 1 minute), puis d'une phase finale d'élongation à 72°C pendant 5 minutes.

Étant donné qu'il a été démontré que la famille d'ADN satellite était constituée de séquences d'ADN répétées en tandem (Tarès *et al.*, 1993), on obtient l'amplification d'une échelle de multimères du monomère de 160 pb quand le milieu de réaction de la PCR contient de l'ADN de *B. xylophilus* comme matrice. À l'inverse, dans le cas d'autres espèces de *Bursaphelenchus*, aucune amplification n'est détectée, ce qui permet d'obtenir un résultat simple et fiable, à savoir, soit clairement positif, soit clairement négatif, en ce qui concerne *B. xylophilus* (Castagnone *et al.*, 2005).

4.2.3 PCR en temps réel

Des analyses PCR en temps réel peuvent être effectuées aux fins d'une identification spécifique de *B. xylophilus*. En général, ce type d'analyse est plus sensible et demande moins de temps que les techniques PCR classiques décrites dans les parties 4.2.1 et 4.2.2.

4.2.3.1 PCR en temps réel ciblant les séquences d'ADN satellite

Une méthode spécifique pour l'espèce, qui permet d'identifier *B. xylophilus* en utilisant les séquences d'ADN satellite, a été décrite par François *et al.* (2007). Cette méthode est extrêmement sensible puisqu'elle a permis de détecter jusqu'à 1 pg d'ADN génomique et un seul spécimen de nématode, dans des échantillons mixtes où *B. xylophilus* était associé à l'espèce étroitement apparentée *B. mucronatus*, dans la limite de 0,01% et 1% du mélange, respectivement. Cette méthode a aussi permis de détecter *B. xylophilus* directement à partir de 100 mg de bois.

L'ADN est extrait à partir de nématodes isolés provenant de cultures pures, selon une procédure simplifiée décrite précédemment (Castagnone *et al.*, 2005), sous réserve d'une légère modification: le volume de tampon de lyse employé n'est pas constant mais adapté au nombre de nématodes (à savoir, 3 µl pour un à quatre nématodes et 20 µl pour un nombre supérieur de nématodes).

L'extraction d'ADN à partir de bois infesté par *B. xylophilus* est réalisée avec le kit ChargeSwitch genomic DNA Plant Kit (Invitrogen¹). Environ 0,1 g de bois infesté est coupé en petits morceaux et placé à l'intérieur d'un sachet en plastique avec 5 ml de tampon de lyse CST Lysis Buffer contenant 1% de polyvinylpyrrolidone et 20 mM de chlorure de calcium. L'échantillon est légèrement concassé à l'aide d'un marteau, puis 1 ml du liquide de lyse est prélevé et traité selon les instructions du fabricant. En bref, on ajoute 100 µl de dodécylsulfate de sodium dans le liquide de lyse avant de mettre celui-ci à incuber à température ambiante pendant 5 minutes, puis on y verse 400 µl de tampon de précipitation et on procède à une centrifugation à vitesse maximale (environ 18 000 g) pendant 5 minutes. On prélève environ 1 ml de surnageant et on y ajoute 100 µl de détergent CST et 40 µl de billes magnétiques CST. Un PickPen 8-M (Bio-Nobile¹) est employé pour transférer les billes CST et l'ADN qui y est lié, afin de les soumettre à deux étapes de lavage (chacune avec 1 ml de tampon de lavage CST Wash Buffer) avant de les placer dans 150 µl de tampon d'élution CST Elution Buffer versés dans une plaque à puits de 2,2 ml. Les particules magnétiques sont alors éliminées. L'ADN est soit analysé immédiatement, soit conservé à -20°C pour être analysé ultérieurement.

Les amorces et la sonde TaqMan employées dans cette méthode sont les suivantes:

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

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

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

La PCR est réalisée dans un volume total de 25 µl contenant 1 µl d'ADN génomique. Pour chaque réaction, il faut 2,5 µl de tampon de réaction concentré dix fois (10×) (kit qPCR Core Kit, Eurogentec¹), 5 mM de MgCl₂, 200 µM de chaque dNTP, 0,5 U de Taq polymérase (kit qPCR Core Kit¹) et 200 nM de chaque amorce et de la sonde. Les analyses PCR en temps réel sont effectuées dans un thermocycleur DNA Engine Opticon 2 (MJ Research¹). Les paramètres du thermocyclage sont les suivants: 95°C pendant 10 minutes, puis 30 cycles (95°C pendant 15 secondes et 59°C pendant 30 secondes). Les données sont analysées au moyen de la version 3.1 du logiciel Opticon 2 Monitor¹, selon les instructions du fabricant. Les extraits sont analysés non dilués et dilués au 1:10 dans de l'eau exempte de nucléase.

L'analyse PCR en temps réel d'extraits de bois est réalisée avec un thermocycleur SmartCycler II (Cepheid¹). Pour chaque réaction, il faut 0,025 U/µl de Hot Taq (Biogene¹), du tampon PCR 1×, 0,2 mM de chaque dNTP, 5,5 mM de MgCl₂, 5% (poids/volume) de tréhalose, 300 nM de chaque amorce et 100 nM de sonde. Les paramètres du thermocyclage sont les suivants: 95°C pendant 10 minutes, puis 40 cycles comportant deux étapes (95°C pendant 15 secondes et 60°C pendant 1 minute). Les données sont analysées par rapport au seuil par défaut du logiciel du SmartCycler II¹ (30 unités de fluorescence). Les extraits sont analysés non dilués et dilués au 1:10 dans de l'eau exempte de nucléase.

4.2.3.2 Analyse PCR en temps réel ciblant une séquence génique de la protéine de choc thermique hsp70

Une méthode de PCR en temps réel fondée sur un gène de protéine de choc thermique (*hsp70*) a été mise au point par Leal *et al.* (2007). Il a été démontré qu'il s'agissait d'une méthode spécifique pour *B. xylophilus* (elle a fait l'objet d'essais avec cinq isolats de *B. xylophilus*), aucune amplification n'ayant été observée avec sept espèces de *Bursaphelenchus* non ciblées. Cette PCR ciblant le gène de la protéine *hsp70* est suffisamment sensible pour détecter au moins 0,005 ng d'ADN génomique de *B. xylophilus*, ainsi que l'ADN extrait d'un seul spécimen de nématode.

Pour procéder à l'extraction de l'ADN, on emploie la méthode de Burgermeister *et al.* (2005) avec les modifications suivantes: 1) l'échantillon d'homogénat est mis à incuber à 56°C toute la nuit au lieu de 3 heures; 2) l'ARN entraîneur est employé uniquement quand l'ADN est extrait à partir d'un seul nématode; 3) le tampon d'élution (10 mM de Tris-HCl, pH 8,0) est appliqué à la membrane de la mini-colonne puis est mis à incuber pendant 5 minutes avant la centrifugation, pour éluer l'échantillon d'ADN; 4) les extraits d'ADN sont chauffés à 55°C pendant 5 minutes pour éliminer tout résidu d'éthanol susceptible d'influer ensuite sur la mesure de la quantité et de la qualité de l'ADN et sur

l'amplification PCR; et 5) les échantillons sont élués dans 30 µl (s'agissant d'un seul nématode) ou dans 50 µl (s'agissant d'échantillons contenant plus d'un seul nématode).

Les amorces et la sonde TaqMan employées dans le cadre de cette méthode sont les suivantes (les lettres en caractères minuscules indiquent les acides nucléiques verrouillés):

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

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

Sonde TaqMan à double étiquette BxLNAP: 5'-FAM-AtT GgC CGC AAA TtC GaT GAa CC-IAbkFQ-3'

La PCR est réalisée sur 20 µl de mélange de réaction, composé comme suit: 5 µl de matrice, 50 mM de Tris (pH 8,3), 0,25 mg/ml d'albumine sérique bovine (ASB) non acétylée (Sigma¹), 0,1 µM de sonde, 0,7 µM d'amorce sens, 0,5 µM d'amorce antisens, 0,4 mM de chaque dNTP (Roche¹), 5,0 mM de MgCl₂ et 1,0 U de Taq ADN polymérase FastStart (Roche¹). L'amplification est effectuée dans un thermocycleur LightCycler 1.5 (Roche Diagnostics¹), dont les paramètres sont réglés comme suit: dénaturation et activation initiales de la Taq ADN polymérase FastStart (Roche Diagnostics¹) à 95°C pendant 10 minutes, suivies de 45 cycles (dénaturation à 94°C pendant 5 secondes, hybridation à 62°C pendant 20 secondes et élongation à 72°C pendant 10 secondes). Les données sont analysées avec la version 3.5 du logiciel du LightCycler¹.

Pour confirmer la qualité de l'ADN génomique purifié de nématode qui est employé dans cette analyse, une amplification est effectuée par PCR classique avec les amorces témoins ITS1-F et ITS2-R (amorces décrites dans la partie 4.2.1). Le mélange de réaction pour la PCR (25 µl) est composé comme suit: 5 µl de matrice, 2,5 µl de tampon de réaction 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 chaque amorce, 1,6 µg d'ASB, 0,2 mM de chaque dNTP et 1 U de Taq ADN Polymérase FastStart (Roche¹). Les paramètres de thermocyclage sont les suivants: une dénaturation initiale à 94°C pendant 5 minutes, suivie de 40 cycles (94°C pendant 1 minute, 55°C pendant 1 minute et 72°C pendant 2 minutes), puis d'une phase d'élongation finale à 72°C pendant 5 minutes.

4.2.4 Analyses moléculaires fondées sur l'ARN pour la détection de *Bursaphelenchus xylophilus* vivants.

Les analyses suivantes permettent uniquement la détection de nématodes vivants. Diverses options associées à la PCR par transcription inverse (RT-PCR) classique et en temps réel, sont indiquées.

4.2.4.1 RT-PCR classique ciblant une séquence de la protéine hsp70 dans l'ADN

Une méthode RT-PCR classique qui permet de détecter les *B. xylophilus* vivants en ciblant une séquence génétique de la protéine *hsp70* a été décrite par Leal *et al.* (2013). Dans cette analyse, les amorces sens et antisens sont placées des deux côtés de l'intron de la protéine *hsp70* afin que l'ADN génomique puisse être facilement différencié de l'ADN complémentaire (ADNc) par la taille de l'amplicon. La spécificité de l'analyse a été évaluée avec six espèces de *Bursaphelenchus* non ciblées et six isolats de *B. xylophilus*. La limite de détection de l'analyse est de 0,4 nématode par réaction, mesurée dans trois des trois répétitions.

L'ARN et l'ADN génomique sont extraits d'au moins 20 nématodes. L'extraction simultanée d'ARN et d'ADN génomique est réalisée au moyen du Mini Kit AllPrep DNA/RNA (Qiagen¹), utilisé selon le protocole du fabricant, sous réserve des modifications suivantes: les culots de nématodes qui ont été conservés à -80°C sont broyés avec un pilon Kontes Pellet Pestle (Kimble Chase Life Science and Research Products¹), puis 350 µl de tampon de lyse RLT (fourni avec le kit d'extraction Qiagen¹) sont ajoutés à chaque culot contenant les nématodes. L'étape d'homogénéisation est complétée dans des colonnes QIAshredder Mini Spin Columns (Qiagen¹). Dans une colonne, l'ARN est élué avec 20 µl d'eau exempte de ribonucléase, et l'ADN est élué avec 50 µl de tampon EB (inclus dans le kit

d'extraction Qiagen¹⁾ préchauffé. L'éluat est laissé en place sur la membrane de la colonne pendant environ 3 minutes pour favoriser une élution maximale avec une seule centrifugation.

Les amorces spécifiques de *B. xylophilus* employées dans cette analyse sont indiquées ci-après, et l'amplicon produit à partir de l'ADNc matrice compte 473 pb:

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

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

On peut ajouter les amorces témoins suivantes, qui ciblent le gène de l'actine, afin de vérifier que les analyses donnent les résultats attendus quand on analyse l'ADN génomique isolé. Ces amorces produisent un amplicon de 228 pb:

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

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

Un protocole de RT-PCR en deux étapes est mis en œuvre. La réaction de transcription inverse est réalisée selon le protocole du Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics¹⁾) avec l'amorce anchored-oligo (dT)18. S'agissant de la synthèse d'ADNc, le matériel de départ consiste en 12 µl d'ARN. L'étape proposée en option par le fabricant du kit, à savoir dénaturer l'ARN et les amorces à 65°C pendant 10 minutes, est conduite et est suivie d'un refroidissement immédiat sur de la glace. À l'issue de la synthèse d'ADNc, des échantillons sont conservés à -20°C pour être utilisés ultérieurement comme matrices.

Le mélange de réaction pour la PCR (25 µl) est composé comme suit: 2 µl d'ADNc comme matrice, 19 µl de tampon GoTaq Flexi PCR buffer (Promega¹⁾), 1,5 mM de MgCl₂, 0,20 mM de chaque dNTP (Roche Diagnostics¹⁾), 1,25 U de GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega¹⁾) et 0,4 µM de chaque amorce (Hsp23F1 et Hsp19R2). L'amplification est réalisée avec les paramètres de thermocyclage suivants: dénaturation initiale à 95°C pendant 5 minutes, suivie de 35 cycles d'amplification (dénaturation à 95°C pendant 30 secondes, hybridation à 60°C pendant 30 secondes et élongation à 72°C pendant 1 minute) puis d'une phase d'élongation finale à 72°C pendant 5 minutes. S'agissant de l'amplification avec les amorces témoins, le mélange de réaction pour la PCR (25 µl) a la même composition que précédemment, si ce n'est qu'on y ajoute 1 µl d'ADN génomique (40 ng/µl) et 1 µM de chaque amorce (BxActF3 et BxActR3). L'amplification est réalisée avec les paramètres de thermocyclage suivants: dénaturation initiale à 95°C pendant 5 minutes, suivie de 35 cycles (95°C pendant 30 secondes, 52°C pendant 30 secondes et 72°C pendant 1 minute) puis d'une phase d'élongation finale à 72°C pendant 5 minutes.

4.2.4.2 RT-PCR en temps réel ciblant une séquence de la protéine hsp70 dans l'ADNc

Une RT-PCR en temps réel avec SYBR Green, qui permet d'identifier exclusivement les *B. xylophilus* vivants en détectant la présence de l'ARN messager (ARNm) de la protéine *hsp70* comme marqueur de viabilité, a été décrite par Leal *et al.* (2013). Cette analyse permet de détecter l'amplification spécifique de l'ADNc de la protéine *hsp70* de *B. xylophilus* après sa transcription inverse, parce que l'amorce antisens se lie à un point de jonction exon-intron, éliminant ainsi l'amplification de l'ADN génomique. La spécificité de l'analyse a été évaluée avec six espèces de *Bursaphelenchus* non ciblées et six isolats de *B. xylophilus*. La limite de détection de l'analyse est de 0,25 nématode par réaction, mesurée dans trois des trois répétitions.

Le protocole d'extraction simultanée de l'ARN et de l'ADN génomique est mis en œuvre comme dans la méthode PCR classique (partie 4.2.4.1).

Les amorces employées dans cette analyse sont les suivantes:

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

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

On peut ajouter les amorces témoins suivantes afin de vérifier que les analyses donnent les résultats attendus:

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

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

Un protocole de RT-PCR en deux étapes est mis en œuvre, et la synthèse de l'ADNc est réalisée comme dans la méthode PCR classique (partie 4.2.4.1), si ce n'est que l'on emploie soit l'amorce anchored-oligo (dT) 18, soit l'amorce spécifique de la séquence (HspexR3). À l'issue de la synthèse d'ADNc, des échantillons sont conservés à -20°C pour être utilisés ultérieurement comme matrices.

Le mélange de réaction pour la PCR (20 µl) est composé comme suit: 5 µl d'ADNc matrice (dilué à 1:10 dans 10 mM de Tris, pH 8,0), 0,6 µM d'amorce sens (HspexF3) et 0,4 µM d'amorce antisens (HspexR3), et 4 µl de mélange 5× LightCycler FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green 1 Mix (Roche Diagnostics¹). L'amplification en temps réel est réalisée dans un thermocycleur LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics¹) avec la version 4.1 du logiciel du LightCycler¹ et des paramètres réglés comme suit: dénaturation et activation initiales à 95°C pendant 10 minutes, suivies de 40 cycles (95°C pendant 15 secondes, 66°C pendant 10 secondes et 72°C pendant 15 secondes). S'agissant de l'amplification avec les amorces témoins, le mélange de réaction pour la PCR (20 µl) a la même composition que précédemment, si ce n'est qu'on y ajoute 0,5 µM de chaque amorce (BxActF3 et BxActR3). L'amplification est réalisée avec les paramètres de thermocyclage suivants: dénaturation et activation initiales à 95°C pendant 10 minutes, suivies de 45 cycles (95°C pendant 15 secondes, 52°C pendant 10 secondes et 72°C pendant 15 secondes).

4.2.5 Analyse LAMP

Une méthode permettant de détecter *B. xylophilus* à partir d'échantillons de bois, au moyen d'une analyse LAMP, a été décrite par Kikuchi *et al.* (2009). Ces auteurs ont conçu la méthode pour détecter *B. xylophilus* plus vite et avec un meilleur niveau de sensibilité que dans le cadre de l'analyse PCR en temps réel avec sonde TaqMan également mise au point par leur groupe. La spécificité des amorces et de l'analyse LAMP a été confirmée avec de l'ADN provenant de matériel non ciblé: dix espèces de nématodes apparentées à *B. xylophilus*, six genres de nématodes non ciblés, *P. thunbergii*, *P. densiflora* et *B. fuckeliana*. La sensibilité de l'analyse LAMP a été déterminée comme étant de dix copies du gène cible (ITS) et de $2,5 \times 10^{-5}$ d'un nématode isolé à partir d'une culture pure.

Les échantillons de bois (environ 0,12 g de bois dans la procédure expérimentale) sont mis à incuber à 55°C pendant 20 minutes dans 800 µl de tampon d'extraction contenant la protéinase-K et le dithiothréitol fournis dans le kit de détection de *B. xylophilus* (Nippon Gene¹), puis à 95°C pendant 10 minutes.

Avec cette méthode, les amorces LAMP suivantes sont employées:

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 TTGGCC GTT GAA ACA ACA TCA CC-3'

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

La réaction LAMP est réalisée selon les descriptions de Notomi *et al.* (2000) avec le kit Loopamp DNA Amplification Kit (Eiken Chemical¹). Le mélange de réaction (25 µl) est composé comme suit: 2 µl d'ADN extrait, 5 pmol de chaque amorce F3 et B3, 40 pmol de chaque amorce FIP et BIP, 20 pmol d'amorce LF, 12,5 µl de mélange de réaction 2×, 1 µl d'ADN polymérase Bst et 1 µl de réactif de

détection fluorescent (Eiken Chemical¹). Le mélange de réaction est mis à incuber à 63°C pendant 60 à 120 minutes et, pour finir, à 80°C pendant 2 minutes. Les amplicons résultant de l'analyse LAMP sont détectés par les changements de couleur de la solution de réaction sous rayonnement ultraviolet.

À titre optionnel, les produits amplifiés peuvent être évalués au moyen d'un système de détection fondé sur l'emploi de sondes. La forme 5'-biotinylée de l'amorce FIP est utilisée dans la réaction LAMP. Une fois cette réaction achevée, 10 µl de sonde marquée à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (10 pmol/µl; 5'-GGC GAG AGG GCT TCG TGC TCG ATT GTC GTG C-3') conçue pour s'hybrider sur une région interne de la séquence cible, sont ajoutés au mélange de réaction qui est mis à incuber à 95°C pendant 5 minutes, puis est lentement refroidi jusqu'à la température de 25°C. Le mélange de réaction est dilué avec 100 µl de tampon de migration (tampon phosphate salin avec 3% de Tween) et est appliqué directement sur des bandelettes HybriDetect (Milenia Biotec¹), selon les instructions du fabricant. Les bandelettes HybriDetect mettent en évidence les fragments contenant à la fois la biotine et le FITC résultant de l'amplification spécifique. En revanche, quand une amplification non spécifique s'est produite, aucun signal n'est observé sur la ligne réactive des bandelettes.

4.2.6 Témoins employés dans les analyses moléculaires

Pour que les résultats des analyses soient considérés comme fiables, des témoins adaptés – qui dépendront du type d'analyse réalisée et du niveau de certitude requis – devraient être intégrés dans chaque série d'isolement d'acide nucléique et d'amplification de l'acide nucléique de l'organisme nuisible ciblé. S'agissant des analyses moléculaires en général, un acide nucléique témoin positif, un témoin d'amplification négatif («no template control») et, lorsque c'est pertinent (par exemple en cas de détection directe du nématode), un témoin interne sont, au minimum, les témoins qui devraient être employés. S'agissant de la RT-PCR (classique ou en temps réel), un témoin positif de transcription inverse devrait aussi être utilisé.

Acide nucléique témoin positif. Ce témoin est employé pour vérifier que l'analyse s'est déroulée comme prévu compte tenu des conditions expérimentales et des paramètres. Un témoin positif peut consister en un quelconque acide nucléique contenant la séquence cible de l'analyse; c'est-à-dire, un acide nucléique de *B. xylophilus* ayant donné auparavant un résultat positif; un plasmide contenant la séquence cible clonée; de l'ARN transcrit *in vitro*; le produit d'une réaction d'amplification réalisée antérieurement; ou de l'ADN double brin synthétique ou encore un oligonucléotide long.

Témoin d'amplification négatif («no template control»). Ce témoin doit être utilisé dans toute PCR pour écarter les faux positifs dus à une contamination pendant la préparation du mélange de réaction ou à une amplification non spécifique. L'eau de qualité PCR qui a été utilisée dans le mélange de réaction est ajoutée à l'étape de l'amplification.

Témoin interne. S'agissant de la PCR classique, de la PCR en temps réel et de l'analyse LAMP, des témoins endogènes tels que la région ITS, l'ARNr 18S, ou les gènes de la β -actine ou de la cyclooxygénase peuvent être employés pour éliminer les possibilités d'obtenir des faux négatifs avec la PCR, dus à un échec de l'extraction d'acide nucléique, à une dégradation ou encore à la présence d'inhibiteurs de PCR.

En ce qui concerne la RT-PCR, on devrait employer un témoin négatif de transcription inverse pour vérifier que les échantillons d'ARN ne sont pas contaminés par de l'ADN génomique. Ce témoin est composé de tous les réactifs de la RT-PCR à l'exception de l'enzyme transcriptase inverse. En l'absence de contamination par de l'ADN génomique, ce témoin ne devrait pas générer de signal après l'amplification.

Toujours dans le cas de la RT-PCR, on devrait employer une transcriptase inverse témoin positive pour vérifier le bon fonctionnement de l'enzyme transcriptase inverse. Ce témoin est composé de tous les réactifs de la RT-PCR et d'un extrait d'ARN qui comprend la séquence cible de l'analyse (par exemple, un extrait d'ARN préparé par le laboratoire, dont le résultat positif a été confirmé au préalable). Ce témoin devrait générer un signal après l'amplification.

S'agissant de la PCR et de l'analyse LAMP, il convient de veiller à éviter toute contamination croisée par des aérosols provenant du témoin positif ou d'échantillons positifs.

4.2.7 Interprétation des résultats de la PCR

4.2.7.1 PCR classique

L'analyse PCR spécifique pour l'agent pathogène est jugée valide seulement si:

- le témoin positif produit un amplicon de la taille attendue pour le nématode ciblé
- le témoin négatif d'extraction et le témoin négatif d'amplification ne produisent pas d'amplicon de la taille attendue pour le nématode ciblé.

Si des amorces témoins internes sont employées, s'agissant des réactions simplex, les témoins positifs, ainsi que chacun des échantillons soumis à l'analyse, devraient produire un amplicon de la taille attendue. S'agissant des réactions multiplex, tous les échantillons négatifs devraient produire un amplicon de la taille attendue. Dans certains cas, des échantillons positifs (présence du nématode) peuvent aussi produire un amplicon de la taille attendue avec les amorces témoins internes.

L'analyse d'un échantillon sera jugée positive si elle produit un amplicon de la taille correcte.

4.2.7.2 PCR en temps réel

La PCR en temps réel est jugée valide seulement si:

- le témoin positif produit une courbe d'amplification avec les amorces spécifiques du nématode ciblé
- les témoins négatifs ne produisent pas de courbe d'amplification.

Si des amorces témoins internes sont employées, le témoin positif et chacun des échantillons soumis à l'analyse devraient produire une courbe d'amplification.

4.2.8 Séquençage

Plusieurs régions génomiques ont été directement séquencées à partir de nématodes isolés (un seul nématode dans le cas de Wu *et al.* (2013) et une grande quantité de nématodes provenant d'élevages sur des champignons dans le cas de Ye *et al.* (2007)), aux fins de l'identification de l'espèce *B. xylophilus* et de la différenciation de diverses espèces de *Bursaphelenchus*. Ces régions sont notamment des espaceurs intergéniques transcrits (ITS-1, ITS-2, 5.8S) de l'ADNr (Abelleira *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2013) ou la région D2–D3 du gène de l'ARNr 28S (Ye *et al.*, 2007). La région ciblée est amplifiée par PCR et les amplicons sont séquencés soit directement, soit après avoir été clonés. Les résultats du séquençage peuvent alors être analysés au moyen du logiciel Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) mis à disposition par le National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) et être comparés aux séquences de *Bursaphelenchus* répertoriées dans la base de données du NCBI (par exemple, identifiants HQ646254 et KC460340 s'agissant de la région ITS susmentionnée et AY508105 à AY508109 s'agissant de la région de l'ARNr 28S).

Dans le cas du gène ITS, si la divergence de l'alignement de la séquence de l'échantillon avec les séquences connues de *B. xylophilus* est inférieure à 2 pour cent mais supérieure à 2 pour cent avec les séquences de toutes les autres espèces, l'échantillon est identifié comme étant *B. xylophilus*. Dans le cas du gène 28S, si la divergence de l'alignement de la séquence de l'échantillon avec les séquences connues de *B. xylophilus* est inférieure à 0,5 pour cent mais supérieure à 0,5 pour cent avec les séquences de toutes les autres espèces, l'échantillon est identifié comme étant *B. xylophilus*. Tout autre résultat doit donner lieu à un complément de recherche.

La région de la sous-unité I du cytochrome oxydase peut aussi être employée aux fins d'une identification d'espèce. Des indications sur la méthodologie, y compris le logiciel BLAST, et une séquence de référence obtenue à partir de matériel de référence (séquence Q38) sont disponibles dans la Q-bank (<http://www.q-bank.eu/Nematodes/>).

5. Données à conserver

Les données et les éléments à consigner et à conserver sont énumérés dans la partie 2.5 de la NIMP 27 (*Protocoles de diagnostic pour les organismes nuisibles réglementés*).

Lorsque les résultats de la diagnose peuvent porter préjudice à d'autres parties contractantes, notamment dans les cas de non-conformité (NIMP 13 (*Directives pour la notification de non-conformité et d'action d'urgence*)) et lorsque *B. xylophilus* est détecté dans une zone pour la première fois, les données et les éléments probants ci-après ainsi que du matériel supplémentaire devraient être conservés pendant au moins un an d'une manière qui garantisse la traçabilité:

- Un échantillon de nématodes, soit monté sur une lame permanente, soit fixé dans un fixateur TAF ou une solution de glycérine. Dans les cas où *B. xylophilus* est détecté dans une zone pour la première fois, il serait utile, pour faciliter les recherches relatives à la filière, d'établir une culture de *B. xylophilus* vivants multipliés sur *B. cinerea*. Il peut aussi être intéressant de conserver des spécimens ou de l'ADN en vue de la réalisation d'une analyse moléculaire à un stade ultérieur, même dans le cas d'une identification morphologique.
- Si l'identification a reposé sur des techniques moléculaires, de l'ADN extrait peut être conservé à -20°C et de l'ARN extrait à -80°C.
- En cas de présence de *B. xylophilus* dans du bois ou des produits ligneux, y compris les matériaux d'emballage en bois, il conviendrait de conserver, au lieu d'informations géographiques sur l'échantillonnage, des données relatives à l'origine, au matériau (par exemple, grumes, emballage en bois) et aux conditions d'importation (par exemple, présence simultanée de coléoptères vecteurs). Il est à noter que l'emballage en bois n'a pas nécessairement la même origine que l'envoi. Conformément aux prescriptions de la NIMP 15 (*Réglementation des matériaux d'emballage en bois utilisés dans le commerce international*), les matériaux d'emballage en bois employés dans le cadre du commerce international devraient porter une marque dans laquelle les deux premières lettres correspondent au code-pays ISO (Organisation internationale de normalisation) du pays où le bois d'emballage a été produit.

6. Points de contact pour tout complément d'informations

Un complément d'informations sur le présent organisme nuisible ou sur le présent protocole peut être obtenu auprès des sources suivantes:

Julius Kühn-Institut (JKI), Centre fédéral de recherche sur les végétaux cultivés, Institut pour la santé nationale et internationale des végétaux, Messeweg 11-12, D-38104 Braunschweig, Allemagne (Thomas Schröder; courriel: thomas.schroeder@jki.bund.de).

Centre technique, Bureau de l'inspection entrée-sortie et de la quarantaine de Ningbo, No. 9 Mayuan Road, Ningbo, 315012 Chine (Jianfeng Gu; courriel: jeffgu00@qq.com).

Laboratoire de la santé des végétaux de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES), 7 rue Jean Dixmèras, 49044 Angers Cedex 01, France (Geraldine Anthoine; courriel: geraldine.anthoine@anses.fr).

Service canadien des forêts, 506 West Burnside Road, Victoria, BC V8Z 1M5, Canada (Isabel Leal; courriel: ileal@nrcan.gc.ca).

Agence canadienne d'inspection des aliments, 3851 Fallowfield Road, Ottawa, ON K2H 8P9, Canada (Fencheng Sun; courriel: sunfc@inspection.gc.ca).

Outre les spécialistes susmentionnés, des experts régionaux de ce nématode sont énumérés dans le Tableau 3.

Tableau 3. Liste d'experts régionaux et nationaux de *Bursaphelenchus xylophilus* (liste non exhaustive)

Région ou pays	Coordonnées de l'expert
Afrique	Forestry and Agricultural Biotechnology Institute (FABI), Université de Pretoria, Pretoria 0002, Afrique du Sud (Michael J. Wingfield; courriel: mike.wingfield@fabi.up.ac.za)
Australie	Organisation de la recherche scientifique et industrielle du Commonwealth (CSIRO) - Ecosystem Sciences-Black Mountain Laboratories, Clunies Ross Street, Black Mountain, ACT 2601, Australie (Mike Hodda; courriel: Mike.Hodda@csiro.au)
Chine	Département de la protection des forêts, Université forestière de Nanjing, No. 159 Longpan Road, Nanjing, 210037 Chine (Boguang Zhao; courriel: 13505186675@126.com)
Union européenne	NemaLab-Institut catholique d'arts et métiers (ICAM), Departamento Biologia, Universidade de Évora, 7002-554 Évora, Portugal (Manuel Mota; courriel: mmota@uevora.pt)
Japon	Laboratoire de pathologie forestière, Forestry and Forest Products Research Institute, Tsukuba, Ibaraki 305-8687, Japon (Mitsuteru Akiba; courriel: akiban@ffpri.affrc.go.jp)
République de Corée (Corée du Sud)	Division des insectes nuisibles et des maladies des forêts, Institut coréen de recherche forestière, 207 Cheongnyangni 2-dong, Dongdaemun-gu, Seoul 130-712, Corée (RC) (Hyerim Han; courriel: hrhan@forest.go.kr)

Une demande de révision d'un protocole de diagnostic peut être présentée par les organisations nationales de la protection des végétaux (ONPV), les organisations régionales de la protection des végétaux (ORPV) ou les organes subsidiaires de la Commission des mesures phytosanitaires (CMP) par l'intermédiaire du Secrétariat de la CIPV (ippc@fao.org), qui la communique au Groupe technique sur les protocoles de diagnostic.

7. Remerciements

Le présent protocole de diagnostic a été rédigé par Thomas Schröder (JKI, Centre fédéral de recherche sur les végétaux cultivés, Institut pour la santé nationale et internationale des végétaux, Allemagne (voir partie 6), Geraldine Anthoine (Laboratoire de la santé des végétaux de l'ANSES, France (voir partie 6), Isabel Leal (Service canadien des forêts, Canada (voir partie 6), Jianfeng Gu (Centre technique, Bureau de l'inspection entrée-sortie et de la quarantaine de Ningbo, Chine (voir partie 6) et Fengcheng Sun (Agence canadienne d'inspection des aliments, Canada (voir partie 6).

Vladimir Gaar (Laboratoire de diagnose, Administration phytosanitaire nationale, République tchèque) et David McNamara (anciennement OEPP) ont contribué aux premiers stades de l'élaboration du protocole.

La description de la technique ITS-PLFR a été initialement élaborée par Wolfgang Burgermeister (Institut für Pflanzenvirologie, Mikrobiologie und Biologische Sicherheit, JKI, Allemagne). La description initiale de la méthode PCR classique ciblant l'ADN satellite pour l'identification de *B. xylophilus* a été fournie par Philippe Castagnone-Sereno (Unité mixte de recherche 1064, Institut national de recherche agronomique (INRA)/Université Nice-Sophia-Antipolis (UNSA)/Centre national de la recherche scientifique (CNRS), Interactions plantes-microorganismes et santé végétale, France).

Le texte du présent protocole de diagnostic repose partiellement sur le protocole de diagnostic pour *B. xylophilus* élaboré par l'OEPP (OEPP, 2001, 2013b).

8. Références

Le présent protocole de diagnostic fait également référence aux Normes internationales pour les mesures phytosanitaires (NIMP). Les NIMP sont publiées sur le Portail international phytosanitaire, à la page: <https://www.ippc.int/core-activities/standards-setting/ispms>.

- Abelleira, A., Picoaga, A., Mansilla, J.P. et Aguin, O.** 2011. Detection of *Bursaphelenchus xylophilus*, causal agent of pine wilt disease on *Pinus pinaster* in northwestern Spain. *Plant Disease*, 95(6): 776–776.
- Andrássy, I.** 1984. Klasse Nematoda (Ordnungen Monhysterida, Desmoscolecida, Araeolaimida, Chromadorida, Rhabditida). In *Bestimmungsbücher zur Bodenfauna Europas*, p. 24 et 25. Stuttgart (Allemagne), Gustav Fischer Verlag. 509 pp.
- Baermann, O.** 1917. (Une méthode simple pour déceler des larves d'ankylostomo [nématode] dans les selles) *Med. Geneeslc. Lab. Weltevreden*, 1917: 41-47 (en allemand).
- Barstead, R.J., Kleiman, L. et 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.
- Bongers, T.** 1989. [*The nematodes of the Netherlands*] (translated from the Dutch by J. van de Haar). Wageningen, Pays-Bas, Université agricole de Wageningen. 83 pp.
- Braasch, H.** 2001. Les espèces de *Bursaphelenchus* en Europe: Répartition et relations morphologiques. *Bulletin OEPP*, 31: 127-142.
- Braasch, H. et Schönfeld, U.** 2015. Clé d'identification améliorée pour les espèces du groupe *xylophilus* du genre *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937. *Bulletin OEPP*, 45(1): 73-80.
- Braasch, H., Burgermeister, W. et 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. et 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.
- Burgermeister, W., Braasch, H., Metge, K., Gu, J., Schröder, T. et Woldt, E.** 2009. ITS-RFLP analysis, an efficient tool for identification of *Bursaphelenchus* species. *Nematology*, 11: 649-668.
- Burgermeister, W., Metge, K., Braasch, H. et 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. et 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. et 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. et Linit, M.J.** 1992. Transmission of *Bursaphelenchus xylophilus* through oviposition wounds of *Monochamus carolinensis* (Coleoptera: Cerambycidae). *Journal of Nematology*, 24(1): 133-139.

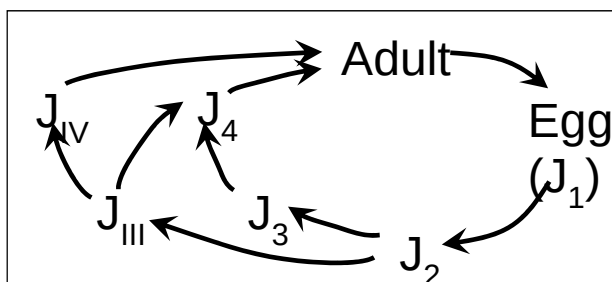
- Evans, H.F., McNamara, D.G., Braasch, H., Chadoeuf, J. et Magnusson, C.** 1996. Analyse du risque phytosanitaire (PRA) pour le territoire de l'Union européenne (en tant que zone PRA) par *Bursaphelenchus xylophilus* et ses vecteurs dans le genre *Monochamus*. *Bulletin OEPP*, 26: 199-249.
- Ferris, V.R., Ferris, J.M. et 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. et 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. et 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 N° 2 du Ministère de la pêche et de l'alimentation, Londres, HMSO. 72 pp.
- Gu, J.,** (sous la direction de) 2014. [*Identification de Bursaphelenchus xylophilus et des espèces qui lui sont étroitement apparentées.*] Xiamen (Chine), Xiamen University Press (en chinois).
- Gu, J., Wang, J., Braasch, H., Burgermeister, W. et 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. et 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. et Miwa, J.** 2008. Embryology and cytology of *Bursaphelenchus xylophilus*. In B.G. Zhao, K. Futai, J.R. Sutherland et Y. Takeuchi (sous la direction de). *Pine wilt disease*, p. 81-104. Tokyo, Springer. 459 pp.
- Hopf, A. et Schroeder, T.** 2013. Non vector spread of *Bursaphelenchus xylophilus* via wood chips. In T. Schroeder (sous la direction de) Pine Wilt Disease Conference, 15-18 octobre 2013, Braunschweig (Allemagne). *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. et 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. et 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. et 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. et 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. et Kanzaki, N.** 2009. A rapid and precise diagnostic method for detecting the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* by loop-mediated isothermal amplification. *Phytopathology*, 99: 1365-1369.

- Kishi, Y.** 1995. *The pine wood nematode and the Japanese pine sawyer*. Forest Pests in Japan No. 1. Tokyo, Thomas Company Limited. 302 pp.
- Kondo, E. et 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. et 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. et 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. et 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. et Kiyohara, T.** 1972. Description of *Bursaphelenchus lignicolus* n.sp. from pine wood and histopathology of nematode-infested trees. *Nematologica*, 18: 120-124.
- Matsunaga, K. et 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. Rapport final du projet de recherche FAIR1-CT95-0034 EU. 102 pp.
- Mota, M. et Vieira, P.** (sous la direction de) 2004. The pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. Compte rendu d'un atelier international, Université d'Évora (Portugal), 20-22 août 2001. In *Nematological monographs and perspectives*, Vol. 1. Leiden (Pays-Bas), Brill. 291 pp.
- Mota, M. et Vieira, P.** (sous la direction de) 2008. *Pine wilt disease: A worldwide threat to forest ecosystems*. Berlin, Springer Verlag. 405 pp.
- Mota, M., Braasch, H., Bravo, M.A., Penas, A.C., Burgermeister, W., Metge, K. et Sousa, E.** 1999. First record of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. *Nematology*, 1: 727-734.
- 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. et 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. et Hase, T.** 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28: e63.
- OEPP** (Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes). 2001. *Bursaphelenchus xylophilus*. Diagnostic PM 7/4 (1). *Bulletin OEPP*, 31(1): 61-69.
- OEPP** (Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes). 2012. *Bursaphelenchus xylophilus* et ses vecteurs: procédures de lutte officielle. Systèmes de lutte nationaux réglementaires. PM 9/1 (5). *Bulletin OEPP*, 42(3): 477-485.
- OEPP** (Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes). 2013a. *Diagnostic protocols for regulated pests: Pictorial glossary of morphological terms in nematology*. Document technique de l'OEPP n°. 1056 (rev. 4). Paris, OEPP. 21 pp.
- OEPP** (Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes). 2013b. *Bursaphelenchus xylophilus*. Diagnostic PM 7/4 (3). *Bulletin OEPP*, 43(1):105-118.

- OEPP** (Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes). 2013c. Nematode extraction. Diagnostics PM 7/119 (1). *Bulletin OEPP*, 43(3): 471-496.
- OEPP** (Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes). 2014. *Bursaphelenchus xylophilus*. Addendum to Diagnostics PM 7/4 (3). *Bulletin OEPP* 44(1): 105.
- OEPP/CAB International**. 1996. *Bursaphelenchus xylophilus*. In I.M. Smith, D.G. McNamara et P.R. Scott, (sous la direction de) *Quarantine pests for Europe*, deuxième édition. Wallingford (Royaume-Uni), CAB International. 1425 pp.
- Pajares, J.A., Ibeas, F., Diez, J.J. et 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. et 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. et 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., Viera, P., Mota, M. et Kulinich, O.** 2005. A synopsis of the genus *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 (Aphelenchida: Parasitaphelenchidae) with keys to species. *Nematology*, 7(3): 393-458.
- Ryss, A.Y.** 2003. Express technique to prepare permanent collection slides of nematodes. *Zoosystematica Rossica*, 11: 257-260.
- Sanchez-Husillos, E., Etxebeste, I. et 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. et Gaar, V.** 2009. Guidance on sampling to detect pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* in trees, wood and insects. *Bulletin OEPP*, 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. et 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. et Evans, H.** 2011. Assessing risks of pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* transfer between wood packaging by simulating assembled pallets in service. *Bulletin OEPP*, 41: 423-431.
- Takeuchi, Y., Kanzaki, N. et 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. et 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. et Filipiak, A.** 2011. *Bursaphelenchus tryphloeus* sp. n. (Nematoda: Parasitaphelenchinae): An associate of the bark beetle, *Tryphloeus asperatus* (Gyll.) (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae), in aspen, *Populus tremula* L. *Nematology*, 13: 619-636.
- Tomalak, M., Worall, J. et Filipiak, A.** 2013. *Bursaphelenchus masseyi* sp. n. (Nematoda: Parasitaphelenchinae): A nematode associate of the bark beetle, *Tryphloeus populi* Hopkins (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), in aspen, *Populus tremuloides* Michx. affected by sudden aspen decline in Colorado. *Nematology*, 15: 907-921.
- van Bezooijen, J.** 2006. *Methods and techniques for nematology*. Wageningen, Pays-Bas, Département de nématologie, Université de Wageningen. 112 pp. En ligne à l'adresse https://www.wageningenur.nl/upload_mm/4/e/3/f9618ac5-ac20-41e6-9cf1-c556b15b9fa7_MethodsandTechniquesforNematology.pdf.

- Vieira, P.R., Mota, M. et 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. et Waterston, R.H.** 1992. A genetic mapping system in *Caenorhabditis elegans* based on polymorphic sequence-tagged sites. *Genetics*, 131: 609-624.
- Wingfield, M.J.** 1987. A comparison of the mycophagous and the phytophagous phases of the pine wood nematode. In M.J. Wingfield, (sous la direction de) *Pathogenicity of the pine wood nematode*. Symposium Series, pp. 81-90. St Paul, MN, APS Press. 122 pp.
- Wingfield, M.J., Blanchette, R.A., Nicholls, T.H. et 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. et 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. et 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. et 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. et Takeuchi, Y.** 2008. *Pine wilt disease*. Berlin, Springer. 459 pp.

9. Figures



Adulte Œuf (J1)

Figure 1. Cycle de développement de *Bursaphelenchus xylophilus*, depuis l'œuf jusqu'au nématode adulte. JX, juvénile au stade X.

Source: modifié de Wingfield et al. (1982).



Figure 2. Évolution des symptômes sur un pin (*Pinus pinaster*) infesté par *Bursaphelenchus xylophilus*, depuis l'arbre sain jusqu'à l'arbre mort.

Photo reproduite avec l'aimable autorisation de T. Schröder, Julius Kühn-Institut (Allemagne).

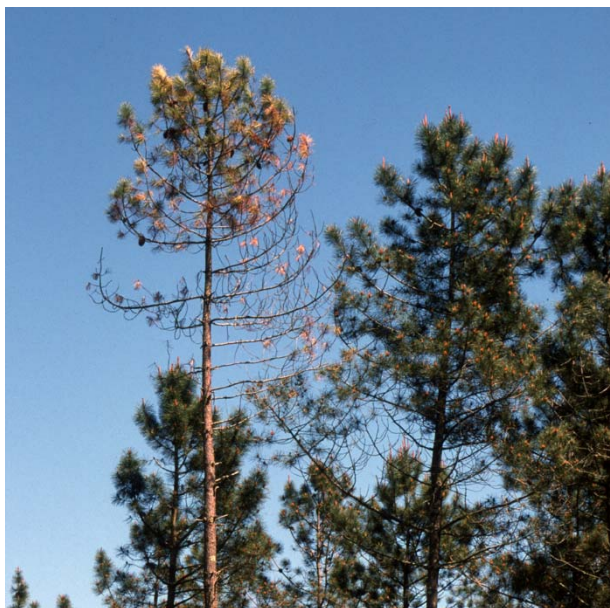


Figure 3. Symptômes de la maladie du dépérissement du pin causée par *Bursaphelenchus xylophilus*, sur *Pinus pinaster*.

Photo reproduite avec l'aimable autorisation de T. Schröder, Julius Kühn-Institut (Allemagne).

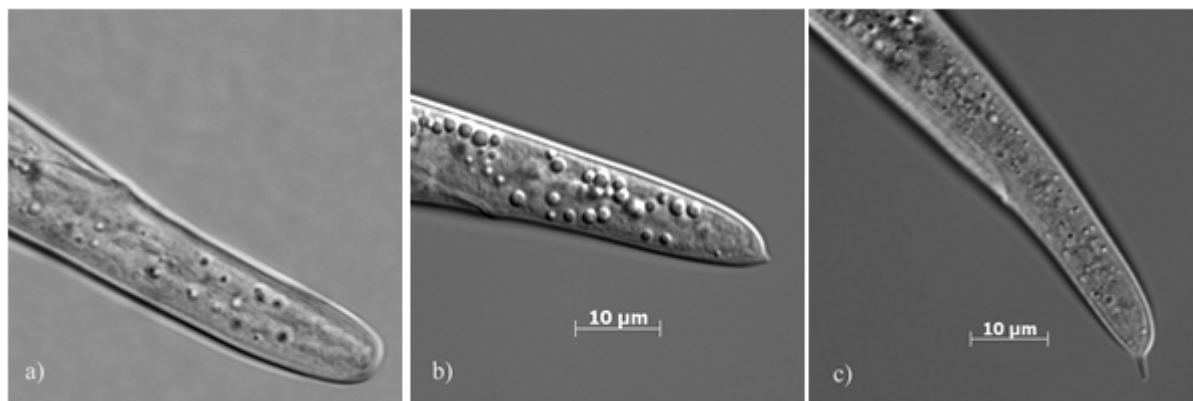


Figure 4. Queues de femelles de *Bursaphelenchus xylophilus*: a) arrondie (grossissement $\times 1\,000$); b) avec petite projection; et c) forme mucronée.

Photos reproduites avec l'aimable autorisation de a) T. Schröder, Julius Kühn-Institut, Allemagne et b), c) J. Gu, Bureau de l'inspection entrée-sortie et de la quarantaine de Ningbo (Chine).

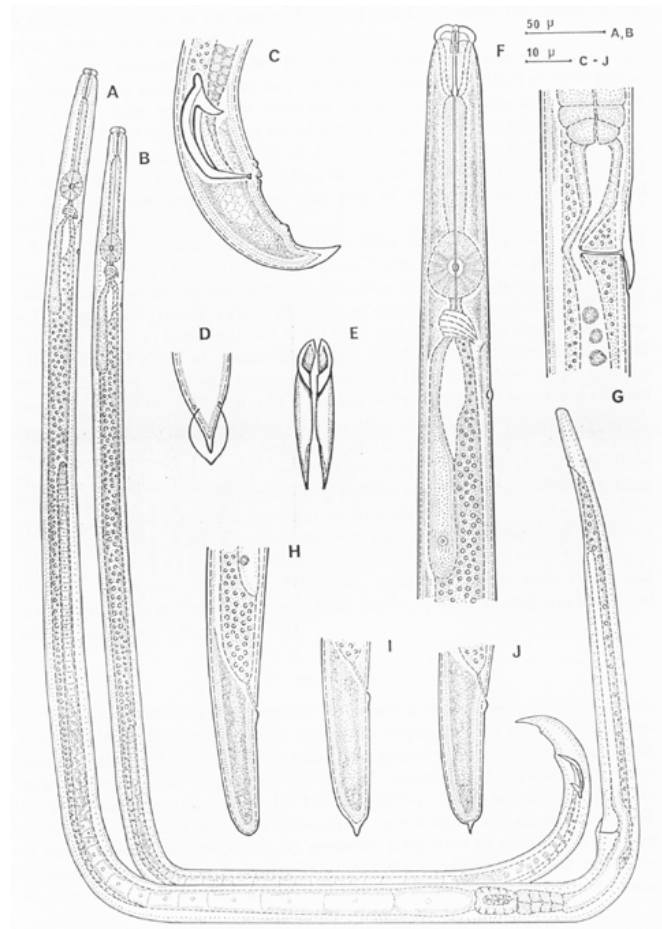


Figure 5. *Bursaphelenchus xylophilus*: A) femelle; B) mâle; C) queue du mâle; D) vue ventrale de la queue du mâle, extrémité avec bourse; E) vue ventrale des spicules; F) femelle, partie antérieure; G) femelle, vulve; et H), I) et J) femelle, queue.

Source: Mamiya et Kiyohara (1972).

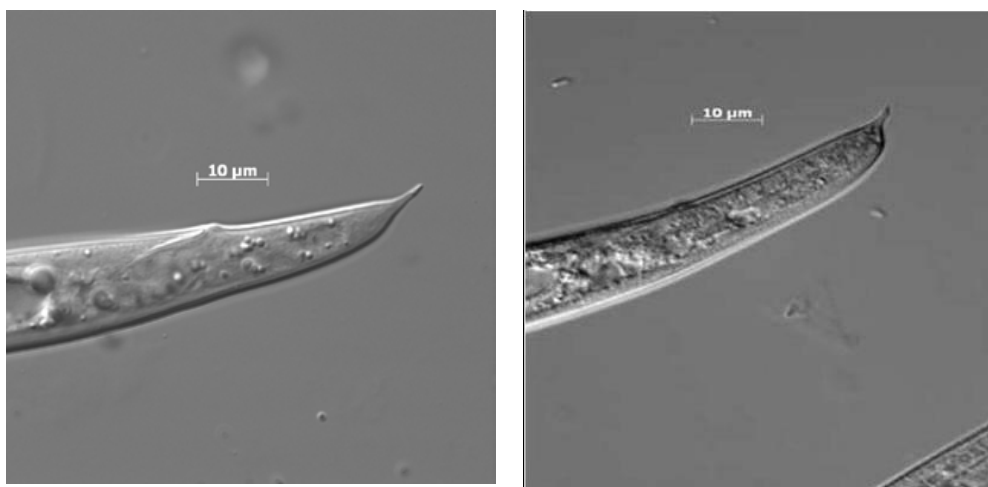


Figure 6. Queue d'une femelle de *Bursaphelenchus mucronatus mucronatus* (à gauche) et de *B. mucronatus kolymensis* (à droite).

Photos reproduites avec l'aimable autorisation de J. Gu, Bureau de l'inspection entrée-sortie et de la quarantaine de Ningbo (Chine).

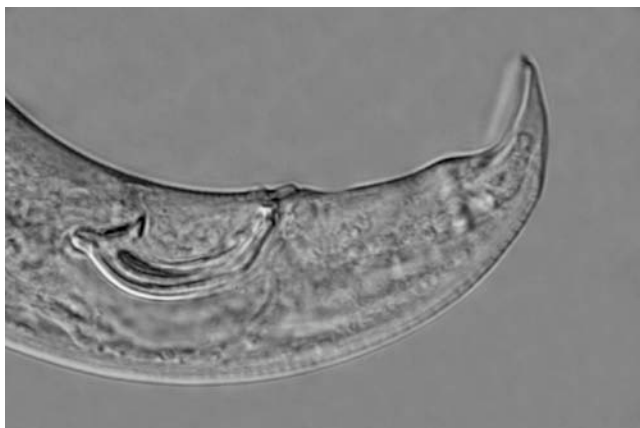


Figure 7. Queue de mâle de *Bursaphelenchus xylophilus* avec spicules (grossissement $\times 1\,000$).
Photo reproduite avec l'aimable autorisation de T. Schröder, Julius Kühn-Institut (Allemagne).

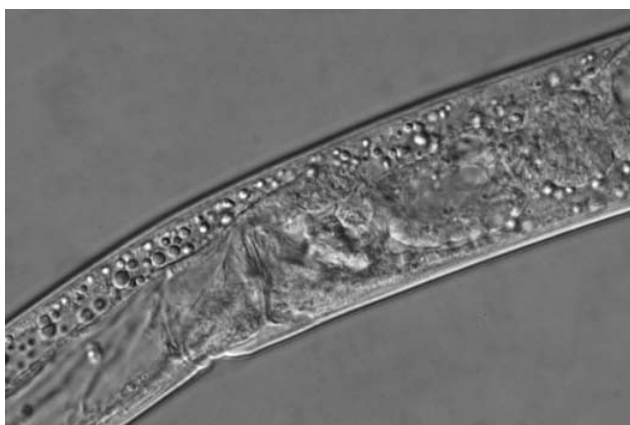


Figure 8. Femelle de *Bursaphelenchus xylophilus* avec rabat vulvaire (grossissement $\times 640$).
Photo reproduite avec l'aimable autorisation de T. Schröder, Julius Kühn-Institut (Allemagne).

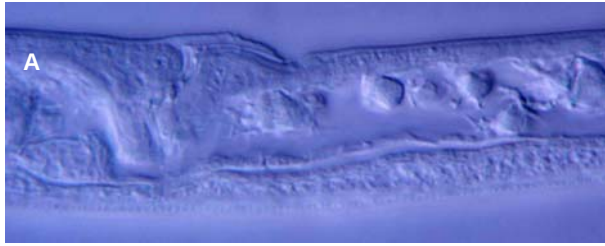


Figure 9. Espèces autres que *Bursaphelenchus xylophilus* appartenant au groupe des *xylophilus*: A) chez la femelle, rabat vulvaire incurvé finissant dans une dépression marquée et B) queue de femelle de *B. fraudulentus* avec petite projection (à gauche) et sans projection (à droite) (grossissement $\times 1\,000$). Photos reproduites avec l'aimable autorisation de M. Tomalak, Institut de la protection des végétaux, Institut national de la recherche (Pologne).

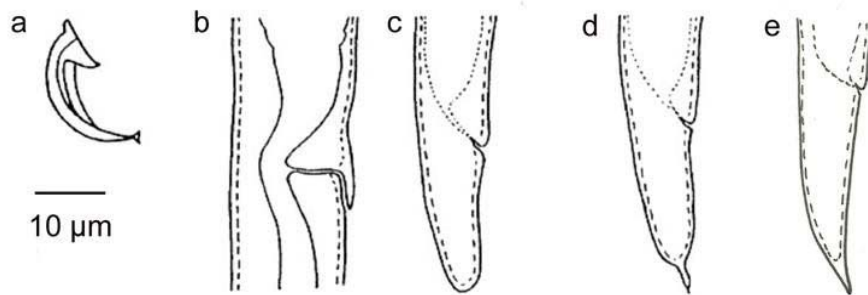


Figure 10. Caractères utiles à la diagnose de *Bursaphelenchus xylophilus*, *B. mucronatus mucronatus* et *B. mucronatus kolymensis*: a) spicules des trois espèces; b) rabat vulvaire des trois espèces; c) extrémité de la queue de la femelle de *B. xylophilus*, forme arrondie; d) extrémité de la queue de la femelle de *B. mucronatus kolymensi* et e) extrémité de la queue de la femelle de *B. mucronatus mucronatus*. Source: modifié de OEPP/CAB International (1996).

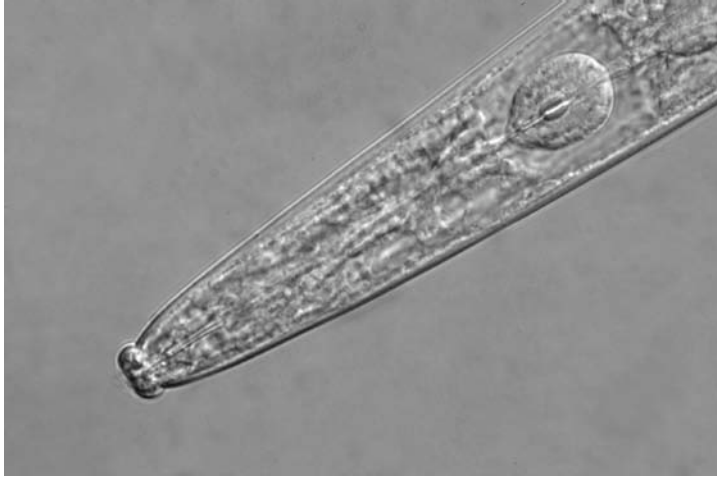


Figure 11. Région antérieure de *Bursaphelenchus xylophilus* avec stylet et bulbe médian (grossissement $\times 640$).
Photo reproduite avec l'aimable autorisation de T. Schröder, Julius Kühn-Institut (Allemagne).



Figure 12. Queue d'un mâle de *Bursaphelenchus xylophilus* en position dorso-ventrale, avec bourse (grossissement $\times 1\,000$).
Photo reproduite avec l'aimable autorisation de T. Schröder, Julius Kühn-Institut (Allemagne).

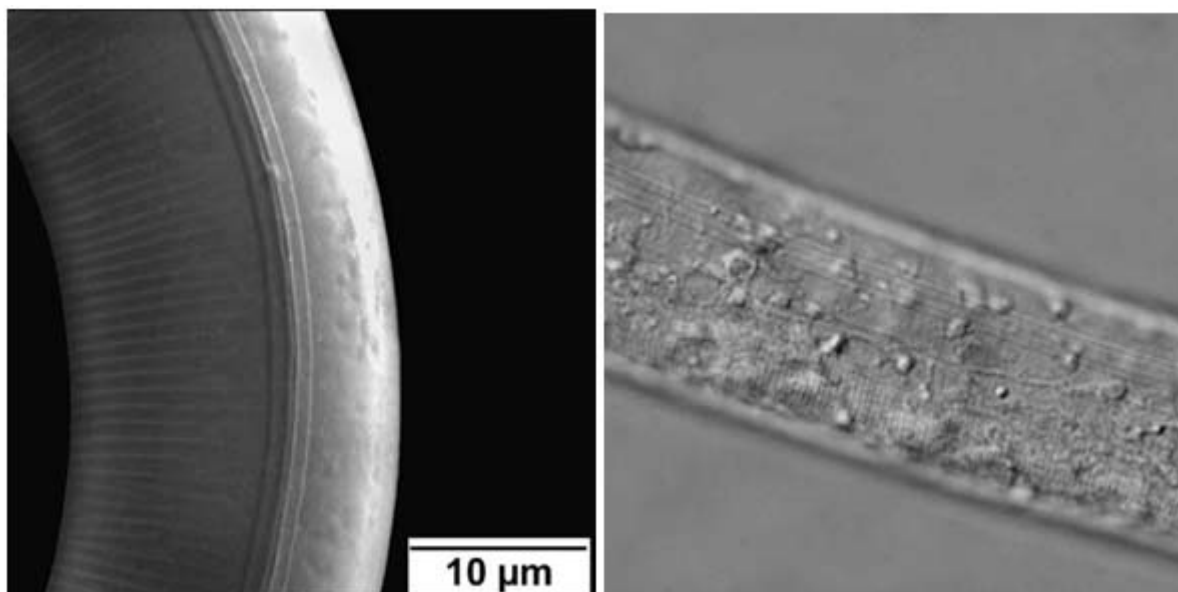


Figure 13. Champ latéral de *Bursaphelenchus xylophilus* au microscope électronique à balayage (à gauche) et au microscope optique (à droite [grossissement $\times 1\,600$]).
Photos reproduites avec l'aimable autorisation de (à gauche) M. Brandstetter, Centre autrichien de recherche sur les forêts, et (à droite) T. Schröder, Julius Kühn-Institut (Allemagne).

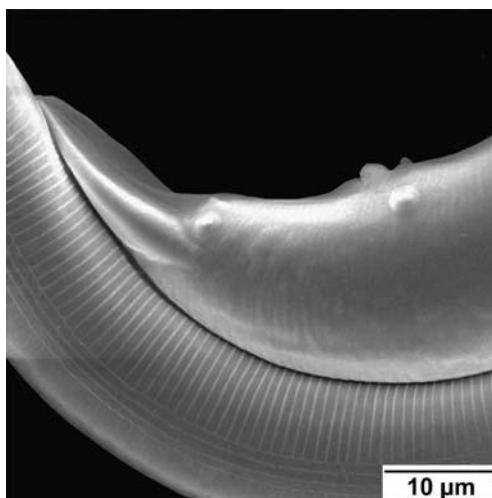


Figure 14. Papilles caudales de *Bursaphelenchus xylophilus*, micrographie de microscope électronique à balayage.
Photo reproduite avec l'aimable autorisation de M. Brandstetter, Centre autrichien de recherche sur les forêts.

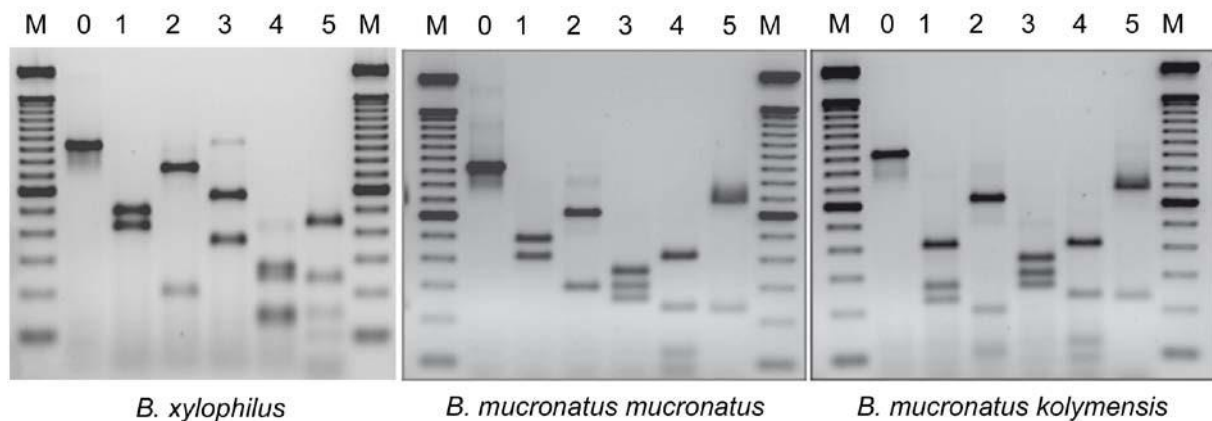


Figure 15. Profils résultant de l'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction des espaceurs intergéniques transcrits (ITS-PLFR) de *Bursaphelenchus xylophilus* (à gauche), *B. mucronatus mucronatus* (au centre) et *B. mucronatus kolymensis* (à droite). Les fragments de restriction ont été obtenus par digestion d'un fragment d'ADN ribosomique (ADNr) amplifié (0), réalisée avec les enzymes suivants: h *RsaI* (1), *HaeIII* (2), *MspI* (3), *HinfI* (4) et *AluI* (5).

M, marqueur ADN (échelle de 100 paires de bases).

Photos reproduites avec l'aimable autorisation de W. Burgermeister, Julius Kühn-Institut, Allemagne.

Étapes de la publication

Ce récapitulatif ne fait pas officiellement partie de la norme

2004-11 Le Comité des normes (CN) ajoute le sujet: *Bursaphelenchus xylophilus* (2004-016).

2006-04 À sa première session (2006), la CMP ajoute au programme de travail le thème: Nématodes (2006-008).

2007-09 Le Groupe technique sur les protocoles de diagnostic (GTPD) examine le projet.

2008-06 Le GTPD examine le projet avec l'auteur principal.

2013-09 Un nouveau groupe chargé de la rédaction du protocole de diagnostic est formé.

2014-03 Consultation d'experts.

2014-10 Le CN approuve le projet en vue de la consultation des membres (2014_eSC_Nov_11).

2015-02 Consultation des membres.

2015-10 Le GTPD approuve la présentation au CN pour adoption par décision électronique (eTPDP_Oct_02).

2015-11 Le CN approuve la transmission pour la période de notification des protocoles de diagnostic (2015_eSC_Nov_08).

2016-01 Le CN adopte le protocole de diagnostic au nom de la CMP (aucune objection formelle reçue).

NIMP 27. Annexe 10. *Bursaphelenchus xylophilus* (2016). Rome, CIPV, FAO.

Dernière mise à jour des étapes de la publication: 2016-04

CIPV

La Convention Internationale pour la Protection des Végétaux (CIPV) est un accord international sur la santé des végétaux qui vise à protéger les plantes cultivées et sauvages en prévenant l'introduction et la dissémination d'organismes nuisibles. Les voyages et les échanges internationaux n'ont jamais été aussi développés qu'aujourd'hui. Cette circulation des personnes et des biens à travers le monde s'accompagne d'une dissémination des organismes nuisibles qui constituent une menace pour les végétaux.

Organization

- ◆ La CIPV compte plus de 180 parties contractantes.
- ◆ Chaque partie contractante est rattachée à une Organisation nationale de la protection des végétaux (ONPV) et dispose d'un Point de contact officiel de la CIPV.
- ◆ Neuf organisations régionales de la protection des végétaux (ORPV) agissent pour faciliter la mise en œuvre de la CIPV dans les pays.
- ◆ La CIPV assure la liaison avec les organisations internationales compétentes pour aider au renforcement des capacités régionales et nationales.
- ◆ Le Secrétariat est fourni par l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO).



Convention Internationale pour la Protection des Végétaux (CIPV)

Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Rome (Italie)

Tél: +39 06 5705 4812 - Télécopie: +39 06 5705 4819

Courriel: ippc@fao.org - Site Internet: www.ippc.int