

**Федеральное государственное учреждение  
«ВСЕРОССИЙСКИЙ ЦЕНТР КАРАНТИНА РАСТЕНИЙ»  
(ФГУ «ВНИИКР»)**

**СТАНДАРТ ОРГАНИЗАЦИИ**

**СОСНОВАЯ СТВОЛОВАЯ НЕМАТОДА**

***BURSAPHELENCHUS XYLOPHILUS***

**Методы выявления и идентификации**

**СТО 04731278-005-2009**

**Москва**

**2009**

## **Предисловие**

Целью разработки данного стандарта является нормативное обеспечение работ по выявлению и идентификации сосновой стволовой нематоды в лесонасаждениях и лесоматериалах.

### **Сведения о стандарте**

1. РАЗРАБОТАН Отделом стандартизации Федерального государственного учреждения «Всероссийский центр карантина растений», далее - ФГУ «ВНИИКР», при участии разработчиков инструкции по выявлению и диагностике сосновой стволовой нематоды и мерам по предотвращению ее заноса, локализации и ликвидации очагов [1].
2. УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Директора ФГУ «ВНИИКР» Магомедова У.Ш. от «\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ г. № \_\_\_\_.
3. ДЕРЖАТЕЛЬ ПОДЛИННИКА ФГУ «ВНИИКР».
4. ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ.

Распространение и применение настоящего стандарта осуществляется в соответствии с действующим законодательством и с соблюдением правил, установленных СТО 04731278-001-2009 «Стандарты организации ФГУ «ВНИИКР». Порядок разработки, утверждения, учета, изменения и отмены».

## Содержание

1. Область применения
  2. Нормативные ссылки
  3. Термины и определения
  4. Отбор проб и образцов
    - 4.1 Отбор проб от лесонасаждений
    - 4.2 Отбор проб от лесоматериалов на складах и в портах
  5. Выделение нематод
    - 5.1 Общие положения
    - 5.2 Метод Бермана
  6. Хранение
    - 6.1 Фиксация
    - 6.2 Хранение в древесине
  7. Культивирование
    - 7.1 Культивирование нематод на фитопатогенных грибах
    - 7.2 Культивирование нематод на древесных спилах
  8. Идентификация
    - 8.1 ПЦР-FLASH – анализ
- Приложение А
- Приложение Б
- Приложение В
- Приложение Г
- Приложение Д
- Приложение Е
- Библиография

---

**СОСНОВАЯ СТВОЛОВАЯ НЕМАТОДА****BURSAPHELENCHUS XYLOPHILUS****Методы выявления и идентификации**

---

Дата введения \_\_\_\_\_

## 1 Область применения

Настоящий стандарт организации определяет основные методы выявления и идентификации сосновой стволовой нематоды *Bursaphelenchus xylophilus* в лесонасаждениях и лесоматериалах.

## 2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 20562-75 (СТ СЭВ 1741-79) «Карантин растений. Термины и определения».

ГОСТ 21507-81 «Защита растений. Термины и определения».

СТО 04731278-001-2009 «Стандарты организации ФГУ «ВНИИКР». Порядок разработки, утверждения, учета, изменения и отмены».

СТО 04731278-004-2009 «Картофельные цистообразующие нематоды. *Globodera rostochiensis* и *Globodera pallida*. Методы идентификации».

ОК (МК (ИСО/ИНФКО МКС) 001–96) 001–2000 Общероссийский классификатор стандартов.

МСФМ № 5. Международные стандарты по фитосанитарным мерам. Глоссарий фитосанитарных терминов, 2007. ФАО, Рим. [10]

МСФМ № 15. Международные стандарты по фитосанитарным мерам. Руководство по регулированию древесных упаковочных материалов в международной торговле, 2002. ФАО, Рим. [11]

### **3 Термины и определения**

В настоящем стандарте организации применены термины и определения в соответствии с ГОСТ 20562-75, МСФМ № 5 [10] и ГОСТ 2150-81.

### **4 Отбор проб и образцов**

#### **4.1 Отбор проб в лесонасаждениях**

Для определения зараженности лесонасаждений хвойных пород нематодами рода *Bursaphelenchus* исследуют как погибшие деревья, так и деревья на всех стадиях усыхания.

4.1.1 Пробы древесины берут со стволовой части, на значительном расстоянии от комля, и усыхающие ветки 1-2-го порядков.

4.1.2 Из стволовой части и веток выпиливают участки древесины толщиной 2-5 см или вырубает топором кусок древесины размером приблизительно 10 x 10 см. После взятия каждой пробы, для избежания заноса инфекции на здоровое дерево, сверло или лезвие топора протирают ватой, смоченной 3% перекисью водорода или этиловым спиртом.

4.1.3 При взятии проб буром (специальной аккумуляторной электродрелью) содержимое помещается в бумажный или полиэтиленовый конверт. На взятом куске древесины ставят пометку, номер или краткую информацию, а в рабочем журнале делают запись о взятии пробы на нематод.

4.1.4 Необходимо не допустить высыхания образца в процессе пересылки и транспортировки. Для этого куски древесины слегка смачивают водой и плотно обертывают газетой, так чтобы газета была влажной. Снаружи образец обертывают тонкой рулонной пищевой полиэтиленовой пленкой, калькой, или вощеной бумагой. К каждой пробе прикрепляют подробную этикетку с указанием даты сбора, породы и возраста дерева, точного местоположения лесонасаждений, наличия личинок жуков в древесине.

4.1.5 В случае обнаружения насаждения, в котором имеются усыхающие деревья с признаками поражения сосновой стволовой нематодой, необходимо равномерно по

площади отобрать 10 модельных деревьев с наиболее типичными признаками. Деревья необходимо повалить, и в первую очередь оценить наличие признаков поражения их вредителями или возбудителями болезней лесных пород. Обследование проводится с привлечением инженера-лесопатолога и специалистов из местной службы защиты леса. После оценки всех возможных факторов, приведших к усыханию деревьев, отбираются пробы с поваленных деревьев, из срединной и вершинной части ствола. Далее в лабораторных условиях следует произвести выделение и определение нематод.

## **4.2 Отбор проб лесоматериалов на складах и в портах**

4.2.1 При обследовании пиломатериалов (штабелей досок, поддонов, упаковочных ящиков) на нематод рода *Bursaphelenchus* на складах и в портах отбираются пробы приблизительно 10 x 5 x 5 см в местах, содержащих личиночные ходы стволовых вредителей, или же имеющих признаки поражения деревоокрашивающими грибами (синевы древесины и проч.). Следует обратить внимание на наличие ходов, оставленных усачами рода *Monochamus*: летные отверстия жуков, ходы личинок. Это крупные отверстия диаметром более 3 мм. Взятие древесных проб в тех местах, где имеются ходы жуков рода *Monochamus*, увеличивает вероятность нахождения нематод в этих образцах, т.к. нематоды переносятся жуками и концентрируются в большей степени вокруг ходов усачей.

4.2.2 В случае полного отсутствия признаков поражения древесины насекомыми или грибами достаточно отобрать 2-3 пробы от всей партии, выбирая самые низкокачественные участки древесной поверхности.

4.2.3 При досмотре лесоматериалов древесные пробы отбираются, в первую очередь, с участков ствола, имеющих признаки поражения усачами и деревоокрашивающими грибами.

4.2.4 Пробы отбираются из каждого 10-го бревна при партии до 50 бревен и из каждого 30-го при большей партии. Если лесоматериалы представлены пиломатериалами в упаковке, то пробы берутся от каждого пакета.

4.2.5 Лесоматериалы и тара, подвергшиеся термообработке или фумигации, что подтверждается наличием соответствующего штампа, согласно МСФМ № 15 [11], могут не обследоваться на зараженность нематодами *Bursaphelenchus* spp.

## **5 Выделение нематод**

### **5.1 Общие положения**

5.1.1 Взятые древесные пробы измельчают топором на щепу, которую затем разрезают секатором на мелкие кусочки. Перед выделением нематод кусочки древесины взвешивают с целью дальнейшего пересчета выделенных нематод в 1 г. Выделение нематод проводится методом Бермана (п.п. 5.2).

5.1.2 Из свежих пиломатериалов нематоды могут выделяться сразу. Если исследуются поддоны, доски упаковочных ящиков, то целесообразно инкубировать такую древесину в термостате, т.к. нематод в такой высушенной древесине мало и находятся они в 3-й устойчивой личиночной стадии. В связи с этим необходимо их размножить. Для этого мелкие кусочки древесины, разрезанные секатором, кладут в контейнер с герметично закрывающейся крышкой, контейнер помещают в термостат при температуре 25-26 °С на 6 дней. Кусочки древесины необходимо смочить водой в количестве 10-15% от веса образца (вода должна впитаться в древесину за 12 час.)

## **5.2 Метод Бермана**

5.2.1 На горло воронки надевают резиновую трубку соответствующего диаметра и длиной 4-5 см. В другой конец трубки вставляют небольшую пробирку. В воронку помещают металлическое сито и марлю (или белую бумажную салфетку в 2 слоя) для того, чтобы кусочки древесины не тонули и не забивали отверстие воронки.

5.2.2 Сито с салфеткой следует смочить водой, чтобы под ним в дальнейшем не образовался воздушный пузырь, и поместить на него расщепленные и измельченные секатором кусочки древесины. Воронку заполняют водой до уровня 2 см выше дна сита. Время экспозиции тканей в воде 12 часов при комнатной температуре.

## **6 Хранение**

Хранение нематод возможно двумя способами: в фиксированном виде или в живой культуре.

### **6.1 Фиксация**

6.1.1 Нематод фиксируют раствором формалина, добавляя его в пробирку в таком количестве, чтобы общая концентрация формалина в суспензии с нематодами составляла 4-5%.

6.1.2 Необходимо учитывать, что концентрированный формалин имеет концентрацию 38%, т.е. для достижения 4-5% концентрации формалина к объему водной суспензии с нематодами необходимо добавить 1/8-1/10 объемную часть концентрированного формалина.

6.1.2 Хорошим фиксатором для нематод является раствор ТАФ. Для получения в дальнейшем более качественных препаратов с нематодами пробирку и фиксатор перед фиксацией желательно подогреть по методу водяной бани до 45-50 °С в течение 3-5 мин.

*Примечание: раствор ТАФ - формалин 7 см<sup>3</sup>, триэтаноламин 2 см<sup>3</sup>, дистиллированная вода 91 см<sup>3</sup>.*

В фиксированном виде в плотно закрытой пробирке материал может храниться в течение многих лет. Во избежание испарения фиксатора край крышки пробирке обмотать пленкой парафильм в 2 слоя.

## **6.2 Хранение в древесине**

6.2.1 Для лучшего сохранения нематод в древесине пробы необходимо в полевых условиях хранить в прохладном, темном месте, во избежание их высыхания.

6.2.2 В лаборатории наилучшим местом хранения является холодильник с температурой +5 - +10 °С. Нежелательна также чрезмерная влажность, т.к. это способствует развитию плесневых грибов.

6.2.3 В правильно сохраняемом куске древесины нематоды могут существовать в течение от 6-месяцев до 3 лет.

## **6.3 Хранение в воде**

6.3.1 Выделенные с помощью метода Бермана нематоды могут довольно долго (до месяца и больше) храниться в чашке Петри или пробирке с водой в холодильнике при температуре 5-10 °. Нематоды при этом сохраняют свою жизнеспособность. При хранении в пробирке важно соотношение воды и кислорода воздуха (т.к. нематоды дышат): нужно дать осесть суспензии нематод (поставить пробирку вертикально в держатель на срок не менее часа или отцентрифугировать пробирки в течение минуты при 3000 об./мин) и затем осторожно узконосой пипеткой Пастера убрать сверху надосадочную жидкость, оставив не более 1/5 части объема пробирки.

# **7 Культивирование**

При определении нематод рода *Bursaphelenchus* требуется наличие живых особей. Кроме того, в насекомых обычно содержатся в массе особые трансмиссивные личинки 4-го возраста (*dauerlarvae*), морфологически существенно отличающиеся от всех других стадий развития *B. xylophilus*. Идентификация нематод до вида проводится по самцам и самкам. В связи с этим необходимо размножить и сохранить нематод для дальнейшего их изучения. Существует два метода размножения нематод рода *Bursaphelenchus*: метод

культивирования их на фитопатогенных грибах и метод размножения в кусках древесины хвойных пород.

### **7.1 Культивирование нематод на фитопатогенных грибах**

В качестве субстрата для размножения нематод используют культуры фитопатогенных грибов родов *Botrytis*, *Alternaria*. Грибы выращивают по методикам, принятым в фитопатологии, на твердых питательных средах: сусле-агаре, картофельном глюкозном агаре (PDA) и других.

7.1.1 При полном зарастании питательного субстрата мицелием грибов (5-7 дней при комнатной температуре) туда помещают нематод в капле дистиллированной воды.

7.1.2 После накопления в достаточном количестве нематод на грибном субстрате (гриб исчезает, клубки нематод видны в стереомикроскоп на верхней крышке и бортах контейнера) их в контейнерах с этим субстратом помещают в холодильник на длительное хранение до 6 мес., затем необходим пересев на новый субстрат. Данный метод является более надежным для сохранения нематод.

### **7.2 Культивирование нематод на древесных спилах**

7.2.1 Ствол или толстые ветки живого дерева в диаметре 3-10 см распиливают на участки (спилы) длиной 4-6 см.

7.2.2 Торцевые концы парафинируют, кратковременно погружая их в расплавленный парафин. В боковой поверхности высверливают тонким сверлом отверстие до сердцевины ствола, в которое вносят суспензию нематод.

7.2.3 Отверстие закрывают ватным тампоном чтобы избежать обратного выливания суспензии, сверху покрывают пленкой парафильм, садовым варом, пластилином или обматывают изолентой. *Примечание: нематоды вида B. xylophilus предпочитают для размножения температуру 30-33 °С, B. micronatus - 20-26 °С, а наилучшим субстратом для культивирования обоих видов нематод является сосна обыкновенная Pinus sylvestris.*

## **8 Идентификация**

Определение нематод проводится с помощью микроскопа на временных и постоянных препаратах, приготовленных из фиксированного материала стандартными методами, принятыми в нематологии. Требования к приготовлению препаратов нематод содержатся в СТО 04731278-004-2009 «Картофельные цистообразующие нематоды. *Globodera rostochiensis* и *Globodera pallida*. Методы идентификации» в разделе 6.

Для определения нематод до отряда, семейства и рода используют определители, имеющиеся в монографиях и публикациях [3, 8, 17].

### **8.1 ПЦР-FLASH – анализ**

Метод позволяет быстро и с высокой чувствительностью и специфичностью определять, содержится ли в данной пробе даже микроколичества ДНК патогена, к которому подобраны специфические праймеры и зонды. Введение специально синтезированных флуоресцентных зондов позволяет сделать детекцию ДНК целевого патогена наглядной и доступной для измерения приборами, улавливающими излучение нужной длины волны. Производимые наборы для ПЦР-диагностики позволяют выявить особи сосновой стволовой нематоды *Bursaphelenchus xylophilus* или хвойной древесной нематоды *Bursaphelenchus mucronatus*. Для ПЦР-теста достаточно выделить ДНК из одной особи из моновидовой культуры *Bursaphelenchus* или из образца древесины: могут быть использованы как половозрелые особи (самцы и самки), так и личинки [2, 9].

Данный метод и требования к его проведению содержатся в СТО 04731278-004-2009 «Картофельные цистообразующие нематоды. *Globodera rostochiensis* и *Globodera pallida*. Методы идентификации» в разделе 8 и в документе «Инструкция по применению наборов реагентов для выявления ДНК сосновых стволовых нематод *Bursaphelenchus xylophilus* и *Bursaphelenchus mucronatus*» [2] .

## **Приложение А**

**(справочное)**

### **Общие сведения о *Bursaphelenchus xylophilus***

**Таксономическое положение:** *Nematoda: Aphelenchoididae*

**Название:** *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhner, 1934) Nickle, 1970

**Синонимы:** *Aphelenchoides xylophilus* Steiner & Buhner

*Bursaphelenchus lignicolus* Mamiya & Kiyohara

**Компьютерный код Байера:** BURSXY

**Карантинный статус:** ЕОКЗР А1 № 158

Сосновая стволовая нематода (син.: сосновая древесная нематода) *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhner, 1934) Nickle, 1970 - опасный паразит хвойных пород, вызывающий массовое увядание и гибель деревьев.

Впервые увядание местных видов сосны, вызываемое нематодой *B. xylophilus*, отмечено в Японии в 1913 г. (Приложение Е, рис. 2) В 1970-80-х годах потери строевого леса в Японии от *B. xylophilus* составляли ежегодно 2 млн м<sup>3</sup> древесины. В настоящее время сосновая нематода распространена фактически по всей территории Японии [1, 14].

Согласно общепринятой гипотезе, сосновая стволовая нематода *B. xylophilus* в начале XX столетия была завезена из Северной Америки в Японию, где она широко распространилась. В настоящее время данный вид распространен в юго-восточных районах КНР, обнаружен в Республике Южная Корея. Очаг сосновой стволовой нематоды *B. xylophilus* радиусом 100 км зарегистрирован с 1998 г. в Западной Европе в портовой зоне Сетубал вблизи Лиссабона (Португалия), куда нематода, вероятно, попала из Китая. Вид *B. xylophilus* повсеместно встречается в США, Канаде, обнаружен в Мексике, однако массового поражения сосновых лесов на Северо-Американском континенте не наблюдается, т.к. местные породы хвойных устойчивы к данному возбудителю заболевания. Основной ущерб от вида *B. xylophilus* в Северной Америке определяется экономическими потерями ввиду карантинных санкций, введенных странами Европы и Азии на ввоз необработанной древесины из тех районов, где она распространена. Только лесным компаниям США эти санкции нанесли ущерб, оцениваемый в десятки миллиардов долларов [6].

Обследования лесонасаждений, проведенные в европейских странах, показали отсутствие сосновой стволовой нематоды на территории этих стран (за исключением Португалии). Начиная с 1986 года, сосновая стволовая нематода *Bursaphelenchus xylophilus* включена в перечни карантинных организмов большинства стран Европы и Азии, в том числе и России.

На территории России вид *B. xylophilus* не выявлен, однако проведенный анализ фитосанитарного риска сосновой стволовой нематоды [6, 7, 15, 16] показал, что данный карантинный вредитель представляет угрозу хвойным насаждениям на значительной части территории Российской Федерации.

### **Биология**

Жизненный цикл сосновой стволовой нематоды *B. xylophilus* тесно связан с насекомыми, которые переносят ее с одного дерева на другое (Приложение Д, рис.1). Основными переносчиками *B. xylophilus* являются жуки-усачи преимущественно рода *Monochamus*: *Monochamus alternatus* - в Японии и *M. carolinensis* - в США. В то же время сосновую стволовую нематоду обнаруживали и в других насекомых - златках, долгоносиках. Цикл развития *B. xylophilus* проходит следующим образом. В мае-июне молодые имаго усача, несущие *B. xylophilus*, выходят из древесины погибшего дерева и

заселяют здоровые деревья, где в течение 3-4 недель происходит их дополнительное питание на молодых веточках. В этот период происходит выход нематод из насекомого. Через раны, нанесенные жуками, нематоды проникают в древесину здорового дерева. Питаясь на эпителиальных клетках смоляных каналов, нематоды, при благоприятных условиях, быстро размножаются и расселяются по всему дереву. Пораженные нематодами ветки усыхают. Особенно сильно усыхание проявляется следующей весной, поскольку нематоды осенью в массе спускаются по сосудам ксилемы к основанию ствола и весной блокируют подъем соков к веткам дерева. После дополнительного питания и спаривания самки жуков откладывают яйца на ослабленные или погибшие деревья, где также происходит переход нематод из жуков в древесину через насечки, сделанные жуками для откладки яйца. Отродившиеся из яиц личинки жуков проникают под кору дерева, где проходят питание, а в конце своего развития осенью делают куколочную колыбельку, в которой происходит окукливание. Заражение насекомых нематодами происходит весной в колыбельке при выходе имаго из куколки, когда кутикула формирующегося имаго еще очень мягкая, но уже имеются крылья и дыхальца. Нематоды заселяют как наружные, так и внутренние органы насекомого, концентрируясь, гл. обр., в дыхальцах, трахеях и под надкрыльями жуков. Ранним летом происходит вылет зараженных нематодами жуков, приступающих к дополнительному питанию ветками, и цикл развития повторяется. В своем развитии, от яйца до имаго, *B. xylophilus* проходит четыре личиночных стадии. Развитие осуществляется двумя путями, существенно отличающимися друг от друга - с участием насекомых (*дисперсионный путь*) и без них (*пропагативный*) [14].

*Пропагативный* путь развития начинается весной и продолжается в течение всего периода вегетации растений. При благоприятных условиях, развитие сосновой стволовой нематоды, от яйца до имаго, завершается за 4-5 дней [14, 18]. Данный путь развития происходит после выхода нематод из жуков во время их дополнительного питания на веточках здоровых деревьев и после яйцекладки зараженных жуков. В результате фитофагии, а внутри умирающих деревьев - микохилофагии (на синих деревоокрашивающих грибах *Ophiostoma* и *Ceratocystis*) нематоды быстро размножаются, и численность их резко увеличивается.

Параллельно пропагативному пути развития в сильно пораженных нематодами погибающих деревьях (или бревнах) идет и *дисперсионный* путь развития. Особенность его в том, что он осуществляется при обязательном присутствии куколки насекомого. После линьки вышедшей из яйца личинки 2-го возраста (первая линька на личинку 2-го возраста происходит в яйце), образуется резистентная личинка 3-го возраста (J3d), морфологически и физиологически отличающаяся от личинки подобного возраста при

пропагативном пути развития. Резистентная личинка очень устойчива к различным неблагоприятным факторам: низким температурам, дефициту пищи и влаги. Доля резистентных личинок (J3d) в популяции нематод внутри древесины в зимний период возрастает.

К концу зимы нематоды линяют, и дисперсионная личинка после линьки превращается в особую трансмиссивную личинку 4-го возраста (J4d), иное ее название *дауерличинка* (*dauerlarvae*). Время появления трансмиссивных личинок связано с выходом из куколки насекомого молодого имаго. Внутри галереи, проточенной ранее осенью личинкой усача, трансмиссионные личинки, адаптированные физиологически к жуку-переносчику, расселяются по всему телу молодого имаго насекомого и проникают через его дыхальца, концентрируются в большей численности в трахейной системе и под надкрыльям. После вылета, при питании жуков на молодых веточках новых хвойных растений, трансмиссивные личинки покидают тело жука и попадают в ткани древесины здоровых деревьев, где линяют на особей пятого возраста - половозрелых самцов и самок, приступающих к питанию и скрещиванию. В результате быстро следующих друг за другом пропагативных поколений появляется множество особей и достигается бурное увеличение численности этих гельминтов в древесине.

### **Распространение**

Кроме Японии, в Азии сосновая стволовая нематода *B. xylophilus* обнаружена на Тайване и в Южной Корее, широко распространена в юго-восточной части Китая. В Северной Америке вид *B. xylophilus* широко распространен в лесах США и южных провинциях Канады. Имеется информация об обнаружении данного вида в Мексике.

Обследование лесов на наличие *B. xylophilus*, проведенное в большинстве стран Европы, показало отсутствие *B. xylophilus* на территории этих стран (кроме Португалии) и распространенность морфологически и генетически близкого вида *B. mucronatus* - хвойной древесной нематоды.

В России специальные исследования лесонасаждений на зараженность *B. xylophilus* проводились в различных регионах страны (Приморский край, Западная Сибирь, Урал, европейская часть России). При этом были повсеместно обнаружены только нематоды близкого вида – *B. mucronatus* [5].

### **Экономический ущерб**

Вред, наносимый нематодой *B. xylophilus* хвойным породам, весьма существенен. Наглядно это видно на примере Японии. В 80-х годах потери строевого леса от болезни, вызванной *B. xylophilus*, составили 1,5-2 млн куб. м.

Начиная с 1986 г. большинство стран ЕС ввели ограничения на импорт древесины хвойных пород из регионов, где распространена нематода *B. xylophilus*. Введение странами-импортерами эмбарго на поставки древесины и древесных продуктов из США и Канады, где обнаружена *B. xylophilus*, принесло убытки компаниям, экспортирующим лес, в десятки млн. долларов. В настоящее время сосновая стволовая нематода *B. xylophilus* внесена в списки карантинных объектов многих стран мира, включая Россию.

## Приложение Б

(справочное)

### Отличия *Bursaphelenchus xylophilus* от морфологически близких видов.

Известно 3 вида нематод, морфологически близких к виду *Bursaphelenchus xylophilus*. Это виды: *B. mucronatus*, *B. fraudulentus* и *B. kolymensis*. Отличия между ними представлены в таблице 1 и 2.

Вид *B. fraudulentus* обитает в древесине лиственных пород, а вид *B. kolymensis*, согласно исследованиям [12, 13], может считаться подвидом вида *B. mucronatus*.

Таким образом, при анализе проб нематод из хвойных пород необходимо различать два вида: *B. xylophilus* и *B. mucronatus*.

Таблица 1

### Основные морфометрические и аллометрические признаки нематод, близких *Bursaphelenchus xylophilus*

#### Самцы

	<b>L (мкм)</b>	<b>a</b>	<b>c</b>	<b>St (мкм)</b>	<b>Спикулы (мкм)</b>
<i>B. xylophilus</i> (форма "R")	520-601	35-45	21-29	13-14	19-23
<i>B. xylophilus</i> (форма "M")	-	-	-	-	-
<i>B. mucronatus</i>	640-970	39-51	26-36	14-16	23-29
<i>B. fraudulentus</i>	645-685	33-37	20-27	12-15	21-22

#### Самки

	<b>L (мкм)</b>	<b>a</b>	<b>c</b>	<b>St (мкм)</b>	<b>V (%)</b>
<i>B. xylophilus</i> (форма "R")	447-609	37-48	23-31	13	73-77
<i>B. xylophilus</i> (форма "M")	-	-	-	-	-
<i>B. mucronatus</i>	700-980	36-46	20-30	14-16	73-77
<i>B. fraudulentus</i>	675-900	32	21-26	12-14	74-75

L - длина тела по дуге; a - отношение длины тела к наибольшему диаметру; c - отношение длины тела к длине хвоста; St - длина стилета; спикулы - копулятивные органы самца, измеряются по дуге

**Распространение и морфологические особенности нематод,  
близких к *Bursaphelenchus xylophilus***

<b>Вид нематоды</b>	<b>Форма кончика хвоста самки</b>	<b>Распространение</b>
<i>B. xylophilus</i> (форма "R")	округлый	США, Канада, Мексика, Япония, Китай, Ю. Корея, Тайвань, Португалия
<i>B. xylophilus</i> (форма "M")	с мукро	США, Канада
<i>B. mucronatus</i>	с мукро	Япония, Россия, КНР, страны Зап. Европы
<i>B. fraudulentus</i>	с мукро	ФРГ, Австрия

Вид *B. fraudulentus* встречается на лиственных породах, остальные виды - на хвойных. Основным отличительным признаком вида *B. mucronatus*, распространенного на территории России, от вида *B. xylophilus* (Приложение Е, рис. 1), встречающегося в Восточной Азии, является наличие шиловидного мукро на конце хвоста самок и личинок *B. mucronatus* (у *B. xylophilus* мукро отсутствует, хвост самок и личинок округлый).

## Приложение В

(справочное)

### Рекомендации по предотвращению заноса и распространения *Bursaphelenchus xylophilus* на территории Российской Федерации

Условия ввоза лесопродукции хвойных пород на территорию Российской Федерации представлены в таблице 3.

Таблица 3

#### Условия ввоза лесопродукции хвойных пород на территорию Российской Федерации

Вид лесопродукции	Требования
<b>Живые растения</b>	
Живые растения для посадки (саженцы и пр.) из страны, свободной от сосновой стволовой нематоды	Фитосанитарный сертификат
Живые растения для посадки (за исключением растений рода <i>Thuja</i> ) из страны, в которой отмечено присутствие сосновой стволовой нематоды (США, Канада, Мексика, Япония, Китай, Корея, Тайвань, Португалия)	Фитосанитарный сертификат с указанием того, что в результате проведенного тестирования сосновая стволовая нематода и ее переносчики в данной партии растений не обнаружены, и место происхождения этой партии растений было свободно от сосновой стволовой нематоды в течение последнего вегетационного сезона, что было подтверждено обследованиями, проведенными по методике ЕОКЗР
Живые срезанные ветки из страны, свободной от сосновой стволовой нематоды	Фитосанитарный сертификат
Живые срезанные ветки (за исключением растений рода <i>Thuja</i> ) из страны, в которой отмечено присутствие сосновой стволовой нематоды	Фитосанитарный сертификат с указанием того, что в результате проведенного тестирования сосновая стволовая нематода и ее переносчики в данной партии растений не обнаружены, и место происхождения этой партии растений было свободно от сосновой стволовой нематоды в течение последнего вегетационного сезона, что было подтверждено обследованиями, проведенными по методике ЕОКЗР
<b>Древесина</b>	
Круглые лесоматериалы из страны, свободной от сосновой стволовой нематоды	Фитосанитарный сертификат

Круглые лесоматериалы (за исключением растений рода <i>Thuja</i> ) из страны, в которой отмечено присутствие сосновой стволовой нематоды	Фитосанитарный сертификат с указанием того, что данная партия лесоматериалов была окорена и подвергнута высокотемпературной обработке (при 56 °С в центре древесины не менее 30 минут), <i>или</i> химической импрегнации под давлением <i>или</i> окорена и подвергнута фумигации
Пиломатериалы из страны, свободной от сосновой стволовой нематоды	Фитосанитарный сертификат
Пиломатериалы (за исключением растений рода <i>Thuja</i> ) из страны, в которой отмечено присутствие сосновой стволовой нематоды	Фитосанитарный сертификат с указанием того, что данная партия пиломатериалов была окорена и подвергнута высокотемпературной обработке (при 56 °С в центре древесины не менее 30 минут), <i>или</i> химической импрегнации под давлением <i>или</i> окорена и подвергнута фумигации
Древесные отходы из страны, свободной от сосновой стволовой нематоды	Фитосанитарный сертификат
Древесные отходы (за исключением растений рода <i>Thuja</i> ) из страны, в которой отмечено присутствие сосновой стволовой нематоды	Фитосанитарный сертификат с указанием того, что данная партия материалов была подвергнута высокотемпературной обработке (при 56 °С в центре материала не менее 30 минут), <i>или</i> фумигации
Лесоматериалы из рода <i>Thuja</i>	Фитосанитарный сертификат, окорение и отсутствие в лесоматериалах отверстий диаметром более 3 мм
Упаковочная древесина	Выполнение требований МСФМ № 15 [11]
<b>Кора</b>	
Изолированная кора из страны, свободной от сосновой стволовой нематоды	Фитосанитарный сертификат
Изолированная кора из страны, в которой отмечено присутствие сосновой стволовой нематоды	Фитосанитарный сертификат с указанием того, что данная партия коры была подвергнута высокотемпературной обработке (при 56 °С в центре материала не менее 30 минут), <i>или</i> фумигации

## Приложение Г

(справочное)

### Мероприятия по ликвидации очагов *Bursaphelenchus xylophilus* в лесонасаждениях

Обследованию на зараженность нематодами подлежат опилки, стружки, доски и другие лесоматериалы. Обследуются также сортименты, находящиеся на нижних и верхних складах лесоматериалов, а также поваленные деревья и порубочные остатки в лесонасаждениях. По этим же деревьям определяется видовой состав стволовых вредителей.

Очагом считается зараженное нематодой *B. xylophilus* (в любой стадии и плотности, включая личинок и имаго насекомых) дерево, группа деревьев, расположенных вблизи друг от друга, а также насаждения, зараженные паразитом. Очагом также может считаться любая древесина (кусок древесины, или партия) зараженная патогеном, а также иные древесные субстраты: стружка, щепа, опилки и пр.

При выявлении зараженных сосновой стволовой нематодой насаждений проводятся следующие мероприятия:

- на район ее обнаружения накладывается карантин;
- производится уточнение границы заражения территории путем обследований насаждений в радиусе не менее 10 километров от очага;
- извещаются территориальные органы, уполномоченные в области карантина растений, регионов, в которые была произведена отправка лесоматериалов в последнее время;
- в очагах проводится тотальная обработка деревьев методами, принятыми в лесном хозяйстве против стволовых насекомых;
- в очагах, представленных одиночными деревьями или бревнами, осуществляется их уничтожение путем вырубki и сжигания в радиусе 3 км от центра очага.

Приложение Д  
(иллюстративное)

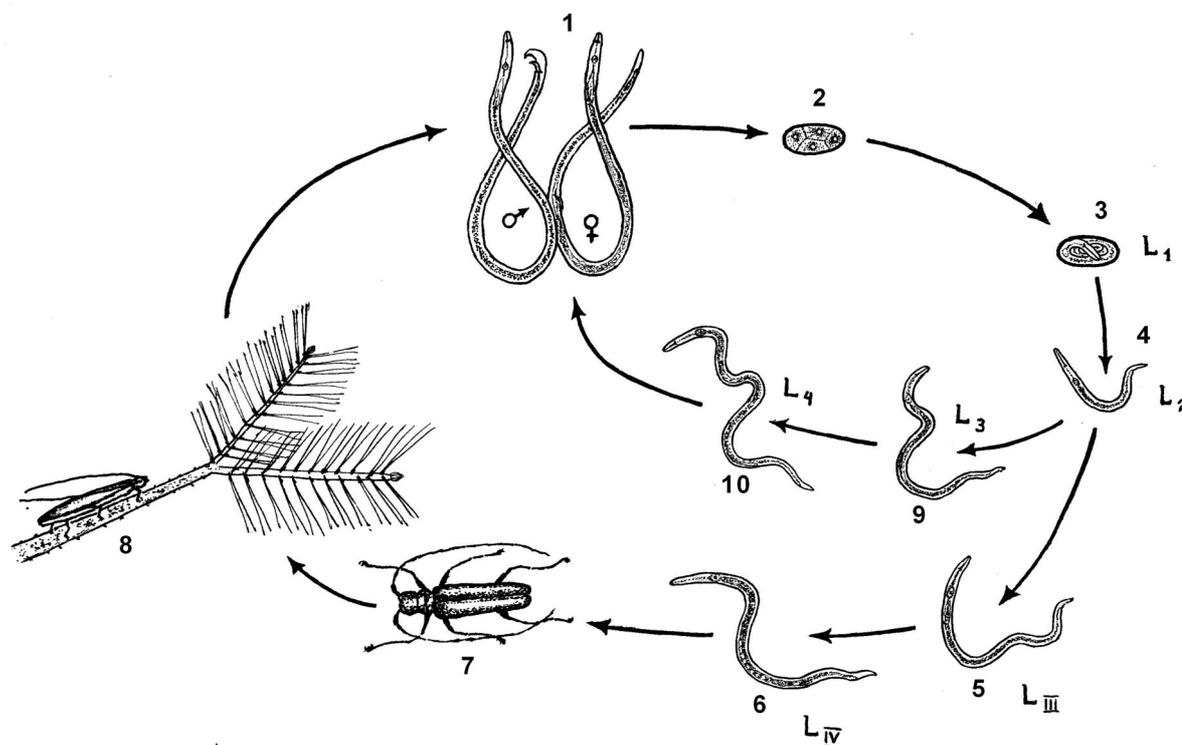


Рис. 1 Жизненный цикл сосновой стволовой нематоды

*Bursaphelenchus xylophilus*

(по Wingfield et al., [18] 1982 и Mamiya, 1984 [14]):

- 1 - половозрелые особи нематод; 2 – яйцо;
- 3 - личинка первого возраста (L 1); 4 - личинка второго возраста (L 2);
- 5 - резистентные личинки третьего возраста (J3d) концентрируются вокруг куколочной колыбельки усача;
- 6 – трансмиссивные личинки четвертого возраста (J4d) проникают в жука перед выходом его из куколки;
- 7 - трансмиссивные личинки (J4d) переносятся жуком усачом на живые деревья;
- 8 - выход трансмиссивных личинок из жука, линька и переход в стадию имаго;
- 9, 10 - личиночные стадии нематод (L 3-L4) пропативного цикла

## Приложение Е (иллюстративное)

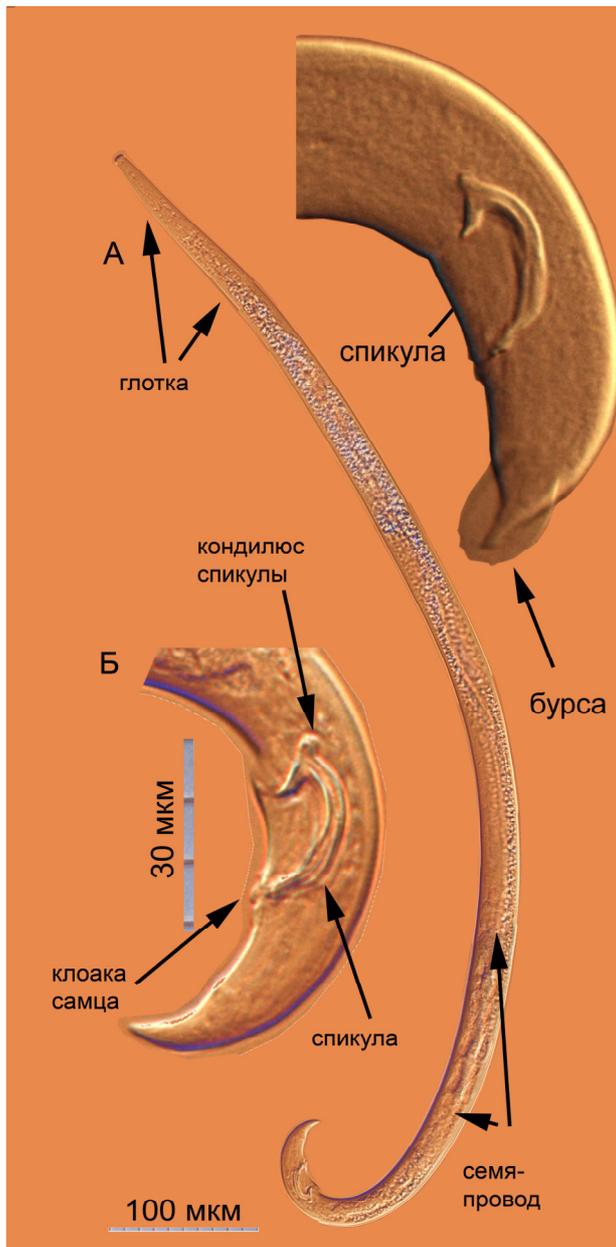


Рис. 2. Самец *Bursaphelenchus xylophilus*. Бурса – диагностический признак рода *Bursaphelenchus*.

Рис. 3. Поражение сосен *Pinus thunbergii* сосновой стволовой нематодой (Япония)

## Библиография

- [1] Вредные организмы, имеющие карантинное значение для Европы. «Колос», 1996, с. 319-328.
- [2] Инструкции по применению наборов реагентов для выявления ДНК сосновых стволовых нематод *Bursaphelenchus xylophilus* и *Bursaphelenchus mucronatus*. М., ООО «АгроДиагностика, 2007, 12 с.
- [3] Кирьянова Е.С., Кралль Э.Л. Паразитические нематоды растений и меры борьбы с ними. Том 1, Л.: Наука, 1969, 447 с.
- [4] Кулинич О.А. Сосновая древесная нематода *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhner) Nickle, 1970 // Справочник по вредителям, болезням растений и сорнякам, имеющих карантинное значение для территории Российской Федерации. Нижний Новгород. Изд. АРНИКА, 1995, с.103-106.
- [5] Кулинич О.А., Козырева Н.И. Сосновая древесная нематода *Bursaphelenchus xylophilus*: исследование в России и за рубежом // Паразитические нематоды растений и насекомых. М.: Наука, 2004, с. 100-119.
- [6] Кулинич О.А., Колосова Н.В. Сосновая стволовая нематода - потенциальная угроза хвойным лесам России - Защита растений, 1993. - № 8, с. 22-24.
- [7] Кулинич О.А., Пономарев В.Л., Рысс А.Ю., Чижов В.Н. «Инструкция по выявлению и диагностике сосновой стволовой нематоды *Bursaphelenchus xylophilus* и мерам по предотвращению ее заноса, локализации и ликвидации очагов», ФГУ «ВНИИКР», 2007, 24 с.
- [8] Кулинич О.А., Рысс А.Ю. Древесные нематоды рода *Bursaphelenchus* на территории России: методы выделения и диагностики // Прикладная нематология, 2006, с. 162-186
- [9] Кулинич О.А., А.Ю. Рысс, А.Ю. Чернецкая, В.Л. Пономарев, Д.Ю. Рязанцев, С.К. Завриев. Использование ПЦР-диагностики для идентификации карантинных видов нематод. Защита и карантин растений, 2008, 9, с. 36-38.
- [10] МСФМ № 5. Международные стандарты по фитосанитарным мерам. Глоссарий фитосанитарных терминов, 2007. ФАО, Рим.
- [11] МСФМ № 15. Международные стандарты по фитосанитарным мерам. Руководство по регулированию древесных упаковочных материалов в международной торговле, 2002. ФАО, Рим.
- [12] EPPO (2000) Diagnostic protocols for regulated pests: *Bursaphelenchus xylophilus*. EPPO standard PM 7/4 (1). EPPO website: [www.eppo.org](http://www.eppo.org).
- [13] Magnusson С., Kulinich O.A. 1996. A taxonomic reappraisal of the original description, morphology and status of *Bursaphelenchus kolymensis* Korentchenko, 1980 (Aphelenchida: Aphelenchoididae). Russian Journal of Nematology, 4, p. 155-161.
- [14] Mamiya Y. 1984. The pine wood nematode // Plant and insect nematodes. W.R. Nickle (Ed.). New York & Basel: Marcel Dekker, Inc., p. 589-627.
- [15] Kulinich O.A., Kolosova N.V. On the possibility of establishment of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* in the countries of the former USSR and the potential threat for conifers of the area // Russian Journal of Nematology. 1995, v.1, N 1, p.35-48.
- [16] Kulinich O.A., Orlinskii P.D. Distribution of conifer beetles (*Scolytidae*, *Curculionidae*, *Cerambycidae*) and wood nematodes (*Bursaphelenchus* spp.) in European and Asian Russia. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, Vol. 28, No. 1/2, 1998. p. 39-52.
- [17] Ryss A., Vieira P., Mota M. & Kulinich O., 2005. A synopsis of the genus *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 (Aphelenchida: Parasitaphelenchidae) with keys to species. Nematology, 2005, Vol. 7 (3), p. 393-458.

- [18] Wingfield M.J., Blanchette R.A., Nicholis T.H., Robbins K. The pine wood nematode: a comparison of the situation in the United States and Japan // Can. J. Far. Res. 1982. Vol. 12. N.1. P.71-75.
- 

**Код ОКС 65.020.20**

**Ключевые слова:** стандарт, сосновая стволовая нематода, сосновая древесная нематода, *Bursaphelenchus xylophilus*, выявление, идентификация, лесонасаждения, лесоматериалы, карантин.

---

В разработке настоящего стандарта организации участвовал авторский коллектив:  
Абасов М.М. – зам. директора ФГУ «ВНИИКР», академик МНАЭП, д.б.н.;  
Кулинич О.А. – д.б.н.; начальник отдела лесного карантина ФГУ «ВНИИКР»  
Пономарев В.Л. – к.б.н; зам.начальника отдела лесного карантина ФГУ «ВНИИКР»  
Рысс А.Ю. – д.б.н; вед. научн. сотр. ЗИН РАН  
Козырева Н.И. - к.б.н; научн сотр.ЦП ИПЭЭ им А.Н. Северцова РАН  
Шалова Л.М. – начальник отдела сертификации и стандартизации в агропромышленном комплексе ОАО «ВНИИС»;  
Шахманова З.Э. – зам. начальника отдела стандартизации ФГУ «ВНИИКР», к.ф.н.;  
Калинина Л.В. – инженер-метролог отдела стандартизации ФГУ «ВНИИКР»;  
Осауленко О.Н. – инженер отдела стандартизации ФГУ «ВНИИКР».