

Björn Hoppe¹, Helen Braasch^{2*}, Silvia Urban¹, Thomas Schröder³

Die *in vitro*-Zuchten von *Bursaphelenchus* spp. am Referenzlaboratorium für Quarantäneschadorganismen am Julius Kühn-Institut in Braunschweig

The *in vitro* cultivation of *Bursaphelenchus* spp. at the reference laboratory for quarantine pests at Julius Kühn-Institut in Braunschweig

415

Zusammenfassung

Das Forstquarantänelabor des Julius Kühn-Instituts in Braunschweig (Deutschland) kuratiert eine einzigartige Sammlung lebender *Bursaphelenchus*-Arten, zudem Dauerpräparate und ITS-RFLP Muster dieser Arten. Die Sammlung wurde von Dr. Helen Braasch gegründet und umfasst derzeit 48 Arten in 305 verschiedenen Isolaten. Diese Isolate wurden über 30 Jahre hinweg weltweit aus verschiedenen Habitaten (Bäumen) und anderen Bezugsquellen, wie Holzimporten einschließlich Holzverpackungsmaterial, gesammelt. Die Aufzucht der Nematoden auf sporulierenden und nicht sporulierenden *Botrytis cinerea* – Kulturen ist anspruchsvoll, arbeitsintensiv und erfordert sowohl Erfahrung als auch Geduld.

Stichwörter: *Bursaphelenchus xylophilus*, *in vitro*-Zucht

Abstract

The Forest quarantine laboratory at Julius Kühn-Institut in Braunschweig (Germany) curates a unique collection of living *Bursaphelenchus* species, permanent slides and ITS-RFLP profiles. The collection was initiated by Dr.

Helen Braasch and currently comprises 48 species in 308 different isolates. These isolates were collected over 30 years across the globe from various habitats and sources, like forest trees and wood imports including wooden packaging material. Cultivation of the nematodes on sporulating and non-sporulating *Botrytis cinerea* is sophisticated, labor-intensive and requires both, experience and patience.

Key words: *Bursaphelenchus xylophilus*, *in vitro*-breeding

Der Kiefernholznematode *Bursaphelenchus xylophilus*

Der Kiefernholznematode *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner und Buhner, 1934) Nickle, 1970 gehört neben dem „Red Ring Nematode“ der Kokospalmen, *Bursaphelenchus* [*Rhadinaphelenchus*] *cocophilus* (Cobb) Baujard, zu den einzigen nachweislich hochpathogenen Arten der mittlerweile ca. 125 Arten (Gu et al., 2019) umfassenden Gattung *Bursaphelenchus*. Dieser durch Bockkäferarten der Gattung *Monochamus* übertragene Nematode verursacht an verschiedenen wirtschaftlich bedeutsamen *Pinus*-Arten unter ausreichenden klimatischen Bedingungen (> 20°C Durchschnittstemperatur in den Som-

Affiliationen

¹ Julius Kühn-Institut (JKI) – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für nationale und internationale Angelegenheiten der Pflanzengesundheit, Braunschweig

² Julius Kühn-Institut (JKI) – Institut für nationale und internationale Angelegenheiten der Pflanzengesundheit, 14532 Kleinmachnow

³ BMEL – Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, Bonn

* 14471 Potsdam, Kantstr. 5 (im Ruhestand)

Kontaktanschrift

Dr. Björn Hoppe, Julius Kühn-Institut (JKI) – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für nationale und internationale Angelegenheiten der Pflanzengesundheit, Messeweg 11/12, 38104 Braunschweig, E-Mail: bjoern.hoppe@julius-kuehn.de

Zur Veröffentlichung angenommen

8. Juni 2020

mermonaten) die verheerende Kiefernwelke, die sich weiter ausbreitet und bisher nicht ausreichend erfolgreich bekämpft werden konnte.

Die Art stammt aus Nordamerika, wo sich im Laufe der Evolution Wirtsbäume und Nematode aneinander angepasst haben, sodass heimische Koniferenarten nicht geschädigt werden. Demgegenüber verursacht der Nematode an gebietsfremden *Pinus*-Arten sowie in Ländern, in die er eingeschleppt wurde (z. B. China, Japan, Korea, Portugal), schwere Schäden (EFSA, 2020). Anfang des 20. Jahrhunderts wurde der Nematode wahrscheinlich mit Holzexporten von Nordamerika nach Japan verschleppt. Es folgten weitere Ein- und Verschleppungen in Asien, bevor das erste Auftreten in Europa in Portugal im Jahr 1999 bestätigt wurde (MOTA et al., 1999). Der Kiefernholz-nematode ist im Rahmen der neuen EU-Pflanzengesundheitsverordnung als sogenannter prioritärer Schadorganismus gelistet, und es bestehen phytosanitäre Vorschriften für die Einfuhr von Wirtspflanzen und Holz sowie für seine Bekämpfung im Falle eines Auftretens in einem EU-Mitgliedstaat (EU, 2012; 2019a).

Geschichte der Sammlung

Die Begründung der *Bursaphelenchus*-Kultursammlung durch Dr. Braasch in der Dienststelle für wirtschaftliche Fragen und Rechtsangelegenheiten im Pflanzenschutz der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA) (Außenstelle Kleinmachnow) begann mit der Wiedervereinigung Deutschlands und der zunehmenden Relevanz des durch Nematoden verursachten Problems der Kiefernwelke in Ostasien. Dr. Braasch hatte dieses Problem bereits in Betracht gezogen, als sie das Quarantänelabor im Zentralen Pflanzenschutzamt der DDR leitete (BRAASCH, 1983). Der erste wissenschaftliche Kontakt mit „westdeutschen“ Fachkolleg* Innen fand im Institut für Nematologie und Wirbeltierforschung der BBA in Münster statt. Einige Kollegen dort befassten sich bereits mit einer *Bursaphelenchus*-Art in Laubbäumen und verfügten über einige Kulturen, darunter *B. xylophilus* aus Japan. Dr. Braasch erhielt 1991 die *Bursaphelenchus*-Kulturen aus Münster und konnte nunmehr den Kiefernholz-nematoden *B. xylophilus* endlich „persönlich“ studieren. Dies war der Beginn der Sammlung zahlreicher *Bursaphelenchus*-Arten, um eine mögliche Inzidenz oder Verschleppung des gefährlichen Kiefernholz-nematoden und verwandter Arten zu überprüfen, die mit *B. xylophilus* verwechselt werden könnten. Ein weiterer Grund für die Kultivierung war die Notwendigkeit einer großen Anzahl von Individuen für morphologische und molekulare Untersuchungen (BURGERMEISTER et al., 2009) sowie für Pathogenitätstests und Untersuchungen der Umweltaforderungen dieser Art (z. B. BRAASCH, 1994; DAUB, 2008; HOPF-BIZIKS et al., 2016; HOPF-BIZIKS & SCHRÖDER, 2019).

Die phytosanitären Einfuhranforderungen von Nadelholz in die EU aus Nordamerika, wo *B. xylophilus* natürlich vorkommt, ohne die einheimischen Nadelbäume zu

schädigen, erforderten zudem besonders intensive Maßnahmen. Dies führte zum zweiten Schritt beim Aufbau der Sammlung: Französische Kollegen (de Guiran, INRA), die Dr. Braasch auf einem internationalen nematologischen Treffen kennenlernte, stellten *Bursaphelenchus*-Kulturen von nordamerikanischen *Abies*-, *Pinus*- und *Picea*-Arten, sowie weiteren japanischen Isolat (von Mamiya) zur Verfügung. Während des EU-RISKBURS-Forschungsprojektes (1996–2000) (<https://cordis.europa.eu/project/id/FAIR950083>) wurden von den Projektpartnern in Österreich, Griechenland, Italien und Deutschland zahlreiche Nematodenproben aus *Pinus* spp. gesammelt und verschiedene *Bursaphelenchus*-Arten in die Kultursammlung aufgenommen. Dr. Braasch hatte bereits seit 1992 Nematoden aus importiertem Holz isoliert und kultiviert. Kolleg* Innen deutscher Pflanzenschutzdienste und Länderforstbehörden leisteten zudem einen wesentlichen Beitrag zur Erweiterung der Sammlung.

Ab 1999 erweiterte und intensivierte sich durch das Europäische Erstauftreten des Kiefernholz-nematoden die Zusammenarbeit mit Portugal und führte zu weiteren wertvollen Sammlungsbeiträgen. Andere Kooperationen mit Instituten in Kanada, China, Zypern, Korea, USA, Russland, der Türkei, Südafrika, der Schweiz und eigene Sammeltätigkeiten in Deutschland und im Ausland (z. B. Nordamerika, China, Thailand und Malaysia) haben die Bereitstellung von Arten für die Sammlung vorangetrieben.

Nach Dr. Braaschs Pensionierung erfolgte die Betreuung der Sammlung ab 2001 durch Dr. Thomas Schröder und Silvia Urban am heutigen Institut für nationale und internationale Angelegenheiten der Pflanzengesundheit in Braunschweig. Hier standen vor allem Bekämpfungsmaßnahmen und Pathogenitätsversuche im Fokus der wissenschaftlichen Aktivitäten, die unter anderem durch zwei Dissertationen belegt sind (DAUB, 2008; HOPF-BIZIKS & SCHRÖDER, 2019). Des Weiteren wurden internationale Kooperationen intensiviert und Netzwerke aufgebaut. Die Sammlung wurde durch internationale Kontakte ständig um neue Arten erweitert. Neben der Referenzfunktion wird die Sammlung auch zum Hinterlegen von Typenmaterial bei Neubeschreibungen von *Bursaphelenchus*-Arten genutzt (z. B. TOMALAK & FILIPIAK, 2010; TOMALAK & FILIPIAK, 2014; TOMALAK & MALEWSKI, 2014) und dient der Unterstützung bei der Durchführung von Bestimmungspraktika. Die Sammlung wird auch international von Wissenschaftlern außerhalb der EU anerkannt und als Referenz sowie als Basis für morphologische und molekulare Untersuchungen genutzt (z. B. LEAL et al., 2013). Sie wird seit 2013 bzw. 2016 als Referenz in internationalen Diagnoseprotokollen der Europäischen und Mediterranen Pflanzenschutzorganisation (EPPO) und dem Internationalen Pflanzenschutzübereinkommen (IPPC) genannt (EPPO, 2013; 2014; FAO, 2016).

Seit 2016 wird das Quarantänelabor und somit auch die Sammlung von Dr. Björn Hoppe und Silvia Urban betreut. Mit der Verordnung zur Zuweisung der Funktion eines nationalen Referenzlaboratoriums für Schadorganismen der Pflanzen (PflSchadORZV) vom 10.04.2019

wurde dem Labor die Aufgabe als Referenzlabor für die Diagnose des Kiefernholznematoden übertragen (BGBL, 2019). Zu den Aufgaben gehören in diesem Zusammenhang beispielsweise die Bereitstellung von Lebendmaterial und Durchführung von Laborvergleichsuntersuchungen für und mit den Pflanzenschutzdiensten der Länder.

In gewohnter Weise wird zudem, auf Anfrage, nationalen und internationalen Instituten Material zu Forschungszwecken bereitgestellt. Des Weiteren soll die Sammlung entsprechend der bereits beschriebenen, vor allem in Holz lebenden, *Bursaphelenchus*-Arten schrittweise erweitert werden.

Die Zucht und ihre Erhaltung

Die Sammlung umfasst gegenwärtig 48 Arten aus 305 verschiedenen Isolaten (Tab. 1, Abb. 1). Die Erhaltung der Kulturen erfordert viel Arbeit, und nicht alle Arten können gleichermaßen gut kultiviert werden.

Zur Erhaltung der *Bursaphelenchus*-Zuchten müssen diese regelmäßig auf neue *Botrytis cinerea*-Platten (Ascomycota: Helotiales) umgesetzt und visuell kontrolliert werden. Hierbei wird zwischen sporulierenden *Botrytis cinerea* (Umsetzung aller 2–4 Monate) und nichtsporulierenden *Botrytis cinerea* – sog. Harmey-Platten (Umsetzung aller 2–4 Wochen) unterschieden. Es

Tab. 1. In Laborzucht kultivierte *Bursaphelenchus*-Arten am JKI in Braunschweig

Art	Anzahl Isolate	Herkünfte aus	isoliert aus	in der Sammlung seit
<i>B. abietinus</i>	3	Österreich	<i>Pityokteines vorontzowi</i> aus <i>Abies alba</i>	1997
<i>B. abruptus</i>	1	USA	<i>Anthophora abrupta</i>	1998
<i>B. africanus</i>	1	Südafrika	Verpackungsholz (VPH)	2006
<i>B. anamurius</i>	2	Türkei	<i>Pinus brutia</i>	2006
<i>B. andrassyi</i>	1	Türkei	<i>Abies</i> spp.	2012
<i>B. antoniae</i>	1	Portugal	<i>Hylobius (Pinus pinaster)</i>	2007
<i>B. arthuri</i>	3	China, Südkorea, Taiwan	VPH	2004
<i>B. braaschae</i>	1	Thailand	VPH	2009
<i>B. burgermeisteri</i>	1	Japan	VPH	2006
<i>B. chengi</i>	1	Taiwan	VPH	2007
<i>B. conicaudatus</i>	4	China (Hongkong), Japan, Taiwan	<i>Ficus carica</i>	2001
<i>B. corneolus taiwanensis</i> ssp.	1	Taiwan	VPH	2005
<i>B. corneolus</i> (syn. <i>B. curvicaudatus</i>)	1	Mexiko	VPH	2002
<i>B. dietrichi</i>	5	Frankreich, Italien, Portugal, Türkei	<i>Pinus pinaster</i> , <i>P. nigra</i>	1997, 2019
<i>B. doui</i>	5	Südkorea, Taiwan	VPH, <i>Pinus massoniana</i>	2004
<i>B. eggersi</i>	4	Deutschland, Österreich	<i>Hylurgops palliatus</i> , <i>Pinus</i> spp.	1999
<i>B. eremus</i>	3	Deutschland	<i>Scolytus intricatus</i> , <i>Quercus</i> spp.	2004
<i>B. fraudulentus</i>	15	Deutschland, Österreich, Polen, Russland, USA, Ungarn	<i>Betula pendula</i> , <i>Larix</i> spp. (auch Schnittholz), <i>Picea</i> spp. (Sägespäne) <i>Pinus monticola</i> , <i>Prunus avium</i> , <i>Prunus cerasus</i> , <i>Quercus robur</i> , <i>Quercus</i> spp., <i>Thuja plicata</i>	1990
<i>B. fuchsi</i>	2	Deutschland	<i>Dryocoetes autographus</i> , <i>Pinus sylvestris</i>	1996
<i>B. fungivorus</i>	7	China, Deutschland, Portugal, Südkorea, Tschechische Republik	VPH, Koniferenrinde/Rindenmulch (unbestimmt)	1998
<i>B. gerberae</i>	1	Trinidad	<i>Rhynchophorus palmarum</i>	1998
<i>B. gillanii</i>	2	China, Frankreich	VPH	2008
<i>B. hellenicus</i>	2	Griechenland, Türkei	<i>Pinus brutia</i>	1996
<i>B. hildegardae</i>	2	Deutschland	<i>Ips sexdentatus</i> , <i>Pinus</i> spp.	2000
<i>B. hofmanni</i>	4	Deutschland, Österreich, Tschechische Republik	<i>Picea abies</i> , <i>Pinus sylvestris</i> , <i>Salix</i> spp.	1996
<i>B. hylobianum</i>	4	Japan, Russland, Thailand	VPH, <i>Larix sibirica</i> , <i>Pinus sylvestris</i> , <i>P. merkusii</i>	1998
<i>B. luxuriosae</i>	1	Japan	<i>Acalolepta luxuriosae</i>	2004
<i>B. macromucronatus</i>	2	Taiwan	VPH	2007

Tab. 1. Fortsetzung

Art	Anzahl Isolate	Herkünfte aus	isoliert aus	in der Sammlung seit
<i>B. mucronatus</i> (europ. Typ – <i>B. mucronatus kolymensis</i> , ostasiatischer Typ – <i>B. mucronatus mucronatus</i> , Mischtyp)	125	China, Deutschland, Finnland, Frankreich, Italien, Japan, Norwegen, Österreich, Russland, Schweiz, Südkorea, Tschechische Republik, Türkei, Ukraine	VPH, <i>Monochamus galloprovincialis</i> , <i>Larix decidua</i> , <i>L. sibirica</i> , (<i>Larix</i> spp.) <i>Picea abies</i> (<i>Picea</i> spp.), <i>P. densiflora</i> , <i>P. massoniana</i> , <i>P. nigra</i> , <i>P. koraiensis</i> , <i>P. koraiensis</i> , <i>P. strobus</i> , <i>P. sylvestris</i> , <i>Pinus thunbergii</i> , (<i>Pinus</i> spp.)	1999
<i>B. obeche</i>	2	Indonesien	VPH, <i>Triplochiton scleroxylon</i>	2007
<i>B. paracorneolus</i>	3	Deutschland, Russland	<i>Larix decidua</i> , <i>Picea abies</i> , <i>Pinus sylvestris</i>	1997
<i>B. paraluxuriosae</i>	1	Indonesien	VPH	2011
<i>B. paraparvispicularis</i>	1	China (Hongkong)	VPH	2009
<i>B. pinasteri</i>	1	Deutschland	<i>Pinus sylvestris</i>	2005
<i>B. platzeri</i>	1	USA	<i>Carpophilus humeralis</i>	1998
<i>B. poligraphi</i>	1	Deutschland	<i>Picea</i> spp.	1998
<i>B. populi</i>	2	Polen, Russland	<i>Populus tremula</i>	2009
<i>B. rainulfi</i>	5	China, Malaysia, Südkorea, Taiwan	VPH, <i>Pinus caribiae</i> , <i>P. massoniana</i>	2000
<i>B. seani</i>	1	USA	<i>Anthophora bomboides</i>	2000
<i>B. sexdentati</i>	2	Deutschland	<i>Pinus sylvestris</i>	2001
<i>B. sinensis</i>	2	China	VPH	2008
<i>B. singaporensis</i>	3	Malaysia, Singapur	VPH, <i>Agathis</i> spp.,	2004
<i>B. thailandae</i>	5	Japan, China, Südkorea	VPH, <i>Pinus densiflora</i> , <i>P. thunbergii</i>	1999
<i>B. tryphloei</i>	1	Polen	<i>Tryphloeus asperatus</i> (aus <i>Populus tremula</i>)	2011
<i>B. tusciae</i>	1	Italien	<i>Pinus pinaster</i>	1997
<i>B. vallesianus</i>	13	Griechenland, Schweiz, Türkei	k.A.*, <i>Pinus nigra</i> , <i>P. sylvestris</i>	1997
<i>B. willibaldi</i>	3	Deutschland	„Koniferen“-Hackschnitzel, <i>Quercus</i> spp.	2005
<i>B. xylophilus</i>	52	China, Japan, Kanada, Portugal, Spanien, Südkorea, Taiwan, USA	VPH, <i>Abies balsamea</i> , <i>Pinus banksiana</i> , <i>P. densiflora</i> , <i>P. halepensis</i> , <i>P. marssoniana</i> , <i>P. pentaphylla</i> , <i>P. pinaster</i> , <i>P. palustris</i> , <i>P. radiata</i> , <i>P. sylvestris</i> , <i>P. taeda</i> , <i>P. thunbergii</i>	1990

gibt Arten, die sich vornehmlich auf nichtsporulierender *Botrytis* vermehren (z. B. Arten der *sexdentati*-Gruppe), daher werden bei jedem Start einer neuen Kultur beide Pilzvarianten auf die jeweilige Eignung getestet. Der Futterpilz *Botrytis cinerea* wird auf 2 %igem Malzextrakt-agar (pH-Wert 7) kontinuierlich vermehrt.

Zum Schutz vor Milben finden alle Arbeiten an den Zuchten auf nassen Vliestüchern statt (ins Wasser werden ein paar Tropfen Spülmittel geben, um die Oberflächenspannung zu verringern). Zudem werden die Zuchtplatten einzeln in Tüten geschweißt gelagert. Während der Anzuchtphase erfolgt die Lagerung zunächst bei Raumtemperatur und dann bei 10°C für die Zeit bis zur Neukultivierung. Der Schwierigkeitsgrad der Kultivierung ist artabhängig unterschiedlich. Die Arten der *sexdentati*-Gruppe beispielsweise vermehren sich in der Regel schneller als andere *Bursaphelenchus*-Arten. Manche Arten, wie z. B. *B. leoni*, bereiten häufig Schwierigkeiten bei der Kultivierung.

In regelmäßigen Abständen werden die Isolate auf ihre Reinheit kontrolliert. Hierzu werden den Zuchtplatten

Wassertropfen, die am Deckelrand der Petrischalen kondensieren, abgenommen und die darin enthaltenen Nematoden morphologisch begutachtet. Aus den vom Deckel gespülten Nematoden wird außerdem DNA extrahiert, die anschließend mittels PCR spezifisch amplifiziert wird. Mit der am Institut etablierten ITS-RFLP-Methode lassen sich anschließend (nach Restriktionsverdau der amplifizierten DNA-Fragmente) für jede sich in der Sammlung befindende *Bursaphelenchus*-Art spezifische Bandenmuster gelelektrophoretisch auftrennen (BURGERMEISTER et al., 2009). Diese Bandenmuster sind gut dokumentiert und geben unmittelbar Auskunft darüber, ob die analysierten Isolate in Reinkultur vorliegen.

Zudem wird die Sammlung auf ihre taxonomische Integrität überwacht; so konnten unlängst südeuropäische Isolate von *Bursaphelenchus sexdentati* aufgrund morphologischer und molekulargenetischer Kriterien als neue Art *Bursaphelenchus dietrichi* sp. n. (Tylenchina: Aphelenchoididae) neu beschrieben werden (GU et al., 2019).

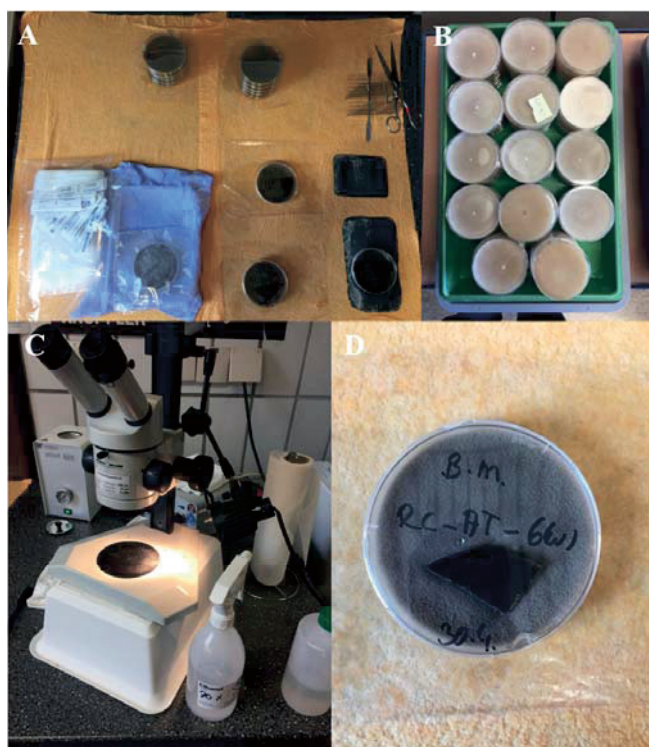


Abb. 1. Ein Blick ins Labor. A) Arbeitsbereich zum Umsetzen der Zuchten auf neue „Pilzrasen“ (z. B. Zuchtplatten mit sporulierenden *Botrytis cinerea* – Kulturen; B) Diverse Zuchtplatten zur Lagerung in Hartplastik-Fotoschalen; C) Stereomikroskop zur Vitalitätsbeurteilung der Nematoden; D) ausgewählte Zuchtplatte: *Bursaphelenchus mucronatus* isoliert aus chinesischem VPH, dass in Österreich beanstandet wurde.

Abgabe von Lebendmaterial an Dritte

Es besteht jederzeit die Möglichkeit zur Abgabe von Lebendmaterial zu Forschungszwecken an Dritte. Hierzu wird ein Vertrag, ein sogenanntes „MTA – Material Transfer Agreement“ zwischen den Vertragspartnern (JKI und Empfänger) geschlossen, dass die zu versendenden Isolate referenziert und den Empfängern den Umgang, unter Angabe der Herkunft, zugesteht. Ein entsprechendes Dokument ist verlinkt. Des Weiteren setzt die Versendung von geregelten Quarantäneschadorganismen (betrifft *Bursaphelenchus xylophilus*) innerhalb der EU bzw. beim Import aus Drittstaaten gemäß der Delegierten Verordnung (EU) 2019/829 eine durch die zuständigen Pflanzenschutzdienste der Vertragspartner unterzeichnete Ermächtigung zum Verbringen von Schädlingen für wissenschaftliche Zwecke voraus (EU, 2019b). Bei Versand in Drittländer sind deren phytosanitäre Einfuhrvorschriften zu beachten.

Danksagung

Besonderer Dank gilt der AG Phytonematologie am Julius Kühn-Institut

Erklärung zu Interessenkonflikten

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.


Literatur

- BGBL, 2019: Verordnung zur Zuweisung der Funktion eines nationalen Referenzlaboratoriums für Schadorganismen der Pflanzen (Pflanzenschadorganismenreferenzlaboratorzuweisungsverordnung – PflSchadORZV)1 vom 10. April 2019. Bundesgesetzblatt Jahrgang 2019 Teil I Nr. 13: 485.
- BURGERMEISTER, W., BRAASCH, H., METGE, K., GU, J., SCHRÖDER, T., WOLDT, E., 2009: ITS-RFLP analysis, an efficient tool for differentiation of *Bursaphelenchus* species. *Nematology* **11** (5), 649-668.
- BRAASCH, H., 1983: Der Kiefernholz nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner und Bührer, 1934) Nickle, 1970, im Blickpunkt der Pflanzenquarantäne. *Nachrichtenblatt für den Pflanzenschutz in der DDR* **37**, 227-230.
- BRAASCH, H., 1994: Untersuchungen zur Pathogenität des Kiefernholz nematoden (*Bursaphelenchus xylophilus*) für verschiedene Koniferenarten unter mitteleuropäischen Freilandbedingungen. Abstr. 22. Tagung des Arbeitskreises Nematologie. *Mitt. Deut. Phytomed. Ges.* **24**, 29-30.
- DAUB, M., 2008: Investigations on pathogenicity, invasion biology and population dynamics of the Pine Wood Nematode *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner und Bührer 1934) Nickle 1970 in European conifers. Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut. Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Quedlinburg, Deutschland: 121 S.
- EFSA (European Food Safety Authority), M. SCHENK, A. LOOMANS, L. NUS, B. HOPPE, M. KINKAR, S. VOS, 2020: Pest survey card on *Bursaphelenchus xylophilus*. EFSA supporting publication 2020: EN-1782. 32 pp, DOI:10.2903/sp.efsa.2020.EN-1782.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization), 2013: *Bursaphelenchus xylophilus*. *Diagnostics PM 7/4* (3). *EPPO Bulletin*, **43** (1), 105-118.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization), 2014: *Bursaphelenchus xylophilus*. Addendum to *Diagnostics PM 7/4* (3). *EPPO Bulletin* **44** (1), 105.
- EU, 2012: Durchführungsbeschluss 2012/535/EU der Kommission vom 26. September 2012 über Sofortmaßnahmen gegen die Ausbreitung von *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Bührer) Nickle et al. (Kiefernfasernematode) in der Union (in der aktuellen Fassung). *ABl. L* 266: 235.
- EU, 2019a: Delegierte Verordnung (EU) 2019/1702 der Kommission vom 1. August 2019 zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/2031 des Europäischen Parlaments und des Rates durch die Aufstellung einer Liste der prioritären Schädlinge. *ABl der EU - L* 260: 8-10.
- EU, 2019b: Delegierte Verordnung (EU) 2019/829 der Kommission vom 14. März 2019 zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/2031 des Europäischen Parlaments und des Rates über Maßnahmen zum Schutz vor Pflanzenschädlingen zwecks Ermächtigung der Mitgliedstaaten, befristete Ausnahmen für amtliche Tests, für wissenschaftliche Zwecke oder für Bildungszwecke, Versuche, Sortenauslese bzw. Züchtungsvorhaben zuzulassen. *ABl der EU - L* 137: 15-25.
- FAO/IPPC, 2016: ISPM 27 Annex 10; Diagnostic Protocol 10: *Bursaphelenchus xylophilus*. IPPC, Rome: 40pp. (https://www.ippc.int/static/media/files/publication/en/2017/07/DP_10_2016_En_2017-07-12.pdf; aufgerufen am 21.04.2020).
- GU, J., Y. FANG, L. LIU, H. BRAASCH, B. HOPPE, 2019: *Bursaphelenchus dietrichi* sp. n. (Tylenchina: Aphelenchoididae) – a new species of the sexdentati-group from southern Europe. *Nematology* **1**, 1-13.
- HOPF-BIZIKS, A., T. SCHRÖDER, S. SCHÜTZ, 2016: The pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Bührer) Nickle, and its pathogenicity to German *Pinus sylvestris* provenances. *Journal of Plant Diseases and Protection* **123** (1), 43-49.
- HOPF-BIZIKS, A., T. SCHRÖDER, 2019: Population dynamics and pathogenicity of *Bursaphelenchus xylophilus* in seven- to eight-year-old *Pinus sylvestris* trees. *Journal für Kulturpflanzen* **71** (5), 109-130 DOI: 10.5073/JfK.2019.05.01.
- HOPF-BIZIKS, A., 2020: Further investigations of the population dynamics and pathogenicity of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Bührer 1934) Nickle 1970, and its non-vector transmission to *Pinus sylvestris*. Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut. Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Quedlinburg, Deutschland: 151 S.


- LEAL, I., B. FOORD, E. ALLEN, C. CAMPION, M. ROTT, M. GREEN, 2013: Development of two reverse transcription-PCR methods to detect living pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in wood. *Forest Pathology* **43**, 104-114.
- MOTA, M., H. BRAASCH, M.A. BRAVO, A.C. PENAS, W. BURGERMEISTER, K. METGE, E. SOUSA, 1999: First record of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. *Nematology*, **1**, 727-734.
- TOMALAK, M., A. FILIPIAK, 2010: Description of *Bursaphelenchus populi* sp. n. (Nematoda: Parasitaphelenchidae), a new member of the xylophilus group from aspen, *Populus tremula* L., in Europe. *Nematology* **12** (3), 399-416.
- TOMALAK, M., A. FILIPIAK, 2014: *Bursaphelenchus fagi* sp. n. (Nematoda: Parasitaphelenchidae), an insect-pathogenic nematode in the Malpighian tubules of the bark beetle, *Taphrorychus bicolor* (Herbst.) (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae), in European beech, *Fagus sylvatica* L. *Nematology* **16** (5), 591-606.
- TOMALAK, M., T. MALEWSKI, 2014: *Bursaphelenchus tiliae* sp. n. (Nematoda: Parasitaphelenchidae), a nematode associate of the

bark beetle *Ernoporus tiliae* (Panz.) (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae), in small-leaved lime, *Tilia cordata* Mill. *Nematology* **16** (10), 1181-1196.

© Der Autor/Die Autorin 2020.

 Dies ist ein Open-Access-Artikel, der unter den Bedingungen der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz (CC BY 4.0) zur Verfügung gestellt wird (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>).

© The Author(s) 2020.

 This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.en>).