

Servizio fitosanitario nazionale

DOCUMENTI TECNICI UFFICIALI

Documento n. 57

**SCHEDA TECNICA PER
INDAGINI SULL'ORGANISMO NOCIVO:**

Bursaphelenchus xylophilus

REV.	DESCRIZIONE REVISIONE	COMPILAZIONE	APPROVAZIONE	DATA DI ADOZIONE	FIRMA
0	Revisione 0	GDL per il Programma di indagine sugli organismi nocivi delle piante	CFN 25-26/10/2023	15/11/2023	

Indice

Premessa	3
1. Informazioni Generali	3
1.1 Tassonomia e inquadramento	3
1.2 Normativa vigente	4
1.3 Distribuzione geografica	5
1.3.1 Presenza in Italia	6
2. Aspetti biologici dell'organismo	6
2.1 Morfologia e biologia dell'organismo nocivo	6
2.2 Sintomi/segni	8
2.3 Piante ospiti (ospiti principali/minori)	8
3. Siti di maggiore rischio	9
3.1 Aree a rischio/ Risk areas	9
4. Indagine/survey	10
4.1 Osservazione visiva	10
4.2 Campionamento	12
4.3 Indagine con trappole	15
5. Diagnosi	17
5.1 Campione/Matrice	17
5.2 Test per l'identificazione	17
Bibliografia	19

Premessa

La scheda tecnica di indagine per un organismo nocivo o gruppo di organismi nocivi affini riporta le informazioni sull'inquadramento tassonomico e normativo, la diffusione a livello mondiale e nazionale, gli aspetti di carattere generale sul ciclo biologico, le istruzioni su come condurre e quando rilievi visivi e campionamenti sulla base di ampie illustrazioni dei sintomi o danni causati sulle specie ospiti e, nel caso di insetti, le modalità di indagine attraverso l'uso di trappole. La scheda riporta anche le informazioni sulle metodologie diagnostiche per l'identificazione del singolo organismo nocivo o gruppo affine.

La scheda tecnica di indagine tiene conto dei **regolamenti comunitari** e/o **decreti nazionali**, dell'esperienza dei Servizi Fitosanitari Regionali (SFR) nel controllo del territorio, degli standard internazionali (**EPPO**, ISPM etc.). La scheda è uno strumento funzionale al riconoscimento dell'organismo nocivo in dotazione al personale tecnico impegnato nell'esecuzione delle indagini (Ispettori fitosanitari, Agenti fitosanitari, Assistenti fitosanitari, Tecnici rilevatori).

La scheda tecnica di indagine viene elaborata da un gruppo di lavoro di esperti (**SFR** e **CREA-DC**) per l'organismo nocivo considerato, con l'eventuale coinvolgimento di altri esperti di Enti di Ricerca e Università. La scheda di indagine viene approvata dal **Comitato Fitosanitario Nazionale** (CFN) e revisionata periodicamente per gli aggiornamenti normativi, distribuzione geografica e procedure di indagine.

1. Informazioni Generali

1.1 Tassonomia e inquadramento

Nome scientifico: *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhner, 1934) Nickle, 1971

Nomi comuni: nematode del pino; pine wood nematode (PWN); pine wilt disease (PWD)

Codice EPPO: BURSXY

Posizione tassonomica:

Phylum: Nematoda (1NEMAP)

Classe: Chromadorea (1CHROC)

Ordine: Rhabditida (1RHABO)

Famiglia: Aphelenchoididae (1APLOF)

Genere: *Bursaphelenchus* (1BURSG)

Specie: *Bursaphelenchus xylophilus* (BURSXY)

Categorizzazione

EU: A2 - Quarantine pest (Annex II B - Reg. (UE) 2019/2072)

EPPO: A2 List

1.2 Normativa vigente

EUROPEA:

- **Decisione di esecuzione 2012/535/UE** della Commissione, del 26 settembre 2012, relativa a misure urgenti di prevenzione della propagazione nell'Unione di *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhner) Nickle et al. (nematode del pino) e ss. mm. ii;
- **Regolamento (UE) 2016/2031** del Parlamento europeo e del Consiglio, del 26 ottobre 2016, relativo alle misure di protezione contro gli organismi nocivi per le piante, che modifica i regolamenti (UE) n. 228/2013, (UE) n. 652/2014 e (UE) n. 1143/2014 del Parlamento europeo e del Consiglio e abroga le direttive 69/464/CEE, 74/647/CEE, 93/85/CEE, 98/57/CE, 2000/29/CE, 2006/91/CE e 2007/33/CE del Consiglio;
- **Regolamento (UE) 2017/625** del Parlamento europeo e del Consiglio, del 15 marzo 2017, relativo ai controlli ufficiali e alle altre attività ufficiali effettuati per garantire l'applicazione della legislazione sugli alimenti e sui mangimi, delle norme sulla salute e sul benessere degli animali, sulla sanità delle piante nonché sui prodotti fitosanitari, recante modifica dei regolamenti (CE) n. 999/2001, (CE) n. 396/2005, (CE) n. 1069/2009, (CE) n. 1107/2009, (UE) n. 1151/2012, (UE) n. 652/2014, (UE) 2016/429 e (UE) 2016/2031 del Parlamento europeo e del Consiglio, dei regolamenti (CE) n. 1/2005 e (CE) n. 1099/2009 del Consiglio e delle direttive 98/58/CE, 1999/74/CE, 2007/43/CE, 2008/119/CE e 2008/120/CE del Consiglio, e che abroga i regolamenti (CE) n. 854/2004 e (CE) n. 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, le direttive 89/608/CEE, 89/662/CEE, 90/425/CEE, 91/496/CEE, 96/23/CE, 96/93/CE e 97/78/CE del Consiglio e la decisione 92/438/CEE del Consiglio (regolamento sui controlli ufficiali);
- **Regolamento delegato (UE) 2019/1702** della Commissione del 10 agosto 2019 che integra il regolamento (UE) 2016/2031 del Parlamento europeo e del Consiglio stabilendo l'elenco degli organismi nocivi prioritari;
- **Regolamento di esecuzione (UE) 2019/2072** della Commissione che stabilisce condizioni uniformi per l'attuazione del regolamento (UE) 2016/2031 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda le misure di protezione contro gli organismi nocivi per le piante e che abroga il regolamento (CE) n. 690/2008 della Commissione e modifica il regolamento di esecuzione (UE) 2018/2019 della Commissione e ss.mm.ii.;

NAZIONALE:

- **Decreto Legislativo 2 febbraio 2021, n. 19.** "Norme per la protezione delle piante dagli organismi nocivi in attuazione dell'articolo 11 della legge 4 ottobre 2019, n. 117, per l'adeguamento della normativa nazionale alle disposizioni del regolamento (UE) 2016/2031

e del regolamento (UE) 2017/625"(GU Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana - Serie generale n.48 del 26 febbraio 2021) e s.m.i.

1.3 Distribuzione geografica

Origini: Si presume che *Bursaphelenchus xylophilus* sia originario dell'America del Nord e sia stato introdotto accidentalmente sull'isola meridionale giapponese di Kyushu attraverso legname infetto all'inizio del XX secolo (Nickle et al., 1981; Mamiya, 1983; Malek & Appleby, 1984). Il fatto che le specie ospiti native americane siano per lo più resistenti rispetto a quelle vegetanti nell'areale giapponese, evidentemente suscettibili agli attacchi di questo nematode, supporta questa ipotesi.

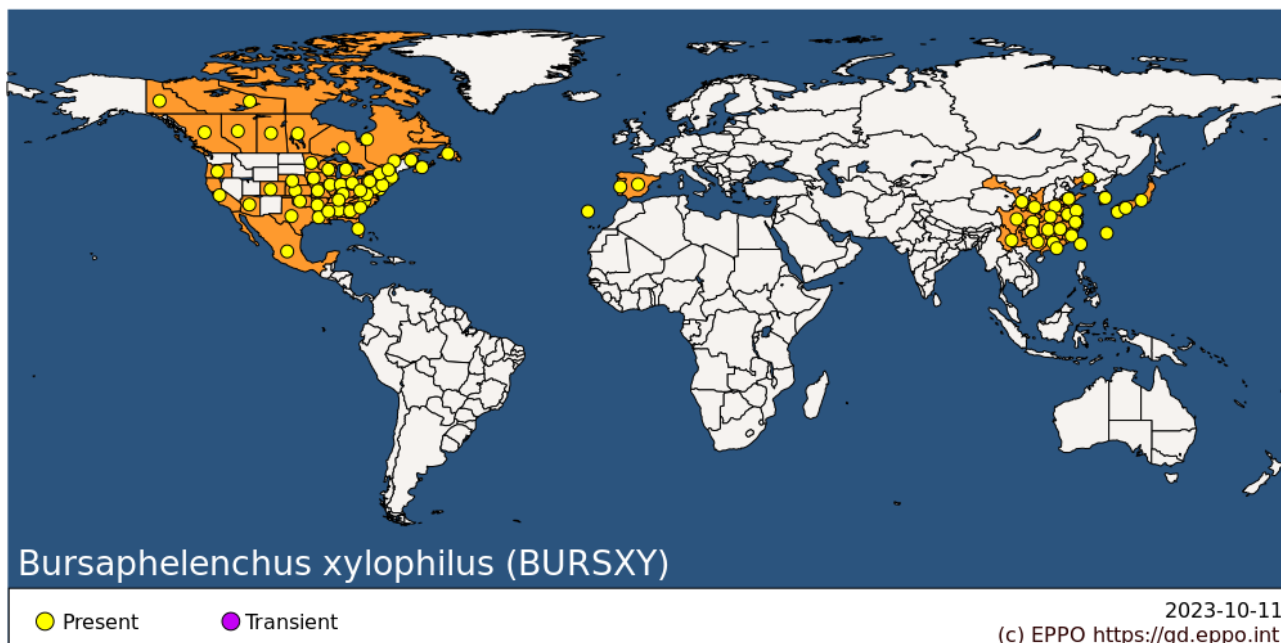
Africa: assente

America: Canada, Messico, Stati Uniti

Asia: Cina, Corea, Giappone, Taiwan

Europa: Spagna, Portogallo continentale e Isola di Madeira

Oceania: assente



<https://gd.eppo.int/taxon/BURSXY/distribution>

1.3.1 Presenza in Italia: assente

2. Aspetti biologici dell'organismo

2.1 Morfologia e biologia dell'organismo nocivo

Bursaphelenchus xylophilus si sviluppa attraverso sei stadi: uovo, quattro stadi larvali e adulto. Il primo stadio larvale (J1) muta nel secondo stadio (J2) all'interno dell'uovo. Le J2 fuoriescono dalle uova e passano attraverso due ulteriori stadi giovanili (J3 e J4) prima di diventare adulti. In condizioni favorevoli, a 25°C, *B. xylophilus* completa il suo ciclo propagativo in quattro giorni (Hasegawa and Miwa, 2008). Gli adulti sono vermiformi e sottili. Le femmine hanno una lunghezza di 450-1290 µm; capo ben separato dal resto del corpo; stiletto con bottoni basali piccoli (Fig.1); coda subcilindrica con estremità ampiamente arrotondata (Fig. 2); lembo vulvare ampio (flap) (Fig.3); sacco uterino post-vulvare di lunghezza pari a $\frac{3}{4}$ della distanza vulva-ano; 4 linee nei campi laterali. I maschi hanno una lunghezza di 520-1300 µm; capo, stiletto e campi laterali come nella femmina; spicole robuste, caratteristiche, provviste di rostro e condilo prominenti e di un cucullo all'estremità distale (Fig. 4); 7 papille caudali; *bursa* terminale ovale, a 2 o 3 punte (Fig.5).

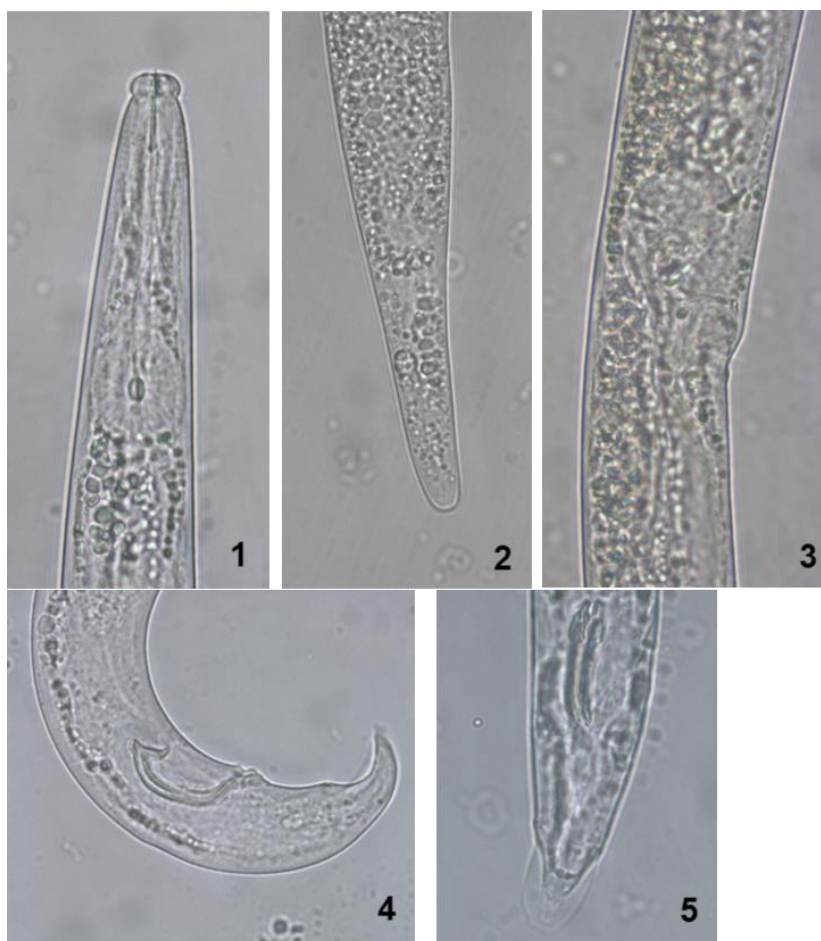


Fig. 1-5 – Stiletto (1); coda (2); flap (3); spicole (4) e bursa (5) di *Bursaphelenchus xylophilus*. Foto di Giulia Torrini (CREA-DC)

Bursaphelenchus xylophilus è un endoparassita migratore, il cui ciclo biologico può distinguersi in due fasi in base al diverso comportamento trofico: la prima fase si sviluppa su funghi dell'azzurrimento presenti nelle piante deperite (ciclo micetofago), la seconda invece si sviluppa su tessuti vegetali di piante sensibili (ciclo fitofago). In entrambi i casi il nematode viene veicolato da una pianta all'altra da coleotteri cerambicidi del genere *Monochamus* (Linit, 1990; Evans et al., 1996).

Nel ciclo micetofago le J4 sono trasmesse ad alberi morti o deperienti durante la deposizione delle uova dell'insetto vettore. Le larve penetrano all'interno della pianta attraverso il foro di ovideposizione e qui si riproducono soprattutto alimentandosi di microrganismi fungini eventualmente presenti nel tessuto legnoso (es. *Ceratocystis* spp., *Alternaria* spp.). Quando a fine inverno/inizio primavera la popolazione non si moltiplica più e comincia a declinare, compare un differente tipo di larva di terzo stadio, nota come "larva di dispersione" capace di sopravvivere per lunghi periodi di tempo in condizioni sfavorevoli, grazie a una cuticola più spessa ed a un elevato contenuto di lipidi. Le larve di dispersione si aggregano ai funghi presenti nelle camere pupali del cerambicide vettore. Al momento dello sfarfallamento dell'insetto, il nematode compie la muta, trasformandosi in J4, nota come "larva durevole" (Wingfield et al., 1982). Lo sfarfallamento dei *Monochamus* dalle piante ormai compromesse favorisce il trasporto del nematode su nuove conifere ancora indenni, dove lo stesso cerambicide si alimenta per la maturazione delle gonadi.

Il ciclo micetofago può essere considerato come il ciclo normale di *B. xylophilus*, ma quando il nematode viene trasmesso a specie di conifere suscettibili non in deperimento comincia il ciclo fitofago, in cui i nematodi invadono i canali resiniferi e, nutrendosi a spese delle cellule epiteliali, causano la morte delle cellule parenchimatiche assiali e radiali, provocando così una riduzione nella produzione di resine. *B. xylophilus* all'interno dei tessuti legnosi si moltiplica rapidamente e nel giro di 2-3 settimane dall'infestazione si manifestano i primi sintomi di appassimento con pronunciata clorosi e cessazione della produzione di essudati oleoresinosi.

Le piante indebolite dall'attacco di *B. xylophilus* attraggono così le femmine di *Monochamus* in cerca di idonei siti di ovideposizione, favorendo in tal modo la contaminazione di nuovi vettori destinati a diffondere ulteriormente il nematode.

2.2 Sintomi/segni

Il primo sintomo della presenza di *B. xylophilus* è una evidente riduzione della produzione di oleoresina nelle piante attaccate; la traspirazione delle foglie diminuisce e successivamente si interrompe del tutto provocando l'ingiallimento e l'avvizzimento degli aghi e la successiva morte della pianta ospite (Mamiya, 1983). L'avvizzimento può comparire dapprima su un solo ramo ("bandiera"),

sebbene l'intero albero possa successivamente mostrare sintomi generalizzati (Malek e Appleby, 1984).

2.3 Piante ospiti (ospiti principali/minori)

Bursaphelenchus xylophilus è polifago nell'ambito del genere *Pinus*, anche se può ritrovarsi su altre conifere: *Picea*, *Abies*, *Larix*, *Cedrus*, *Chamaecyparis*, *Pseudotsuga*, ecc. (Evans et al., 1996) ad eccezione di *Thuja plicata*.

Le principali specie forestali attaccate sono le seguenti:

- Pini asiatici: *P. bungeana*, *P. densiflora*, *P. luchuensis*, *P. massoniana*, *P. thumbergii*
- Pini europei: *P. mugo*, *P. nigra*, *P. pinaster*, *P. sylvestris*

3. Siti di maggiore rischio

3.1 Aree a rischio/ Risk areas

Siti con alto rischio di infestazione di *B. xylophilus* sono le foreste con significativa presenza di conifere, soprattutto se degradate da agenti abiotici (es. siccità, inquinamento, forti venti, incendi, neve) o biotici (attaccate da insetti del legno, specificatamente dove accertata la presenza del vettore *Monochamus*); i vivai forestali di conifere e i vivai commerciali di piante ornamentali che importano o coltivano conifere.

Inoltre, l'attività umana è nota per essere la principale fonte di dispersione su grandi distanze di molti nematodi fitoparassiti. *B. xylophilus* e i suoi vettori, infatti, sono stati intercettati negli anni, in diverse occasioni nel commercio internazionale di legname, in prodotti in legno e imballaggi a base di conifere o cortecce per pacciamatura. Quindi, le aree a rischio da tenere sotto controllo dovrebbero essere: le aree immediatamente circostanti i punti di arrivo e stoccaggio di legname, i cortili circostanti aziende che lavorano legname, le aree di stoccaggio di merci confezionate in imballaggi di legno o su pallet di conifere, le segherie o le aziende ove si producono materiali legnosi provenienti da conifere.

Secondo la codifica Europhyt, i siti a maggiore rischio sono quelli di seguito elencati:

All'aperto: 1.4 foresta (di conifere e foresta mista); 2.1 giardini ad accesso privato; 2.2 siti pubblici; 2.3 aree e parchi naturali protette; 2.4 piante isolate o in gruppi in ambiente naturale/seminaturale; 2.5.1 siti commerciali che utilizzano materiale da imballaggio in legno; 2.5.2 centro per il giardinaggio; 2.5.5 aree all'aperto di industrie di lavorazione del legno; 2.5.6 aeroporti, porti, strade,

ferrovie; 2.5.7 punti di ingresso; 2.5.8 aree a rischio in base alla normativa specifica dell'organismo nocivo

Al chiuso: 3.2 sito privato, diverso da una serra; 3.4.2 centro per giardinaggio; 3.4.3 industrie di lavorazione del legno; 3.4.4 aeroporti, porti; 3.4.8 altro (centro stoccaggio e trasporto)

4. Indagine/survey

Modalità di indagine previste

- ✓ Osservazione visiva – Visual Inspection
- ✓ Campionamento – Sample Taking
- ✓ Indagine con trappole - Trapping

4.1 Osservazione visiva

Aspetti generali: L'analisi visiva è condotta su piante di conifere in ambiente naturale, quali foreste, giardini, siti pubblici e avviene osservando lo stato fitosanitario delle piante (deperienti, morte in piedi), la presenza di fori sul tronco prodotti da insetti cerambicidi e la presenza o meno di colature di resina.


Sito di Indagine	Cosa guardare	Periodo di osservazione	Immagini
Ambiente naturale (1.4; 2.1; 2.2; 2.3; 2.4)	Avvizzimento e ingiallimento degli aghi Riduzione e/o interruzione degli essudati oleoresinosi	Tutto l'anno (preferibilmente a fine estate per segnalare le nuove piante sintomatiche)	



Foto: Leonardo Marianelli (CREA-DC); Lorenzo Marziali (SFR-Toscana)

Presenza di fori e gallerie di cerambicidi del genere *Monochamus* (fori di uscita circolari con diametro superiore a 0,5 cm)

Tutto l'anno





Foto: Fabrizio Pennacchio (CREA-DC)

4.2 Campionamento

Aspetti generali:

Il campionamento in ambiente naturale è eseguito solo su piante deperienti (presenza di ingiallimento degli aghi su più del 50% della chioma) o morte in piedi da non più di un anno (aghi ancora presenti sulla chioma, 100% imbruniti).



Il campione può essere prelevato mediante l'utilizzo di trapano, alimentato a batteria, a bassa velocità (punte per legno consigliate con diametro maggiore di 17 mm; es. mecchie), scalpello ed altri strumenti di taglio o succhiello di Pressler. È importante cambiare la punta utilizzata per il prelievo del legno dopo ogni foro effettuato al fine di evitare il surriscaldamento del materiale e la conseguente morte degli eventuali nematodi presenti nella matrice vegetale campionata. Per evitare la contaminazione incrociata tra campioni prelevati in posizioni geografiche diverse, a fine campionamento, si consiglia di disinfettare le punte non surriscaldate, immergendo le stesse in alcol (> 70%). L'alcol dovrà essere completamente evaporato prima del nuovo utilizzo della punta.

Il materiale (min. 80-100 gr. di legno) deve essere prelevato fino ad una profondità massima di circa 5-7 cm per foro e preferibilmente da 1 a 3 piante per sito d'indagine. Ogni pianta deve essere campionata eseguendo più fori a diverse altezze e posizioni del fusto.

Per quanto riguarda il materiale legnoso prelevato da siti di lavorazione/stoccaggio del legname e dai siti commerciali che usano materiale di legno da imballaggio e pallets, il campionamento può essere effettuato con l'attrezzatura sopra indicata, avendo cura di prelevare materiale legnoso in più porzioni della stessa asse o dello stesso pallet.

Nei centri di giardinaggio dovranno essere campionati i sacchi di cortecce da pacciamatura. Ogni campione deve essere composto da aliquote di cortecce prelevate da più sacchi appartenenti allo

stesso lotto e quindi amalgamate, oppure più aliquote prelevate da uno stesso sacco ma in punti diversi (peso finale del campione circa 0,5 kg).


Sito di Indagine	Cosa prelevare	Periodo di Prelievo	Come conservare	Immagini
<p>Ambiente naturale (1.4; 2.1; 2.2; 2.3; 2.4)</p>	<p>Trucioli/scaglie di legno sotto corteccia.</p> <p>In alternativa, possono essere prelevate rondelle di legno a varie altezze del fusto.</p>	<p>Tutto l'anno (in ambienti caratterizzati da inverni rigidi, è preferibile il periodo compreso fra Febbraio-Ottobre)</p>	<p>Il campione di legno prelevato deve essere inumidito con acqua e successivamente chiuso in un sacchetto di plastica. Per ogni campione devono essere riportate le seguenti informazioni: data di prelievo, coordinate GPS del punto di prelievo e specie vegetale. Il materiale prelevato deve essere mantenuto al fresco (es. borsa frigo) e recapitato al laboratorio di analisi nematologica di riferimento nel più breve tempo possibile.</p>	 <p>Foto: Giulia Torrini (CREA-DC)</p>  <p>Foto: Giulia Torrini (CREA-DC)</p>

<p>Industrie del legno, siti commerciali che usano materiale di legno da imballaggio, WPM, wooden pallets (2.5.1; 2.5.2; 2.5.5; 2.5.6; 2.5.7; 2.5.8; 3.2; 3.4.2; 3.4.3; 3.4.4; 3.4.8)</p>	<p>Porzioni di pallet (sia nuovi che usati), materiali per stivaggio, casse, gabbie, fusti, bobine, pianali di carico, skid, segati, tronchi che presentano aree azzurre o fori di sfarfallamento di insetti.</p>	<p>Tutto l'anno</p>	<p>Vedi sopra</p>	 <p>Foto: Giulia Torrini (CREA-DC)</p>
<p>Centro per il giardinaggio (2.5.1; 3.4.2)</p>	<p>Cortecce di conifere per pacciamatura.</p>	<p>Tutto l'anno</p>	<p>Vedi sopra</p>	 <p>Foto: Giulia Torrini (CREA-DC)</p>

4.3 Indagine con trappole

Aspetti generali:

In natura *B. xylophilus* viene trasportato da una pianta all'altra da insetti vettori del genere *Monochamus*. Questi insetti sono ampiamente diffusi nel territorio italiano e quindi è importante effettuare un corretto monitoraggio per controllare l'eventuale presenza dei nematodi fitoparassiti nell'insetto vettore.

Sito di indagine	Tipologia di trappola	Posizionamento trappola	Periodo di esposizione - frequenza consigliabile dei controlli	Immagini
<p>Punti d'ingresso del legname d'importazione (aeroporti, porti) (2.5.6; 2.5.7; 2.5.8)</p> <p>Piazzali di stoccaggio e/o di lavorazione di materiale da imballaggio o di legname (2.5.5)</p> <p>Foreste di conifere vicine a siti a rischio (1.4; 2.2; 2.3; 2.4)</p>	<p>Multi-funnel (modello a imbuto sovrapposti)</p> <p style="text-align: center;">o</p> <p>Cross-vane (Modello a intercettazione)</p> <p>Attivate con:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Feromone di aggregazione - Cairomone (2-undecyloxy-1-ethanol, ipsenol e 2-methyl- 3-buten-1-ol) - Alpha-pinene <p>(si consiglia di condurre il monitoraggio mediante l'uso di Cross-vane</p>	<p>Le trappole devono essere posizionate nel luogo da monitorare, attaccate a un supporto adeguato a circa 2 m da terra.</p> <ul style="list-style-type: none"> - La distanza tra le trappole deve essere di 100-150 m, posizionandole in spazi aperti. - Ogni diffusore del pacchetto va collocato in punti diversi della stessa trappola: il diffusore del cairomone è consigliato posizionarlo nella parte più alta della trappola, mentre il diffusore del feromone nella parte più bassa. 	<p>Giugno - Settembre (periodo corrispondente alla presenza nell'ambiente degli adulti di <i>Monochamus</i>)</p> <p>La persistenza degli attrattivi è di circa 45-50 giorni (in base alle condizioni di umidità temperatura e ventilazione).</p> <p>Effettuare i controlli delle trappole preferibilmente ogni 7 – 10 giorni, al fine di raccogliere gli insetti ancora vivi oppure morti da poco tempo. Il materiale prelevato deve essere mantenuto a secco e recapitato al laboratorio di analisi nematologica di riferimento nel più breve tempo possibile,</p>	 <p style="text-align: center;">Foto: Fabrizio Pennacchio (CREA-DC)</p>

Servizio fitosanitario nazionale

Scheda tecnica ufficiale n. 57

Schede indagine organismi nocivi

Scheda tecnica per indagini su: *Bursaphelenchus xylophilus*

Pag. 15 di 19

	di colore bianco o nero)		avendo cura di mantenerlo al fresco sin dalla raccolta (non congelato). Questa tempistica è necessaria per estrarre eventuali larve durevoli di nematodi associate all'insetto catturato.	Foto: Fabrizio Pennacchio (CREA-DC)
--	--------------------------	--	---	-------------------------------------

5. Diagnosi

Protocolli ufficiali SFN

Non disponibile

Standard di riferimento

- PM 7/4 (4) *Bursaphelenchus xylophilus*. EPPO Bulletin (2023) 53, 156–183
- PM 7/119 (1) Nematode extraction. EPPO Bulletin (2013) 43, 471–495

5.1 Campione/Matrice

- Cortecce, trucioli, chips, tasselli o rondelle di legno di piccole dimensioni
- Insetti adulti di cerambicidi del genere *Monochamus*

5.2 Test per l'identificazione

Tipologie diagnostiche:

- **Extraction** (per i campioni di trucioli di legno, scaglie corticali, rosura e vettore ed è completo di osservazione allo stereomicroscopio)
- **Microscopically identification** (per identificazione della specie di nematodi)
- **PCR**
- **LAMP**
- **PCR+Sequencing**
- **Real time PCR**

Estrazione:

I nematodi vivi possono essere estratti dal legno infestato utilizzando la tecnica dell'imbuto di Baermann o delle bacinelle di Oostenbrink (EPPO, 2013). Piccoli pezzi di legno (non più grandi di 1 cm di larghezza), scaglie corticali o trucioli di legno vengono immersi in acqua per circa 24-72 ore. I nematodi migrano dal legno nell'acqua e possono essere raccolti per il riconoscimento specifico.

Per l'estrazione da vettore, l'insetto adulto deve essere tagliato a pezzi e utilizzata la tecnica dell'imbuto di Baermann o delle bacinelle di Oostenbrink per l'estrazione dei nematodi nelle 24 ore.

L'esame diretto è possibile trasferendo gli insetti in una capsula Petri con acqua e tagliati a pezzi con un bisturi per liberare i nematodi. Sia i nematodi mobili che quelli morti verranno rilasciati dal corpo dell'insetto entro 30-60 minuti (EPPO; 2013, 2023).

Identificazione morfologica:

Per l'identificazione morfologica di *B. xylophilus* sono richiesti esemplari adulti di entrambi i sessi. L'analisi richiede la preparazione di vetrini di buona qualità e l'utilizzo di un microscopio ad alta risoluzione (dotato di obiettivo a immersione in olio 100x e di oculare micrometrico o di una videocamera con sistema di misurazione). Per le caratteristiche morfologiche e i valori morfometrici fare riferimento al PM 7/4 (EPPO, 2023). (Fig.6).

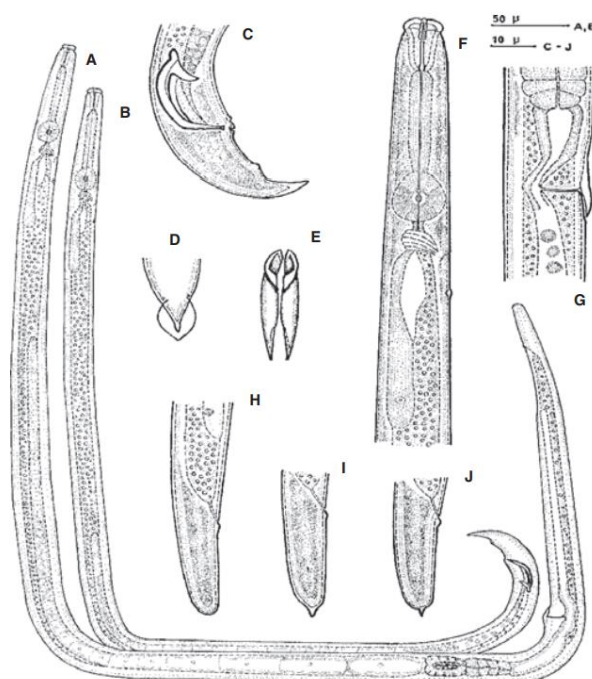


Fig. 6 - *Bursaphelenchus xylophilus*. A: femmina; B: maschio; C: coda del maschio; D: visione ventrale della coda del maschio con bursa; E: visione ventrale delle spicole; F: parte anteriore della femmina; G: vulva; H-J: coda della femmina (EPPO, 2023).

Identificazione molecolare:

Molti test molecolari sono disponibili per l'identificazione di *B. xylophilus*, tra cui: PCR convenzionale (Matsunaga & Togashi, 2004; Castagnone et al., 2005), ITS RFLP PCR (Burgermeister et al., 2009), LAMP (adattato da Kikuchi et al. 2009), RT-PCR (François et al., 2007; Filipiak et al., 2019) e sequenziamento del DNA basato su 18S rDNA e 28S rDNA (EPPO, 2021).

Bibliografia

- Braasch H & Schönfeld U (2015) Improved morphological key to the species of the *xylophilus* group of the genus *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937. *EPPO Bulletin* 45(1), 73–80.
- Burgermeister W, Braasch H, Metge K, Gu J, Schröder T & Woldt E (2009) ITS-RFLP analysis, an efficient tool for identification of *Bursaphelenchus* species. *Nematology* 11, 649–668.
- Castagnone C, Abad P, Castagnone-Sereno P (2005) Satellite DNA based species specific identification of single individuals of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae). *European Journal of Plant Pathology* 112, 191–193.
- EPPO (2013) EPPO Standard PM 7/119 (1) Nematode extraction. *EPPO Bulletin* 43(3), 471–496.
- EPPO (2021) EPPO Standard PM 7/129 (2) DNA barcoding as an identification tool for a number of regulated pests. *EPPO Bulletin* 51(1), 100–143.
- EPPO (2023) EPPO Standards PM 7/4 (4) Diagnostic protocol for *Bursaphelenchus xylophilus*. *EPPO Bulletin* 53, 156–183.
- Evans HF, McNamara DG, Braasch H, Chadoeuf J & Magnusson C (1996). Pest Risk Analysis (PRA) for the territories of the European Union (as PRA area) on *Bursaphelenchus xylophilus* and its vectors in the genus *Monochamus*. *EPPO Bulletin* 26, 199–249.
- Filipiak A, Wieczorek P, Tomalak M (2019) A fast and sensitive mul-tiplex real-time PCR assay for simultaneous identification of *Bursaphelenchus xylophilus*, *B. mucronatus* and *B. fraudulentus*-three closely related species from the *xylophilus* group. *European Journal of Plant Pathology*, 155, 239–251.
- François C, Castagnone C, Boonham N, Tomlinson J, Lawson R, Hockland S, Quill J, Vieira P, Mota M & Castagnone-Sereno P (2007) Satellite DNA as a target for TaqMan real-time PCR detection of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Molecular Plant Pathology* 8, 803–809.
- Hasegawa K & Miwa J (2008) Embriology and cytology of *Bursaphelenchus xylophilus*. In: T. Schroeder, ed. Pine Wilt Disease Conference, 15-18 October 2013, Braunschweig, Germany. Berichte aus dem Julius Kühn Institut, 169, 46–47.
- Linit MJ (1990) Transmission of pinewood nematode through feeding wounds of *Monochamus carolinensis* (Coleoptera: Cerambycidae). *Journal of Nematology*, 22(2), 231–236.
- Kikuchi T, Aikawa T, Oeda Y, Karim N & Kanzaki N (2009) A rapid and precise diagnostic method for detecting the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* by loop-mediated isothermal amplification. *Phytopathology* 99, 1365–1369.
- Malek RB & Appleby JE (1984) Epidemiology of pine wilt in Illinois. *Plant Disease* 68, 180–186.
- Mamiya Y (1983) Pathology of pine wilt disease caused by *Bursaphelenchus xylophilus*. *Annual Review of Phytopathology* 21, 201–220.

- Matsunaga K & Togashi K (2004) Among-tree difference in the inhibition of systemic dispersal of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) by *Pinus densiflora*. *Applied Entomology and Zoology* 39, 271–277
- Nickle WR, Golden AM, Mamiya Y, Wergin WP (1981) On the taxonomy and morphology of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhner 1934) Nickle 1971. *Journal of Nematology* 13, 385–392.
- Penas AC, Dias LS & Mota MM (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, Vieira P, Mota M & Kulinich O (2005) A synopsis of the genus *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 (Aphelenchida: Parasitaphelenchidae) with keys to species. *Nematology* 7 (3), 393–458.
- Sousa E, Bravo MA, Pires J, Naves P, Penas AC, Bonifácio L & Mota MM (2001) *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) associated with *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera: Cerambycidae) in Portugal. *Nematology* 3, 89–91.
- Wingfield MJ (1987) A comparison of the mycophagous and the phytophagous phases of the pine wood nematode. In *Pathogenicity of the pine wood nematode* (ed. Wingfield MJ), pp. 81–90. Symposium Series, St Paul, MN, APS Press.