

# **METHODEN EN TECHNIEKEN**

**voor**

# **NEMATOLOGIE**

**door**

**J. VAN BEZOOIJEN**

**Herziene versie 1999**



## VOORWOORD

De voor U liggende handleiding "Methoden en Technieken voor Nematologie" is gebaseerd op de "Manual for practical work in Nematology" ('s Jacob & van Bezooijen 1984) die vele herzieningen heeft gehad. De "Practicumhandleiding Nematologie" (van Bezooijen & Ettema 1996) diende als basis voor een verdere revisie. Het eindproduct waarvan U nu gebruik gaat maken pretendeert niet volledig te zijn, maar is op vele plaatsen een uitbreiding en correctie van de voorgaande uitgaven. Verbeteringen en verdere correcties zullen zeker nog nodig zijn en suggesties daarvoor worden door de auteur graag ingezameld. Ondanks de beperkende opmerkingen blijft de wens dat het voorliggende boekje voor U nuttig zal blijken.

Wageningen, januari 1999

## INHOUD

---

### VOORWOORD

### INHOUD

<b>HOOFDSTUK 1. BEMONSTEREN</b>	<b>1</b>
1.1. PRAKTISCHE EN THEORETISCHE OVERWEGINGEN	1
1.1.1. Doel van bemonstering en vereiste nauwkeurigheid	1
1.1.2. Variatie in de ruimte: horizontaal en verticaal	1
1.1.3. Variatie in de tijd: seizoensfluctuaties en levenscycli	2
1.1.4. Statistiek	2
1.2. DE MONSTERNAME	3
1.2.1. Gereedschap	3
1.2.2. Monsterpatronen	4
1.2.3. Voorbeelden van bemonsteringswijzen	4
1.3. TRANSPORT EN OPSLAG	7
1.3.1. Monsters fixeren in het veld	8
1.4. MONSTER-VOORBEWERKING	8
1.4.1. Meten: volume of gewicht?	8
1.4.2. Submonsters nemen; Mengen	9
1.4.3. Weken	9
1.4.4. Drogen	10
<b>HOOFDSTUK 2. EXTRACTIE</b>	<b>11</b>
2.1. INLEIDING	11
2.1.1. Principes	11
2.1.2. Extractie uit plantenmateriaal	11
2.1.3. Extractie uit grond en andere substraten	12
2.1.4. Extractie van cysten	12
2.1.5. Keuze van een extractiemethode	13
2.2. EXTRACTIE UIT PLANTENMATERIAAL	19
2.2.1. Dissectie	19
2.2.2. Baermann trechter	20
2.2.3. Regenapparaat	22
2.2.4. Mixer-nematodenfiltermethode	24
2.2.5. Mixer-centrifuge-drijfmethode	26
2.3. EXTRACTIE UIT GROND EN ANDERE SUBSTRATEN	29
2.3.1. Nematodenfiltermethode	29
2.3.2. Decanteren en zeven: Cobb's methode	33
2.3.3. Erlenmeyer- of (melk)flessenmethode	38
2.3.4. Oostenbrink trechter	43
2.3.4.1. Standaardgebruik	43

2.3.4.2. Modificatie voor de extractie van grote nematoden	47
2.3.4.3. Modificatie voor de extractie van stengelaaltjes	49
2.3.5. Centrifuge-drijfmethode	52
2.3.5.1. Modificatie voor de extractie van gefixeerde monsters	56
2.4. EXTRACTIE VAN CYSTEN	58
2.4.1. Baunacke methode	58
2.4.2. Fenwick Kan	60
2.4.3. Kort trechter	62
2.4.4. Seinhorst trechter voor cysten	64
2.4.5. Opschonen van het debris	66
2.4.5.1. Opschonen met behulp van organische oplosmiddelen	66
2.4.5.2. Opschonen met behulp van de centrifuge-drijfmethode	68
2.5. ANALYSE VAN EXTRACTEN	71
2.5.1. Tellen van suspensies	71
2.5.2. Schatten en tellen van de cystinhoud	72
2.5.3. Weergave van de aantallen	73
<b>HOOFDSTUK 3. BEWERKEN</b>	<b>75</b>
3.1. VISSSEN	75
3.2. CONCENTREREN	75
3.3. ANAESTHETISEREN	76
3.4. DODEN EN FIXEREN	76
3.4.1. Massafixatie	77
3.4.2. Recepten voor fixatieven	78
3.5. OVERBRENGEN NAAR GLYCERINE	79
3.5.1. Glycerine-ethanol methode	79
3.5.2. Glycerine-formaline methode	80
3.6. IN PREPARAAT BRENGEN	80
3.6.1. Materialen	80
3.6.2. Tijdelijke preparaten	83
3.6.2.1. Waterpreparaat	83
3.6.2.2. Lactofenolpreparaat	83
3.6.3. Permanente preparaten	84
3.6.3.1. Glycerinepreparaat	84
3.6.3.2. Massapreparaat	85
3.6.3.3. Preparaat van perineaal patroon	86
3.6.3.4. Preparaat van vulvakegel	87
3.6.3.5. Preparaat van kop en doorsneden	88
3.6.3.6. Perspex preparaat voor cysten	90

3.7. KLEUREN VAN WORTELMATERIAAL	91
3.7.1. Kleuren in lactofenol-katoenblauw	91
3.7.2. Kleuren in Lugol's oplossing	93
3.8 HISTOLOGIE	94
3.8.1. Klaarmaken van plantenmateriaal voor microtoomsnijden	94
3.8.2. Snijden op de microtoom	96
3.8.3. Kleuren van microtoompreparaten	97
3.8.4. Recepten voor Histologie	100
<b>HOOFDSTUK 4. HET KWEKEN VAN AALTJES IN VITRO</b>	<b>101</b>
4.1. HET AZIJNAALTJE <i>Turbatrix aceti</i>	101
4.2. HET VRIJLEVENDE AALTJE <i>Panagrellus redivivus</i>	101
4.3. <i>RHABDITIS</i>	101
4.4. HET CHRYSANTENBLADAALTJE <i>Aphelenchoïdes ritzemabosi</i>	102
4.5. DE AARDAPPELCYSTEAAALTJES <i>Globodera rostochiensis</i> of <i>G. pallida</i>	102
4.6. HET WORTELKNOBBELAALTJE <i>Meloidogyne spp</i>	103
<b>HOOFDSTUK 5. MICROSCOPIE</b>	<b>107</b>
5.1. INLEIDING	107
5.2. DE BINOCULAIR	109
5.3. DE MICROSCOOP	111
5.4. HET ONDERHOUD VAN MICROSCOPEN	112
5.5. METEN MET DE MICROSCOOP	112
5.6. NEMATODE METINGEN (Ratio's)	113
<b>HOOFDSTUK 6. OVERIGE TECHNIEKEN</b>	<b>114</b>
6.1. CONCENTREREN EN OPPERVLAKTE STERILISATIE VAN NEMATODEN SUSPENSIES	114
6.2. KWANTITATIEVE EXTRACTIE VAN RUSTSPOREN VAN NEMATODEN PARASITAIRE SCHIMMELS MET BEHULP VAN EEN CENTIFUGE DRIJF METHODE	115
6.3. FYTOTOXICITEITSPROEF	117
<b>LITERATUUR</b>	<b>118</b>

## HOOFDSTUK 1. BEMONSTEREN

---

### 1.1. PRAKTISCHE EN THEORETISCHE OVERWEGINGEN

Bij het opstellen van een bemonsteringsplan voor het schatten van nematodenaantallen, biomassa en soortensamenstelling in een bepaald veld moeten een aantal praktische en theoretische overwegingen worden gemaakt. Het doel van de studie, de daarbij vereiste nauwkeurigheid, de benodigde tijd en de kosten zullen het ontwerp voor een deel bepalen. Daarnaast moet kennis van de ruimtelijke en temporele variatie in de nematodenpopulaties, hun biologie en de invloed van (a)biotische factoren, zoveel mogelijk bij het plan betrokken worden om tot een juiste keuze te komen betreffende bemonsteringsdiepte en - tijdstip, gereedschap, aantal monsters en monsterpatroon.

#### 1.1.1. Doel van bemonstering en vereiste nauwkeurigheid

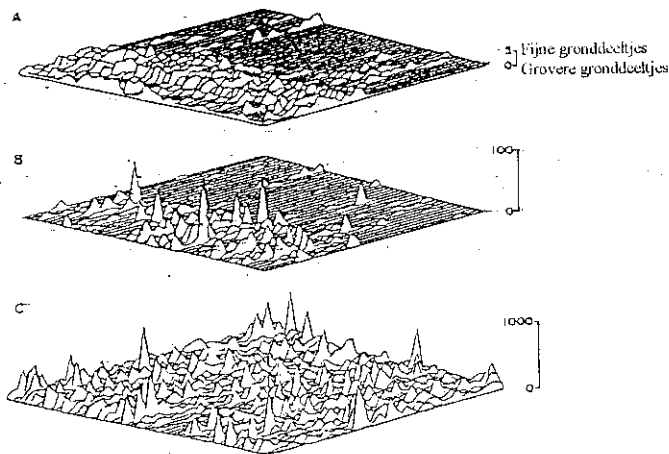
Afhankelijk van de doelstelling van de bemonstering zal de eis ten aanzien van nauwkeurigheid hoger of lager zijn. Voor kwalitatieve studies zoals de diagnose van zieke planten of voor taxonomisch werk ligt de eis relatief laag en kan een simpel bemonsteringsplan voldoende zijn. Voor een ecologische studie van de soortensamenstelling van een nematodengemeenschap zal nauwkeuriger bemonsterd worden omdat zeldzamere soorten ook in het monster moeten voorkomen. Dergelijke eisen lopen op bij het bemonsteren voor bijvoorbeeld advisering over bestrijdingsnoodzaak of gewaskeuze en voor biomassabepalingen. Een grote mate van nauwkeurigheid is vereist bij het bemonsteren voor 'vrij-verklaringen' in het kader van wettelijke maatregelen en keuringsreglementen waar de teelt van voortkweekings- of exportmateriaal vrij moet zijn van besmetting (zg. nultolerantie). In het algemeen geldt dat een grotere nauwkeurigheid meer tijd en geld kost omdat er meer monsters genomen moeten worden (zie 1.1.4).

#### 1.1.2. Variatie in de ruimte: horizontaal en verticaal

Een van de grootste problemen bij het bemonsteren is dat nematoden meestal niet 'random' maar 'geclusterd' in de bodem voorkomen, waarbij vele fysische, biologische en agronomische factoren een rol kunnen spelen. Respectievelijke voorbeelden zijn de concentratie van *Helicotylenchus digonicus* in grond van fijne textuur (Fig.1), het hoge aantal bacterivore nematoden in een mestflat, en een puntinfectie van planteparasieten door het poten van een zieke knol. Als factoren zoals bodemtextuur of teeltgeschiedenis bekend zijn is het gunstig (minder variatie) om de verschillende stukken (vgl. Fig. 1) apart te bemonsteren. Ruimtelijke variatie betreft niet alleen de horizontale, maar ook de verticale verdeling. Afhankelijk van wortelgroei, bodemtextuur en nematodensoort kunnen nematoden tot meters diepte gevonden worden. Als vuistregel geldt dat het grootste deel van de nematoden zich in de bovenste 0-25 cm bevindt,

daar waar de meeste wortels zitten of zo diep als er geploegd wordt (bouwvoor). In gecultiveerd land is dat dan ook de meest gangbare bemonsterdiepte.

Bij bemonstering van bomen wordt dieper bemonsterd, bv. voor *Xiphinema* of *Longidorus* tot 40 cm.



Three-dimensional projections show distribution of (A) soil texture, (B) *Helicotylenchus digonicus*, and (C) *Meloidogyne arenaria* in a 17-acre alfalfa field.

### Figuur 1 (Uit Goodell & Ferris, 1980)

#### 1.1.3. Variatie in de tijd: seizoensfluctuaties en levenscycli

Naast grote variatie in de ruimte zijn populatieschommelingen in de tijd van grote invloed op het bemonsteringsresultaat. Dit kunnen seizoensfluctuaties zijn door verschillende temperatuurs-, vocht- en voedselomstandigheden. Zo zullen Rhabditidae in de herfst wanneer de decompositie van gewasresten en gevallen bladeren op gang komt een populatiepiek vertonen, terwijl andere soorten in de zomer domineren onder invloed van de hogere temperatuur en voedselvoorziening door bijvoorbeeld plantewortelontwikkeling of algengroei op de grond. Daarnaast is, zeker bij planteparasieten, kennis van de levenscyclus van de te bemonsteren nematoden noodzakelijk om het 'ideale' bemonsteringstijdstip te kiezen. Zo zijn grondbemonsteringen in een stand gewas voor populatiestudies niet zo zinvol omdat endoparasieten zich op dat moment niet in de grond maar in de wortels bevinden en ectoparasieten dan in de rhizosfeer geconcentreerd zijn. Daarentegen zullen aantallen van deze planteparasieten laat in het groeiseizoen of direct na het oogsten in de bodem op hun hoogste punt zijn (in de gematigde streken! Voor warmere gebieden kunnen andere tijdstippen voor populatieminima en -maxima gelden, i.h.a. hoe droger en heter het seizoen, hoe minder nematoden). Ook moet er rekening worden gehouden met het feit dat het type gewas en teeltmaatregelen invloed hebben op de populatieontwikkeling.

#### 1.1.4. Statistiek

Bij bemonsteren gaat het om het zo goed mogelijk *schatten* van de nematodenaantallen of biomassa in een bepaald veld. De onnauwkeurigheid waarmee dit gebeurt heet de monsterfout ('sampling error'), die uitgedrukt kan worden in termen van variantie of standaarddeviatie. De verschillende fasen van de



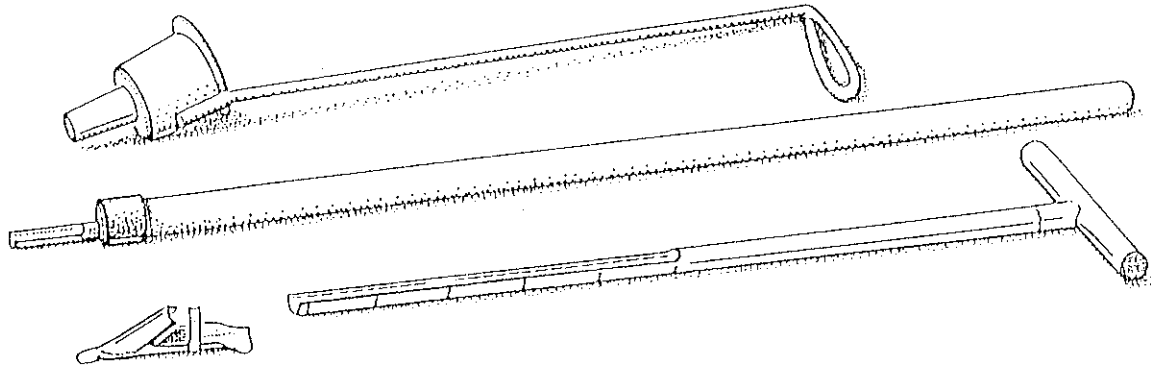
bemonstering in ruime zin (steken nemen, mengmonsters maken, submonsters nemen, opspoelen en submonsters van de suspensie analyseren) voegen elk een variantiecomponent aan de totale variantie toe (Alkemade 1993). De fouten die in elke fase worden geïntroduceerd kunnen verdeeld worden in systematische en toevalsfouten (Alkemade, mond meded.). Systematische fouten (bv. verliezen door gebruik van een te smalle boor) kunnen voor een deel voorkomen worden door *zorgvuldig werken*, maar zijn niet geheel uit te sluiten omdat de gebruikte methoden niet 100% efficiënt zijn (bijv. extractiemethoden). Toevalsfouten ('random error') kunnen verkleind worden door het nemen van *meer of grotere (sub)monsters (van een kleiner gebied)* en kunnen alleen voorkómen worden door het hele gebied af te graven, dit in zijn geheel op te spoelen en de suspensie geheel te analyseren. Afgezien van dat dit praktisch onmogelijk en onbetaalbaar is, zal het de systematische fouten niet kunnen uitsluiten en ze waarschijnlijk zelfs vergroten. Door het afwegen van hoeveel elk van de fasen bijdraagt aan de totale variantie kan een optimale combinatie worden gezocht waarbij de nauwkeurigheid zo groot mogelijk, en de kosten zo laag mogelijk uitvallen (Alkemade 1993). Bijvoorbeeld, omdat de variantie tússten de monsters altijd groter is dan binnen een monster, heeft het de voorkeur om meer tijd te besteden aan het nemen van veel monsters (herhalingen) dan aan het per monster analyseren van veel submonsters. Overigens heeft het nemen van meer monsters niet alleen statistische voordelen; het geeft ook meer informatie over de lokatie of de verspreiding van een besmetting in het perceel (zie ook 1.2.2).

## **1.2. DE MONSTERNAME**

### **1.2.1. Gereedschap**

Een bemonstering kan met vele soorten werktuigen worden uitgevoerd, van een sigarenblikje tot speciale boren of gewoon een schop, afhankelijk van het doel en datgene wat beschikbaar is. Meestal worden halfopen of gesloten boren gebruikt van verschillende lengte en diameter en bestaat een monster uit meerdere boorsteken. Omdat de nauwkeurigheid van het monster toeneemt met het aantal boorsteken is het gunstig p $\acute{e}$ r steek weinig grond op te nemen zodat de omvang van het totale monster beperkt blijft. De boordiameter mag echter niet te klein zijn omdat te grote wrijving schadelijk is voor de nematoden. Gevoelige geslachten uit de Trichodoridae en Longidoridae kunnen het best bemonsterd worden met een zo wijd mogelijke buis, zoals een conservenblik waar de bodems uitgesneden zijn (zie 'Brancard'-bemonstering'). De boor moet haaks in de grond gestoken worden en, om te zorgen dat de boor de grond 'pakt', een kwart tot halve slag gedraaid worden alvorens ze er weer uitgetrokken wordt. Het gereedschap dient altijd goed schoon zijn, teneinde het te bemonsteren veld niet te besmetten met ziekten uit het daarvóór bemonsterde perceel en om een 'fout van de tweede soort' (concluderen dat nematodesoort A in het

perceel voorkomt terwijl die in werkelijkheid niet aanwezig is) te voorkomen. Naast bemonstergereedschap zijn schetspapier en potlood, om situatie ter plaatse (de toestand van het gewas, het weer etc) vast te leggen, onontbeerlijke onderdelen van de bemonsteringsuitrusting (Fig. 2).



**Figuur 2**

**Grondmonsterboren**

**Graslandboor voor chemisch onderzoek**

**Aardappelcysteaaltjes onderzoek 5 cm boor**

**Bouwlandvoor voor diverse toepassingen**

**1.2.2. Monsterpatronen**

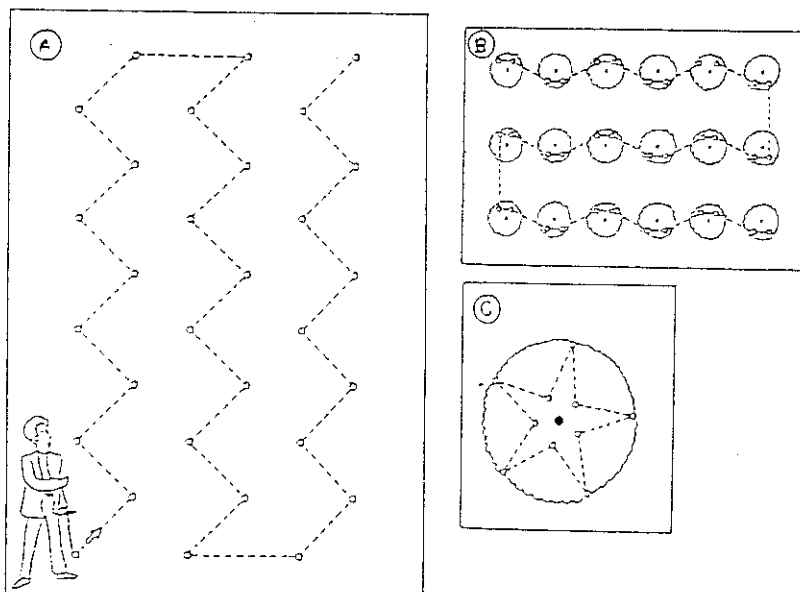
Bemonstering kan 'random' of systematisch worden uitgevoerd. Random bemonsteren (als het écht random gebeurt!) is theoretisch gezien het beste omdat elke 'bias' wordt uitgesloten; door kriskras, lukraak, door het veld te bemonsteren mogen de monsters als onafhankelijke waarnemingen worden beschouwd. In de praktijk wordt er meestal systematisch bemonsterd omdat dit veel minder tijd kost (R. Alkemade, mond. meded.). De monsters worden dan langs een lijn of op rasterpunten, op vaste afstand van elkaar, gestoken. Voor het bemonsteren plaatsvindt kan het veld eerst in stroken of blokken worden ingedeeld (bv. op grond van kennis van afwijkende bodemtextuur; zie 1.1.2) waarna de ('gestratificeerde') bemonstering zowel random als systematisch kan worden uitgevoerd.

**1.2.3. Voorbeelden van bemonsteringswijzen**

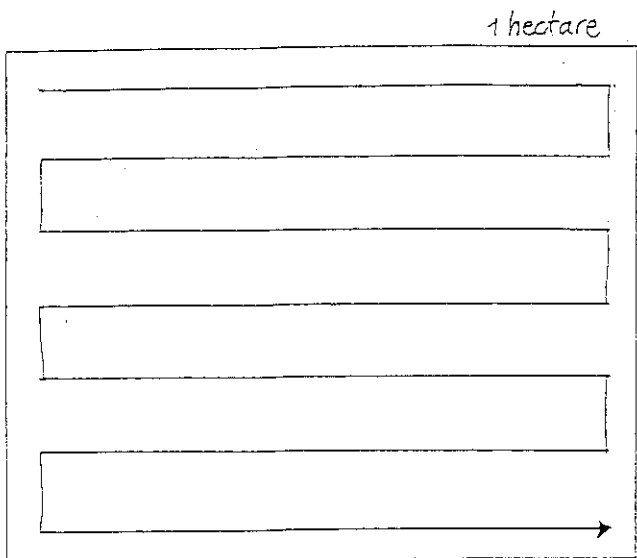
- 1) Diagnose: Voor diagnose van zieke planten worden drie soorten monsters genomen. Bij een valplek worden zowel de gezonde planten eromheen, de zieke planten in het midden als ook de matig groeiende planten aan de randen bemonsterd. Wortel- en stengel/blad materiaal en een aantal stekken van de omringende grond per monster worden verzameld. Op het moment van bemonsteren moeten alle symptomen en tekens van ziekte worden beschreven, alsmede alle beschikbare

informatie verzameld worden over factoren die op de gewasgroei van invloed kunnen zijn.

- 2) Kwadrantbemonstering (o.a. toegepast bij ecologische studies in natuurlijke systemen): Een gebied van 10 bij 10 meter wordt uitgezet en hieruit een monster genomen van 50 prikken, random over de plot gestoken. Met een boor van 10 cm lengte en een diameter van 1.7 cm levert dit een monster van ongeveer 1 liter op (ruim een kilo grond). Voor herhalingen binnen het kwadrant kunnen bijvoorbeeld vijf monsters van 10 prikken genomen worden.
- 3) Bemonstering voor advies om schade te voorkomen: Monster intensiteit, monstergrootte en -diepte zijn afhankelijk van de nematodensoort, gewas (Fig. 3) en nationale regels (tabel 2.2 uit McSorley 1987). Bij adviesbemonstering door het Bedrijfslaboratorium voor Grond en Gewasonderzoek (BLGG) vindt de monstername plaats in braakliggende grond, 2 à 3 weken na de oogst. De monsters bestaan uit 60-70 prikken, waarbij de prikken steeds op vaste afstand van elkaar in een rasterpatroon genomen worden. Hoe intensiever het onderzoek (bv. bij een duur gewas waarin meer economische schade wordt verwacht), hoe dichter het raster wordt ingesteld en hoe meer monsters per hectare worden genomen. Fig. 4 geeft een voorbeeld van adviesbemonstering in de akkerbouw, waarbij één monster van 70 prikken per hectare genomen wordt.

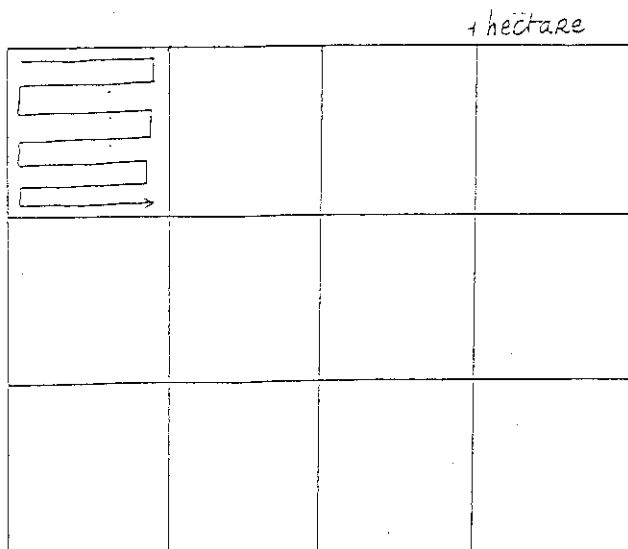


**Figuur 3** Verschillende bemonsteringspatronen  
a) in braakliggend veld b) in boomgaard  
c) van een enkele plant/boom  
(uit Barker et al, 1978)



**Figuur 4**  
**Adviesbemonstering in**  
**akkerbouw waarbij één**  
**monster per hectare**  
**wordt genomen.**

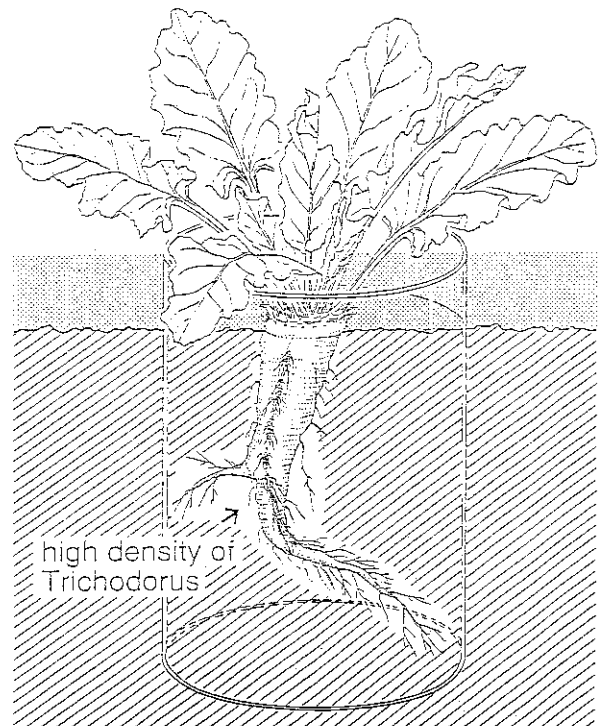
- 4) Bemonstering voor 'vrij-verklaring': Monsterintensiteit, monstergrootte en -diepte zijn afhankelijk van de nematodensoort, het gewas en nationale regels. Fig. 5 is een voorbeeld van bemonstering die door het BLGG wordt uitgevoerd in het intensieve aardappelmoehheids-onderzoek. Het rasterpatroon is nu zeer dicht en per hectare worden 12 monsters van 70 prikken genomen waarbij het veld in blokken is opgedeeld met een maximale lengte-breedte verhouding van 1:3. Bij dit onderzoek is het niet alleen van belang om de besmetting te ontdekken, maar ook om de besmetting te lokaliseren zodat afkeuring of grondontsmetting tot een deel van het perceel beperkt kan worden.



**Figuur 5**  
**Bemonstering in het**  
**intensieve aardappel-**  
**moeheids-onderzoek waar-**  
**bij 12 monsters per**  
**hectare worden genomen.**

5) 'Brancard'-bemonstering: wordt toegepast bij de bemonstering van nematodesoorten die extreem gevoelig zijn voor wrijving en andere mechanische schade, zoals Trichodoridae en Longidoridae. Het bemonsteren wordt uitgevoerd met een zo wijde buis (1.2.1).

Bij de bemonstering van een plant waarvan verwacht wordt dat deze nematodesoorten erop voorkomen wordt een dergelijke buis voorzichtig over de plant in de grond gedrukt en het geheel van blik met grond en plant wordt, zeer voorzichtig, in een plastic zak gedaan, met zo min mogelijk schokken naar het lab vervoerd en in zijn geheel opgespoeld (Fig. 6).



**Figuur 6**  
**Trichodorus bemon-**  
**ring met een koker**

### 1.3. TRANSPORT EN OPSLAG

Monsters dienen bij voorkeur verzameld en bewaard te worden in plastic of in geprepareerde (paraffine) papieren zakken om uitdroging te voorkomen. Het voordeel van papier is dat er makkelijk op geschreven kan worden; bij plastic zakken moet een apart label, liefst met potlood beschreven zodat het niet kan vlekken of verbleken, worden aangehecht. Blootstelling van de monsters aan hoge temperaturen (bv. in de kofferbak van een auto midden in de zon) moet vermeden worden, een koelbox kan hierbij uitkomst bieden. De monsters moeten voorzichtig gehanteerd worden omdat nematoden door de schokken en wrijving kunnen doodgaan. Dit geldt des te meer voor uiterst gevoelige soorten zoals de eerder genoemde Trichodoridae (zie 1.2.3). De monsters moeten zoveel mogelijk meteen verwerkt worden omdat opslag invloed heeft op de nematodenaantallen en soortesamenstelling. Data over de effecten van opslag zijn vooral beschikbaar voor planteparasieten, waarbij zowel toe- als afname waargenomen werd. Van de bacterivore Rhabditidae is bekend dat ze zich ook bij 4°C nog vermeerderen kunnen. Een richtlijn voor opslag van monsters in de gematigde streken is bewaren bij 4°C en de bewaartijd zoveel mogelijk beperken.

### 1.3.1. Monsters fixeren in het veld

Als verwacht wordt dat het een tijd kan duren voordat de monsters verwerkt worden is fixatie in het veld een mogelijkheid. In het algemeen wordt zoveel formaline (4-10%) toegevoegd tot het monster onder staat en dan geroerd of geschud (Elmiligy & de Grisse 1970; Freckman et al. 1977). Bij natte monsters, met name sedimentmonsters, moet rekening worden gehouden met het feit dat de concentratie van de formaline sterk afneemt door verdunning met het water uit het monster. Als de concentratie onder de 4% komt is de fixatie onvolledig.

### 1.4. MONSTER-VOORBEWERKING

#### 1.4.1. Meten: volume of gewicht?

De omvang van monsters kan gemeten worden op basis van volume of gewicht, welke beide voor- en nadelen hebben. De standaardmethoden bij onderzoek voor advies en vrij-verklaring zijn meestal gebaseerd op volume (100 of 200 ml grond), in andere studies wordt vaker met gewicht gewerkt (100 of 200 g). Vanuit de organismen gezien is de ruimte, het volume van de grond, relevanter voor hun vóórkomen dan het gewicht (Seinhorst 198?). De natuurlijke structuur is echter door het bemonsteren en mengen verdwenen en het is moeilijk om in een gegeven volume gelijke hoeveelheden grond te krijgen door de verschillende compactiegraad. Meten op basis van gewicht heeft als nadeel dat het vochtgehalte van de grond zeer verschillend kan zijn en dus de hoeveelheid grond per gegeven gewicht sterk varieert. Dit kan ondervangen worden met een simpele bepaling van het droge stof gehalte en terugrekening naar standaard drooggewicht (zie 2.5. Analyse van extracten).

Bepaling van het droge stof gehalte: Neem een klein submonster ( $\pm 20$  g is voldoende) van de vochtige grond en weeg dit. Droog het bij  $105^{\circ}\text{C}$  tot het gewicht niet meer afneemt (Southey 1986) (bij die hoge temperatuur is 24 uur meestal voldoende; is er geen dergelijke stoof beschikbaar en wordt bij lagere temperatuur gedroogd dan is meer tijd nodig). Het gewicht na drogen gedeeld door het gewicht voor drogen levert het droge stof gehalte.

In ecologische studies wordt de omvang van monsters ook wel uitgedrukt in oppervlakte en kunnen de gevonden nematodenaantallen worden teruggerekend naar vierkante meter. Bijvoorbeeld,  $x$  prikken met een boor van diameter  $d$  levert een bemonsterd oppervlakte van  $x * (\pi * (\frac{1}{2}d)^2)$ . Een probleem bij het gebruik van een halfopen (guts)boor is dat de oppervlakte van een steek vaak minder dan een cirkel is omdat er grond uit kan vallen; met bovenstaande berekening worden de aantallen dan onderschat. Daarnaast kunnen aantallen van verschillende bemonsteringsdiepten niet vergeleken worden.

#### 1.4.2. Submonsters nemen; Mengen

Voor het krijgen van een bepaalde mate van nauwkeurigheid zijn vaak relatief grote monsters nodig. Deze kunnen meestal niet in zijn geheel verwerkt worden zodat het nemen van submonsters (N.B.: wel een extra bron van variatie!) nodig is. Voordat een representatief submonster genomen kan worden moet het monster gehomogeniseerd (gemengd) worden. Als dit voldoende gebeurd is is één submonster in principe voldoende (Carbonell & Angulo 1979). Het mengen kan met de hand of machinaal plaatsvinden. Maar: elke handeling leidt in principe tot beschadiging en sterfte van nematoden dus voorzichtigheid is geboden!

Met de hand mengen veroorzaakt minder beschadiging van de nematoden dan machinaal mengen en verdient daarom de voorkeur. Voor de meeste typen monsters is het goed bruikbaar, behalve voor zware klei. Het nadeel van handmatig mengen is dat het veel arbeid kost en minder gestandaardiseerd uitgevoerd kan worden; dat maakt het voor routinelabs minder geschikt. Een werkwijze voor grond of ander fijn materiaal (bv. zaad) is als volgt: Zeef het monster over een grove zeef (maaswijdte 0.5-1 cm) om steentjes en wortels etc. te verwijderen. Op een zeiltje ( $\pm 1 \times 1$  m) wordt het monster gemengd door het zeil aan een hoek op te tillen zodat de grond naar de tegenoverliggende hoek rolt. Dit wordt een (vast) aantal keren herhaald met de verschillende hoeken. Na het mengen wordt het submonster genomen door verspreid kleine schepjes uit het monster te nemen, tot het gewenste gewicht of volume (*in principe* kan een representatief monster genomen worden door alleen verspreid kleine schepjes te nemen, zónder vooraf te mengen!).

Machinaal mengen vindt meestal niet plaats voor het nemen van submonsters, maar wel voor het homogeniseren of suspenderen van een (sub)monster. Voor plantenmateriaal kan een bekermixer gebruikt worden, voor grondmonsters wordt vaak een mengmachine zoals de Hobart deegmengmachine toegepast, welke bestaat uit een grote beslagkom en een deegschop. Vantevoren wordt water toegevoegd tot het monster net onder staat. Bij zware klei of bij grote grondmonsters wordt natriumhexametafosfaat of een ander zout toegevoegd (dosering 1% van het gewicht van de te behandelen grond) om de binding tussen de (klei)deeltjes te breken. Tylenchiden ondervinden hier geen schade van maar het effect van natriumhexametafosfaat op andere nematoden is niet bekend.

#### 1.4.3. Weken

Monsters van steenwol, mest, strooisel en andere ongewone substraten kunnen meestal zonder problemen worden opgespoeld met een van de extractiemethoden voor plantenmateriaal of grond (2.2 en 2.3), echter vóór de extractie kan plaatsvinden moeten dergelijke monsters dan wel geweekt worden. De extractie verloopt zo veel gemakkelijker en de extractieopbrengst is vaak veel hoger. Het monster wordt hiervoor in een kom gedaan, met water bedekt en eventueel voorzichtig omgeroerd. Na het weken (afhankelijk van het substraat, gedurende minimaal 1 uur) kan

het monster eventueel nog met een mixer gehomogeniseerd worden (zie bv. Schouten & Arp (1991) over strooisel).

#### **1.4.4. Drogen**

Bij monsters die voor de extractie gedroogd moeten worden, zoals bij sommige extractiemethoden voor cysten, is het het meest praktisch om vóór het drogen al een submonster te nemen en niet het gehele monster te drogen. Klei is na drogen helemaal niet meer mengbaar zodat dan onmogelijk een goed submonster genomen kan worden. Ook scheelt het ruimte als slechts één submonster gedroogd hoeft te worden. De hieronder beschreven methoden kunnen ook gebruikt worden voor het drogen van het debris dat na de eerste cystextractie overblijft.

- *Drogen bij kamertemperatuur*: Spreid het (sub)monster uit (op een zeiltje, lade etc) en laat het aan de lucht drogen. Pas op voor tocht: droge cysten waaien gemakkelijk weg en gaan dan verloren voor analyse of besmetten een ander monster.

- *Drogen in een droogkamer/droogkast*: Houd de (sub)monsters in poreuze (papieren) zakken. Ze drogen door de warmte en de luchtcirculatie (ventilatoren) in de kamer.

- *Snel drogen in een stoof*: Bij een temperatuur van 40-100°C, op een plaat of lade.

**N.B.:** Drogen, vooral als het niet geleidelijk gaat en bij hoge temperatuur, is zeer schadelijk voor de levende inhoud van de cysten, vooral bij *Heterodera* en *Punctodera* (zie 2.1.4).

#### **Literatuur**

Proctor and Marks 1975, Barker et al. 1978, Elliott 1979, Barker & Campbell 1981, Goodell 1982, McSorley & Parrado 1982, Ferris 1984, McSorley 1987, Prot & Ferris 1992, Alkemade 1993



## HOOFDSTUK 2. EXTRACTIE

---

### 2.1. INLEIDING

#### 2.1.1. Principes

De meest eenvoudige manier om nematoden te isoleren uit het materiaal waarin ze voorkomen is direct, door het monster in water te brengen en de nematoden onder de microscoop uit te zoeken. Het is echter arbeidsintensief en vervelend werk en de methode is beperkt tot uiterst kleine monsters. De meeste extractiemethoden zijn dan ook indirect. Hierbij wordt gebruik gemaakt van een aantal eigenschappen waarin de nematoden van hun medium verschillen:

a) *Gewicht en bezinkingssnelheid:*

Nematoden worden in water gescheiden van de sneller zinkende deeltjes. De nog zwevende nematoden kunnen dan worden afgegoten (gedecanteerd). Toepassingen van dit principe zijn het instellen van een onderstroom die de nematoden zwevende houdt terwijl andere deeltjes bezinken (elutriatie) en het gebruik van een vloeistof met een groter soortelijk gewicht (s.g.) dan de nematoden, zodat deze gaan drijven terwijl deeltjes met een groter s.g. dan de vloeistof bezinken. Gedroogde cysten zijn een speciaal geval; deze bevatten een luchtbel waardoor ze in water blijven drijven en zo van de zinkende deeltjes wordt gescheiden.

b) *Grootte en vorm:*

Door hun grootte en langgerekte vorm kunnen nematoden gescheiden worden van de afgeronde (grond-)deeltjes door gebruik van zeven met verschillende maaswijdten.

c) *Beweeglijkheid:*

Nematoden kunnen van inerte deeltjes worden gescheiden door hun aktiviteit. Als het monster op een vochtig filter in een schaalje water wordt gelegd kruipen de nematoden uit het monster in het water en kunnen dan als heldere suspensie worden verzameld.

Veel extractiemethoden zijn gebaseerd op een combinatie van de bovengenoemde principes (zie Tabel 2.1 op pagina 14).

#### 2.1.2. Extractie uit plantenmateriaal

Nematoden kunnen voorkomen in vele soorten plantenmateriaal. Planteparasieten worden niet alleen in wortels, maar ook in knollen, bollen, stengels, bladeren en zaden aangetroffen. Daarnaast bevatten substraten zoals strooisel, mos of compost vaak hoge aantallen niet-planteparasitaire ('saprofage') nematoden. Extractiemethoden voor plantenmateriaal (Fig. 2.1) zijn vooral gebaseerd op het principe van de beweeglijkheid van nematoden en hebben variaties in het al dan niet vooraf verkleinen van het materiaal om het uitkruipen van de nematoden te versnellen. Naast directe observatie onder de microscoop is de mixer-centrifuge-drijfmethode de enige methode die geen ge-

bruik maakt van beweeglijkheid en is daarom geschikt voor extractie van gezwollen endoparasitaire stadia en eieren.

### 2.1.3. Extractie uit grond en andere substraten

Extractiemethoden voor grond (Fig. 2.1) worden vaak ook toegepast voor sedimenten, steenwol, mest en andere substraten die in suspensie zijn te brengen en waarin nematoden kunnen voorkomen (N.B.: zie 1.4.3). De meeste methoden maken gebruik van een combinatie van de hierboven genoemde principes. Er zijn echter grote verschillen in extractieëfficiëntie, mogelijke monstergrootte en kosten (Tabel 2.1). Naast direct uitzoeken onder de microscoop is de centrifuge-drijfmethode de enige methode waarmee zowel beweeglijke als trage en onbeweeglijke nematoden geïsoleerd kunnen worden.

### 2.1.4. Extractie van cysten

Voor de extractie van cysten zijn aparte methoden ontwikkeld omdat cysten in vergelijking tot andere nematoden(-stadia) een afwijkende grootte, vorm en gewicht hebben. Er wordt onderscheid gemaakt tussen extractie uit droge en uit vochtige grond, ook 'droge' resp. 'natte' extractie genoemd (Fig. 2.2). 'Droge' extractie maakt gebruik van het gegeven dat gedroogde cysten (meestal) in water blijven drijven omdat ze een luchtbel bevatten. Voor een geslaagde extractie moet het monster echt grondig gedroogd zijn. Hier kan *Globodera* goed tegen maar bij *Heterodera* en *Punctodera* gaat de vitaliteit van de cystinhoud (eieren en larven) sterk achteruit, zeker als de droging niet geleidelijk verloopt. Als er met het geïsoleerde materiaal verder gekweekt of geïnoculeerd moet worden is voor die soorten een 'natte' extractiemethode meer geschikt. Een ander nadeel van 'droge' extractie is dat deze niet altijd volledig is voor de jonge (nog niet uitgekleurde) volle cysten die minder goed blijven drijven. Zo zou de veldpopulatie onderschat worden omdat relatief meer (half)lege cysten gevangen worden. Bij 'natte' extractie hoeven de monsters niet gedroogd te zijn. Bij deze methodes zorgt een onderstroom dat de cysten in de suspensie blijven zweven terwijl gronddeeltjes bezinken (elutriatie). Ook jonge volle cysten kunnen hiermee goed geïsoleerd worden.

Na de extractie moeten de spoelsels vaak nog opgeschoond worden omdat ze nog veel organisch materiaal kunnen bevatten (zie 2.4.5). De termen 'droog' en 'nat' zijn weer van toepassing omdat bij de verschillende methoden het debris al of niet gedroogd moet worden alvorens de opschoning kan plaatsvinden (en moet dus weer worden afgewogen of de inhoud van de te isoleren cysten levenskrachtig moet blijven) (Fig. 2.2 op pagina 13).

### 2.1.5. Keuze van een extractiemethode

Een ideale extractiemethode zou alle nematodestadia van alle nematodesoorten extraheren met een efficiëntie van 100%, ongeacht temperatuur en bodemtype, tegen geringe kosten (arbeid, apparatuur, water) (McSorley 1987). Helaas is geen van de bestaande methoden zo ideaal en moet er per situatie een meest geschikte methode gekozen worden. Een van de problemen bij het selecteren van een methode is dat, ook al is er veel literatuur over beschikbaar, de vergelijking van (resultaten van) verschillende methoden moeilijk is. Dit komt niet alleen doordat de gepubliceerde data zeer uiteenlopende bodemtypes en nematodesoorten betreffen, maar ook omdat de precieze uitvoering van methoden vaak erg verschilt, zowel op lokaal als internationaal niveau. Uitgaande van de principes die in de eerste paragraaf genoemd zijn, zijn er echter wel trends aan te geven. Tabel 2.1 (op pagina 14) over methoden die in dit boek besproken worden en Tabel 2.2 (op pagina 15) (McSorley, 1987) geven informatie over een aantal andere methoden en specifieke nematoden-soorten):

\* Bij methoden die gebaseerd zijn op verschillen in *gewicht en bezinkingssnelheid* is het kritische punt het moment waarop genoeg vuil gezonken is maar de meeste nematoden nog zweven. In dat verband zijn methoden met een onderstroom (Oostenbrink, Seinhorst, en Kort trechters) beter (controleerbaar) dan methoden zonder onderstroom (decanteren, Baunacke, Fenwick), maar voor de eerste zijn wel dure apparatuur en meer water nodig. De bezinkingstijd is bij zandige gronden geen, maar bij kleiige of organische gronden wel een probleem. De fijne (klei)deeltjes zinken bijna net zo langzaam als nematoden, zodat de gedecanteerde of afgetapte suspensie nog verdere behandeling behoeft (bijvoorbeeld zeven). De centrifuge-drijfmethode, die gebruik maken van verschillen in *soortelijk gewicht*, zijn (afgezien van de extractiemethoden voor cysten) als enige geschikt voor de isolatie van trage en onbeweeglijke nematoden. Ook deze methoden zijn echter selectief omdat niet alle nematoden de extractievloeistof overleven (dorylaimiden zijn relatief gevoelig) of in een bepaalde dichtheid blijven drijven.

\* Methoden die gebruik maken van het verschil in *grootte en vorm* tussen nematoden en andere deeltjes lopen het risico bij zeven met te kleine maaswijdte dat de poriën verstopt raken (zeker bij grond met een hoge slibfractie) en bij zeven met te ruime maaswijdte dat er nematoden doorheen spoelen en voor analyse verloren gaan. Volgens Byrd et al. (1976) en McSorley & Parrado (1981) is een maaswijdte van 45  $\mu\text{m}$  nog te groot om de kleine larven van *Meloidogyne*, *Tylenchulus*, resp. *Rotylenchulus* te vangen; zij bevelen het gebruik van 38  $\mu\text{m}$  zeven aan. In Nederland wordt vooral gebruik gemaakt van een set van vier of vijf 45  $\mu\text{m}$  zeven; kleine larven die dan door de eerste zeef heenspoelen, blijven dan wel op de volgende of daaropvolgende zeef liggen (zie ook Oostenbrink 1954 en Seinhorst 1956).

\* Bij methoden die (mede) gebaseerd zijn op de *beweeglijkheid* van nematoden zullen trage en onbeweeglijke nematoden en eieren nooit deel uitmaken van de geëxtraheerde nematodenpopulatie. Het aantal nematoden dat uit een monster zal bewegen is o.a. afhankelijk van hoeveel tijd ze daarvoor krijgen (extractieduur, zie ook 2.3.1. Nematodenfiltermethode) en de aard van het monster. De efficiëntie ligt meestal hoger als de laag debris (slib, wortelmateriaal etc) op het filter of de trechter dunner is en, in het geval van plantenmateriaal, als het monster al is 'opengebroke'n' bijv. in een bekermixer. Een ander punt van overweging is dat de laboratoriumtemperatuur invloed kan hebben op de beweging van de nematoden uit het monster en dus op de aantallen in de eindsuspensie. Hierbij zouden optimumtemperaturen per nematodensoorl kunnen verschillen (McSorley 1987). Ook de temperatuur van het seizoen waarin het monster verzameld is kan van invloed zijn. Barker et al. (1969) suggereren dat de extractieopbrengst in de winter lager zou liggen door de inactiviteit van de nematoden tijdens die lage temperaturen. Tenslotte zijn er een paar nematodensoorl die i.p.v. omlaag, omhoog kruipen (zg. negatieve geotaxis) en dus nooit in het extractieschaaltje gevonden worden (o.a. *Turbatrix aceti*, het azijnaaltje, en een aantal insecteparasieten).

Naast deze principes zijn ook grondsoort en eigenschappen van nematodensoorl van invloed op de extractieopbrengst. Voor veel methoden geldt dat het in het algemeen moeilijker is om nematoden uit klei- of organische gronden te isoleren dan uit zandgronden (Tabel 2.1). De klei- en organische deeltjes blijven net als de nematoden drijven en verstoppen de zeven. Ze kunnen ook de eindsuspensie vervuilen. Gewoonlijk neemt het rendement van de extractie af bij grotere monsters. Voor verscheidene nematodensoorl zijn in Tabel 2.2 algemene richtlijnen voor extractie gegeven.

Tenslotte zijn er met betrekking tot de kosten (apparatuur, arbeid, water) ook grote verschillen tussen de methoden (Tabel 2.1). Over het algemeen zijn methoden die alleen gebruik maken van beweeglijkheid het goedkoopst en de methoden die een onderstroom toepassen (elutriatie) het duurst. Daarmee wordt echter vaak wel een veel hogere extractieefficiëntie verkregen, ook voor grote monsters.

### **Literatuur**

Oostenbrink 1970, Ayoub 1980, McSorley 1987

## PLANT

**Direct** Na dissectie uitzoeken in water onder de microscoop  
(Eventueel eerst een kleurtechniek toepassen)

**Indirect** [ *beweeglijke nematoden*  
- Baermann trechter  
- Regenapparaat  
- Mixer-nematodenfiltermethode  
] *beweeglijke + onbeweeglijke nematoden*  
- Mixer-centrifuge-drijfmethode

## GROND e.d.

**Direct** In water uitzoeken onder de microscoop

**Indirect** [ Suspenderen en decanteren |  
- Cobb's methode | Opschoning van  
- Flessenmethode | de suspensie  
- Oostenbrink trechter | ]

**Opschoning van de suspensie**

| *beweeglijke nematoden*  
- nematodenfilters  
| *onbeweeglijke + beweeglijke nematoden*  
- centrifuge-drijfmethode

**Figuur 2.1** Extractiemethoden voor plant en grond

## CYSTNEMATODEN

### *beweeglijke stadia*

- L2, \_\_ uit grond/plant (zie Fig. 2.1)

### *onbeweeglijke stadia*

- L3-L5, \_\_ uit plant (Mixer-centrifuge-drijfmethode)

## **CYSTEN uit GROND**

### *'droge' extractie*

- Baunacke methode
- Fenwick kan
- Schuilingcentrifuge

## **OPSCHONEN DEBRIS**

drogen, waarna een chemische  
scheiding

### *'natte' extractie*

- Kort trechter
- Seinhorsttrechter

*'natte' opschoning*  
- Centrifuge-drijfmethode  
*'droge' opschoning*  
- drogen, waarna een chemische  
scheiding

**Figuur 2.2 Extractiemethoden voor cystnematoden**

**Tabel 2.1** Eigenschappen van verschillende extractiemethoden

EXTRACTIEMETHODE	principe (*)	max. monster grootte (g)	klei ?	extractie- efficintie	kosten van appara- tuur	arbeids kosten	water verbruik
<b>(voor PLANT)</b>							
Dissectie	bw	5	-	-	-	-	-
Baermann trechter	bw	20	-	+	+	+	+
Regenapparaat	bw,bz	20	-	++	++	+	+++
Mixer-nematoden- filtermethode	bw	50	-	+++	++	+	+
Mixer-centrifuge- drijfmethode	sg	50	-	+++	+++	++	+
<b>(voor GROND e.d)</b>							
Nematodenfiltermethode	bz,bw	50	n	+	+	+	+
Cobb's methode	bz,gv,bw	300	j	++	++	+++	+
Flessenmethode	bz,gv,bw	100	j	++	+	+++	+
Oostenbrink trechter	bz,gv,bw	1000	j	+++	+++	++	++
Centrifuge-drijfmethode zonder voorextractie	sg	50	j	+	+++	++	+
Centrifuge-drijfmethode met voorextractie	bz,(gv),sg	1000	j	+++	+++	+++	++
<b>(voor CYSTEN)</b>							
Baunacke methode	gv,dl	50	j	+	-	+	+
Fenwick kan	gv,dl,bz	300	j	++	++	++	+++
Schuilng centrifuge	sg,dl	200	n	++	+++	++	+
Kort trechter	bz,gv	300	j	+++	+++	++	+++
Seinhorst trechter (cysten)	bz,gv	300	j	+++	+++	++	+++

(\*) bw: beweeglijkheid (nematodenfilters, Baermann varianten)  
 bz: bezinkingssnelheid (decanteren, elutriatie)  
 dl: droge cysten drijven door luchtbel  
 gv: grootte en vorm (zeven)  
 sg: soortelijk gewicht (drijfmethode, Schuilng centrifuge)

n/j                    nee/ja  
 -                    niet relevant (of zeer klein/laag)  
 +                    klein (laag)  
 +++                groot (hoog)  
 N.B.: gradaties zijn grof geschat

**Tabel 2.2** Mogelijke extractiemethoden voor een aantal nematodengeslachten en -groepen (gebaseerd op Tabel 2.4 uit McSorley 1987)

NEMATODEGESLACHT OF GROEP	PROBLEEM VAN EXTRACTIE	MOGELIJKE OPLOSSING
<u>Aphelenchoides</u> <u>Ditylenchus</u>  N.B.: <u>Rhadinaphelenchus</u>	Komen voor in ongebruikelijke substraten  'Zwemmen' en gaan daardoor in het regenapparaat verloren	Regenapparaat  Monster in blender, suspensie lang laten bezinken en dan afgieten
<u>Criconematidae</u> <u>Hemicycliophora</u> <u>Hoplolaimus</u>	Trage nematoden, geringe extractie bij bewegings-afhankelijke methoden	Centrifuge-drijfmethode Langere extractie-perioden
<u>Meloidogyne</u> <u>Rotylenchulus</u> <u>Tylenchulus</u>	Kleine larven gaan verloren bij het zeven	Gebruik extra 45 µm zeef of 38 µm eindzeef
Cysten  <u>Heterodera</u> <u>Punctodera</u>	Afwijkende vorm, grootte en gewicht  Bij droging gaat vitaliteit van levende cystinhoud sterk achteruit	Zie extractiemethoden voor cysten (Figuur 2.2)  Gebruik een 'natte' extractie- en opschoningsmethode indien een levende cystinhoud gewenst is
Trichodoridae	Zeer gevoelig voor beschadiging	Na 'brancard'-bemonstering (1.2.3) het <u>gehele</u> monster als suspensie opspelen en voorzichtig zeven (bv. topzeef Oostenbrink trechter)
<u>Longidorus</u> <u>Xiphinema</u> andere grote Dorylaimida	Zwaar en groot, bezinken snel	Modificatie van de Oostenbrink trechter methode (2.3.4.2)
Dorylaimida algemeen	Gevoelig voor zware metalen  Gevoelig voor extractievloeistof (met name suiker) in (centrifuge-) drijfmethode	Vermijd zeven en schaaltes met zware metalen (bv. koper)  Vermijd suiker en beperk verblijftijd in extractievloeistof; spoel de nematoden goed na met water
Rhabditida algemeen	Snelle reproductie, ook bij lage temperaturen; uitkomst eieren en dauerlarven	Vermijd lange (> 2 dagen) extractietijd bij bewegings-afhankelijke methoden. Voor populatie-structuurstudies het monster eerst fixeren
Sommige insecteparasieten (o.a. <u>Fungitonicium</u> )	Kruipen omhoog in plaats van omhoog, waardoor ze bij bewegings-afhankelijke methoden niet in het extractieschaaltje terecht komen	Centrifuge-drijfmethode (monster eventueel eerst fixeren)



## **2.2. EXTRACTIE UIT PLANTENMATERIAAL**

### **2.2.1. Dissectie**

#### ***Toepassingsgebied***

De methode is geschikt voor diagnose. Het (geïnfecteerde) plantenmateriaal wordt direct onder de microscoop op nematoden onderzocht.

#### ***Benodigheden***

binoculair  
petrischaal  
prepareernaalden, pincet  
visnaald, penseel (No. 1)  
schoon water

#### ***Werkwijze***

Was het plantenmateriaal voorzichtig schoon en leg het in een petrischaal met water. Prepareer het monster open met behulp van prepareernaalden en pincet, bij een vergroting van 15-50 maal. De vrijkomende nematoden, eiproppen etc. kunnen met behulp van een visnaald (zie 3.1) of een penseeltje uit de suspensie worden gevist. Bekijk het monster na 2-3 uur nog eens, omdat beweeglijke nematodenstadia dan uit het materiaal gekropen kunnen zijn.

**N.B.:** Detectie kan worden vergemakkelijkt door het materiaal eerst te kleuren: zie 3.7. 'Kleuren'

## 2.2.2. Baermann trechter

### *Toepassingsgebied*

De Baermann trechter wordt gebruikt voor de extractie van beweeglijke nematoden uit plantenmateriaal (en grond, zie 2.3.1). De monstergrootte is afhankelijk van de trechterdiameter en de aard van het materiaal (Fig. 7). Bij extractie uit grond moet rekening gehouden worden met een vuile eindsuspensie.

### *Principe*

De methode maakt gebruik van de beweeglijkheid van nematoden. Wanneer (geïnfecteerd) (plante-)materiaal in water ligt krui-  
pen de nematoden uit het materiaal in het water en bezinken.

### *Benodigdheden*

schaar of mes  
trechter (hoek van de wanden 45°C) met aan het uiteinde  
een stuk rubber slang, afgesloten met een knijpklem  
stukje kaasdoek  
schoon water

In plaats van een stukje kaasdoek dicht te vouwen kan een monster ook op een zeefje, dat in het water ligt, worden uitgespreid. Het extractie oppervlak wordt daardoor groter en de extractieëfficiëntie wordt daardoor iets groter. Zorg er altijd voor dat het monster NOOIT droog komt te liggen.

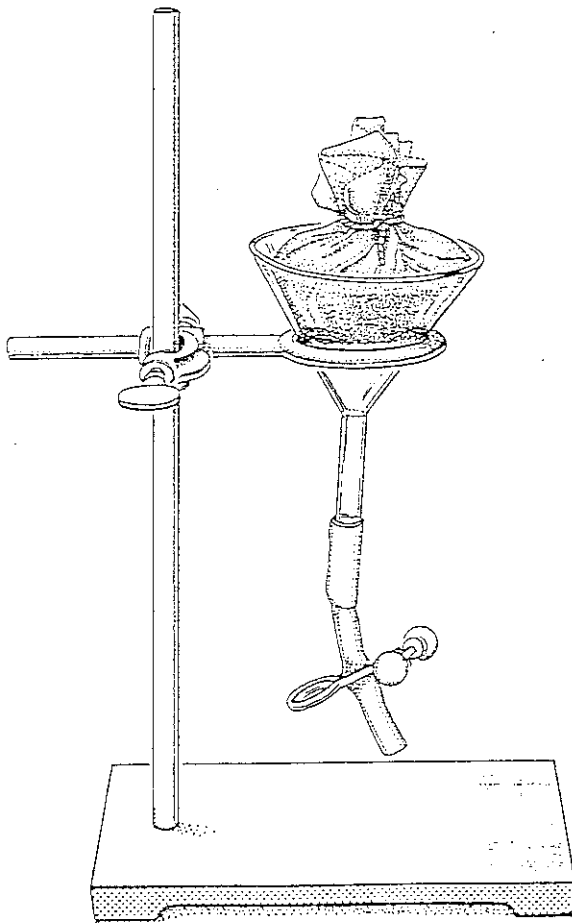
### *Werkwijze*

- 1 Spoel het materiaal voorzichtig schoon en knip het in stukjes van  $\pm 1$  cm lengte. Neem een submonster van afgemeten grootte (bv. 10 g) en wikkel dit in een stukje kaasdoek tot een losse bundel.
- 2 Spoel de trechter schoon. Plaats de trechter in een rek en vul hem met water, tot  $\pm 1$  cm onder de rand. Doe dit voorzichtig om luchtballen te voorkomen. Kijk na of de knijpklem goed sluit en de rubber slang niet drupt. Laat eventueel wat water weglopen als er een luchtbel in zit.
- 3 Hang het monster in de kaasdoek in de trechter, zó dat al het materiaal onder water staat maar de onderkant van de doek de trechterbodem niet raakt. De nematoden zullen uit het materiaal in het water krui-  
pen en onderaan bezinken.
- 4 Na een periode van 16-72 uur (N.B.: monsters van verschillende extractieduur kunnen niet vergeleken worden, zie 2.3.1) kan de nematodensuspensie afgetapt worden door de knijpklem te openen. Tussendoor aftappen en water bijvullen vergroot de kans dat de bezonken nematoden nog leven.

### **Voor- en nadelen**

De verkregen suspensies zijn schoon en de methode is simpel en goedkoop. De extractieëfficiëntie bij kleine monsters is redelijk goed, maar neemt exponentieel af als de monsters groter worden. Door ophoping van stofwisselingsproducten en microorganismen en door zuurstofgebrek onderin de trechtersteel gaan veel nematoden dood (om bacteriegroei tegen te gaan kan een paar ml 0.15% methyl-p-hydroxybenzoaat aan het water toegevoegd worden, tegen zuurstofgebrek kan in plaats van water een 0.15% oplossing waterstofperoxyde gebruikt worden).

**Literatuur:** Baermann 1917, Southey 1986 (overzicht)



**Figuur 7**  
**Baermantrechter opstelling**

### 2.2.3. Regenapparaat

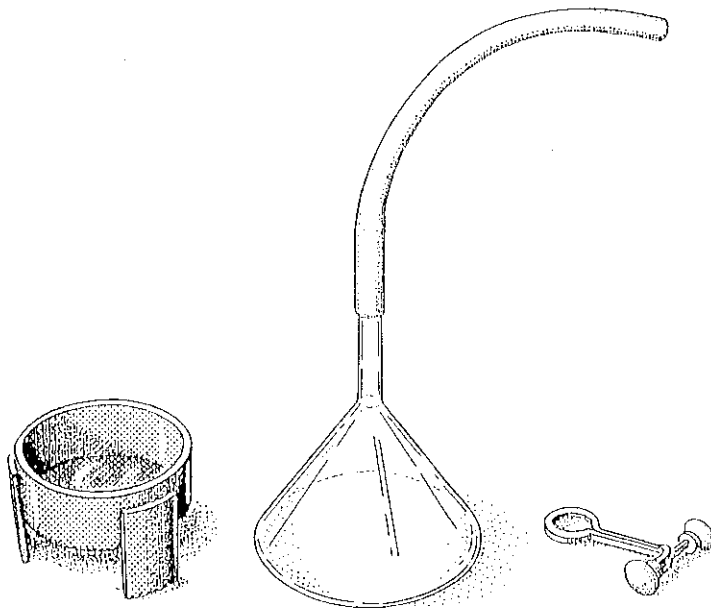
#### *Toepassingsgebied*

Het regenapparaat (mistkamer) wordt gebruikt voor de extractie van beweeglijke nematoden uit plantenmateriaal. De monster-grootte is afhankelijk van de trechterdiameter en de aard van het monster.

#### *Principe*

De methode maakt gebruik van de beweeglijkheid en bezinkingssnelheid van nematoden. Wanneer (geïnficeerd) (plante-)materiaal in water ligt kruipen de nematoden uit het materiaal in het water en bezinken.

Een regenapparaat bevat een set van 16 Baermann trechters in een rek met een sproeier erboven. Door een constante fijne waterregen over de monsters op de trechters wordt zuurstofgebrek voorkomen. Ophoping van plantesappen, afbraakproducten en microörganismen vindt niet plaats omdat deze met het overvloeiende water worden afgevoerd (Fig. 8).



**Figuur 8**  
**Zeefje, trechter**  
**en clip voor het**  
**regenapparaat**

#### *Benodigdheden*

regenapparaat (Catalogue, No. 700)

0.385 mm zeefjes (Ø 8 cm) met drie pootjes

De pootjes voorkomen dat het zeefje het waterniveau raakt. Het idee van Oostenbrink hierachter was dat de nematoden in de trechter vallen en zo een valsnelheid krijgen waardoor ze zinken en niet verloren gaan als de trechter overstroomt door de constante watertoevoer. De veel lichtere schimmel- en bacteriesporen daarentegen zullen niet zo snel zinken en met het overlopen van de trechter wegspoelen. Viglierchio & Schmitt (1983) vonden echter geen significante opbrengstverschillen tussen zeefjes met of zonder pootjes.

schaar of mes

schoon water

### **Werkwijze**

- 1 Spoel het plantenmateriaal voorzichtig schoon en knip het in stukjes van  $\pm 1$  cm. Neem een submonster van afgemeten grootte (bijv. 10 g) en spreid dit uit op het zeefje (leg bij vuil, fijn of zetmeelrijk materiaal eerst een filtreerpapiertje op het zeefje).
- 2 Spoel de trechter schoon. Plaats de trechter in het regenapparaat en vul hem geheel met water. Doe dit voorzichtig, om luchtballen te voorkomen. Kijk na of de knijpklem goed sluit en de rubber slang niet drupt. Laat eventueel wat water weglopen als er een luchtbel in zit.
- 3 Plaats het zeefje met het monster op de trechter. De onderkant van het zeefje mag de waterspiegel niet raken.
- 4 Na een bepaalde extractietijd kan de nematodensuspensie worden afgetapt door de klem onderaan de rubber slang te openen. Doe dit niet alleen op het einde van de extractieperiode, maar ook op tussenliggende tijdstippen om de vitaliteit van de nematoden zoveel mogelijk te behouden.

De lengte is o.a. afhankelijk van het materiaal en de nematodesoort. Voor Pratylenchus uit wortels geldt een extractietijd van 5-7 dagen, terwijl voor de isolatie van Ditylenchus uit stengelmateriaal een paar uur voldoende kan zijn. N.B.: Het wordt afgeraden om deze methode te gebruiken voor Rhadinaphelenchus. Deze nematode is zó beweeglijk dat ze niet zinkt en met het overlopen van de trechter wegspoelt.

### **Voor- en nadelen**

Vergeleken met de Baermann trechter levert het regenapparaat nematoden op die in betere conditie zijn omdat ophoping van afbraakproducten en microorganismen, en zuurstofgebrek voorkomen worden. Daarnaast is de extractieefficiëntie hoger. In experimenten is gezien dat zelfs na weken nog nematoden uit de wortels kruipen, dat komt waarschijnlijk door het uitkomen van eieren en door reproductie. De methode kost veel water en het is moeilijk om de mistkamer vrij te houden van uitbundige schimmel- en algengroei. De ruimte waarin de opstelling zich bevindt kan een hoge luchtvochtigheid krijgen, zodat computers, microscopen etc. beter in een andere ruimte geplaatst kunnen worden.

**Literatuur:** Oostenbrink 1960

**Verder lezen:** bijvoorbeeld Viglierchio & Schmitt (1983): zij preferen i.p.v. een constante, een met tussenpozen onderbroken watertoevoer: de sproeier staat dan per 10 minuten 1.5 minuut aan. Zo zouden minder nematoden verloren gaan door de verminderde turbulentie. Ook geven ze cijfers over de bezinkingssnelheden van verschillende nematodensoorten en de extractieopbrengsten met verschillende soorten (filtreer)papier.

## 2.2.4. Mixer-nematodenfiltermethode

### *Toepassingsgebied*

De mixer-nematodenfiltermethode wordt gebruikt voor de extractie van beweeglijke nematoden uit plantenmateriaal. De maximale monstergrootte is afhankelijk van het materiaal vaak niet meer dan enkele tientallen grammen.

### *Principe*

De methode maakt gebruik van de beweeglijkheid van nematoden. Het monster wordt in water kapotgeslagen in een bekermixer (blender) en vervolgens op een nematodenfilter gespoeld dat in een schaal met een laagje water wordt gezet. De nematoden bewegen uit het materiaal door de filters in het water en kunnen na een extractieperiode als een heldere suspensie worden afgegoten.

### *Benodigdheden*

schaar of mes  
bekermixer  
overschenkschaal met kruisstuk  
extractiezeefje met steundraden ( $\emptyset$  16 cm)  
klemring voor het vastzetten van de nematodenfilters  
nematodenfilters  
horlogeglas ( $\emptyset$  6 cm)  
extractieschaaltje  
trillingsvrije plaats om schaal weg te zetten (bij  
constante, niet extreme temperatuur; ca 20°C)  
schoon water

### *Werkwijze*

- 1 Spoel het plantenmateriaal voorzichtig schoon van grond en ander aanhangend vuil en knip het in stukjes van  $\pm$  1 cm. Doe een submonster van afgemeten hoeveelheid (bijv. 10 g) in een bekermixer, voeg water toe tot het monster juist onder staat en mix gedurende 5 sec ( $\pm$  10.000 rpm).

De optimale 'mix'tijd is afhankelijk van het materiaal (harde, zachte wortels) en moet experimenteel worden vastgesteld. De tijd moet voldoende zijn om de nematoden uit het materiaal vrij te maken (of het uitkruipen aanzienlijk te vergemakkelijken) maar niet zo lang zijn dat de nematoden beschadigen of doodgaan.

- 2 Bevestig een nematodenfilter met een klemring in een extractiezeefje. Bevochtig ze met de sproeier om luchtbellen (en evt. stof) tussen de filters te verwijderen. Zet het zeefje in een geheel met water gevulde overschenkschaal met kruisstuk en leg er een horlogeglas op (Voor uitleg bij punt 2-5, zie 2.3.1).
- 3 Giet de suspensie uit de beker voorzichtig via een horlogeglas op het filter. Verwijder het horlogeglas en, als het water is doorgelopen, ook de klemring. Voeg het monsterlabel bij het filter.

- 4 Zet een extractieschaaltje met daarin voldoende water om het filter en monster vochtig te houden ( $\pm$  100 ml) op een trillingsvrije plaats. Zet het zeefje er voorzichtig in.
- 5 Na een extractieperiode van 16-48 uur (N.B.: monsters van verschillende extractieduur kunnen niet vergeleken worden, zie 2.3.1) kan het zeefje uit het schaal-tje getild worden en de suspensie worden overgegoten in een 100 ml bekeerglas voor analyse.

#### **Voor- en nadelen**

Vergeleken met 'incubatiemethoden' zoals de Baermann trechter is de methode over het algemeen sneller (door het kapotslaan van het monster kruipen de nematoden er gemakkelijker uit) en efficiënter (door het grote oppervlak van het extractieschaaltje). Optimale 'mix'tijden moeten per monstersamenstelling en nematodesoort experimenteel worden vastgesteld.

Nadeel bij zacht plantenmateriaal kan zijn dat de kapotte plantendelen snel tot ontbinding overgaan waardoor voor nematoden toxische stoffen vrijkomen. Meerdere keren aftappen gedurende de extractieperiode kan voorkomen dat nematoden dood gaan. Hoewel dit bewerkelijker is, komt het de vitaliteit van de populaties ten goede. Zeker als de nematoden gebruikt moeten worden voor infectieproeven, verdient dit de aandacht.

**Literatuur:** Stemerding 1964

**Verder lezen:** bijvoorbeeld Schouten & Arp 1991: passen de mixer-nematodenfiltermethode toe voor extractie van *strooisel*.

## 2.2.5. Mixer-centrifuge-drijfmethode

### *Toepassingsgebied*

De mixer-centrifuge-drijfmethode wordt gebruikt voor de extractie van zowel beweeglijke als onbeweeglijke nematoden (stadia, inclusief eieren) uit plantenmateriaal. De maximale monstergrootte is afhankelijk van het materiaal vaak niet meer dan enkele tientallen grammen.

### *Principe*

De methode maakt gebruik van het verschil in soortelijk gewicht (s.g.) tussen nematoden en andere fracties van een monster. Door het monster te brengen in een extractievloeistof met een s.g. hoger dan dat van nematoden gaan deze drijven. Deeltjes met een hogere s.g. dan de vloeistof gaan zinken. Dit scheidingsproces wordt door centrifugeren versneld. Eerst wordt het monster in water kapotgeslagen in een beker-mixer (blender). Deze suspensie wordt gecentrifugeerd waardoor alle deeltjes met s.g. groter dan 1 (incl. nematoden) neerslaan en het water met de lichtere deeltjes (supernatant) kan worden afgegoten. Vervolgens wordt de neerslag (pellet) gesuspendeerd in de extractievloeistof. Na centrifugeren drijven de nematoden in het supernatant terwijl de meeste andere deeltjes in de pellet neergeslagen zijn. De nematoden worden verzameld door het supernatant over een fijne zeef te gieten en kunnen meteen bekeken worden.

*Voor details over de keuze en dichtheid van de extractievloeistof en de centrifugatiesnelheid (berekening) zie 2.3.5.*

### *Benodigdheden*

- bekermixer
- centrifuge
- vibromixer
- balans
- densitometer
- schaar of mes
- 1200  $\mu\text{m}$  zeef
- plastic opvangbak 4 liter inhoud
- tenminste 2 centrifugebuizen
- 2 pipetjes voor tarreren (voor water en  $\text{MgSO}_4$ )
- 5  $\mu\text{m}$  zeefje
- bekerglas
- sputfles met water
- $\text{MgSO}_4$  oplossing, s.g. 1.18



### **Werkwijze**

- 1 Spoel het plantenmateriaal voorzichtig schoon en knip het in stukjes van  $\pm 0.5$  cm. Doe een submonster van afgemeten hoeveelheid (bijv. 10 g) in een bepermixer, voeg water toe tot het monster juist onderstaat en mix gedurende 5 sec ( $\pm 10.000$  rpm).
  
- 2 Breng de suspensie via een  $1200 \mu\text{m}$  zeef in een opvangbak. Spoel de resten die op de zeef blijven liggen goed met water na; daarna kunnen ze worden weggeoid. Verdeel de suspensie uit de opvangbak over twee (of een ander even aantal) centrifugebuizen.  

Toevoeging van kaolien om de pellet te versterken kan nodig zijn; zie discussie in 2.3.5 (punt 3).
  
- 3 Tarreer de centrifugebuizen met water en centrifugeer gedurende 4 minuten bij 1800 g.
  
- 4 Giet het supernatant voorzichtig af, eventueel over een  $10 \mu\text{m}$  zeefje (zie punt 7) om niet-neergeslagen nematoden op te vangen. Indien ook eieren opgevangen moeten worden, is een  $5 \mu\text{m}$  zeefje nodig.
  
- 5 Doe  $\text{MgSO}_4$  oplossing (1.18) bij de pellet en meng goed m.b.v. een vibromixer (20 sec). Spoel de kop van de mixer boven de centrifugebuis met  $\text{MgSO}_4$  na.
  
- 6 Tarreer de centrifugebuizen op de balans met  $\text{MgSO}_4$  en centrifugeer gedurende 3 minuten bij 1800 g.
  
- 7 Giet het supernatant af over het  $10 \mu\text{m}$  zeefje. Spoel de zeef af met behulp van een spuitfles met water en verzamel de nematoden in een bekerglas. N.B.: De  $\text{MgSO}_4$  die door het zeefje gaat kan opgevangen en hergebruikt worden. Voor opvangen van eieren dient weer een  $5 \mu\text{m}$  zeefje gebruikt te worden.

### **Voor- en nadelen**

Ook onbeweeglijke nematoden kunnen met deze methode geïsoleerd worden. Binnen een half uur is het monster geëxtraheerd én is een relatief schone nematodensuspensie beschikbaar. De extractievloeistof kan echter een nadelig effect op de nematoden hebben, zowel op de vorm (geeft identificatieproblemen) als op de vitaliteit (een probleem als met het materiaal geïnoculeerd moet worden). De benodigde apparatuur is duur (bv. centrifuge) maar hoort vaak wel tot de standaarduitrusting van een lab.

**Literatuur:** naar Coolen 1979

**Verder lezen:** bijvoorbeeld,

- Coolen & D'Herde 1972: geven verschillende routines voor gezwollen stadia en voor eieren en beweeglijke stadia, daarnaast ook analyses van effecten van verscheidene mixerstanden en 'mix'tijden op de extractie, extractieëfficiënties voor verschillende nematodesoorten etc.;
- Hussey & Barker 1973: schudden tomatenwortels in bleekwater (NaOCL 0.53% oplossing) om eieren uit de gelatineuze eiermassa's van *Meloidogyne* te isoleren. McSorley et al (1984) vonden met die methode meer eieren dan met de Coolen & D'Herde methode;
- Greco & D'Abbaddo 1990: extraheren *Tylenchulus semipenetrans* uit citruswortels met de mixer-centrifuge-drijfmethode en geven hierbij een vergelijking van opbrengsten met suiker, MgSO<sub>4</sub> en colloïdale silica.

## 2.3. EXTRACTIE UIT GROND EN ANDERE SUBSTRATEN

### 2.3.1. Nematodenfiltermethode

#### *Toepassingsgebied*

De nematodenfiltermethode wordt gebruikt voor de extractie van beweeglijke nematoden uit grond en sediment (max. 50 g) en substraten zoals steenwol of mos (N.B.: 1.4.3). Een onderdeel van de methode (opschoning van de suspensie m.b.v. nematodenfilters) wordt bovendien bij veel andere methoden toegepast als laatste stap in het extractieproces.

#### *Principe*

De methode maakt gebruik van het verschil in bezinkingssnelheid tussen nematoden en gronddeeltjes en van de beweeglijkheid van nematoden.

Het monster wordt in een beker met water geroerd zodat de nematoden loskomen van de gronddeeltjes. Na bezinking van de zware deeltjes wordt de suspensie met nematoden afgegoten (gedecanteerd). De suspensie wordt opgeschoond door deze op een nematodenfilter te spoelen. Water en fijne deeltjes worden zo verwijderd zonder noemenswaardig verlies van nematoden. Het filter wordt in een schaalpje met een laagje water gezet. Nematoden bewegen door de filters in het water en kunnen na een extractieperiode als heldere suspensie worden afgegoten. De methode is een afgeleide van de Baermann techniek. Door het relatief grote oppervlak van het extractieschaaltje heeft de methode echter niet de nadelen (o.a. ophoping van stofwisselingsprodukten en zuurstofgebrek in de nauwe trechtersteel en een laag rendement) van die techniek.

#### *Benodigdheden*

beker 2 liter inhoud (hoog model)  
roerhoutje  
plastic opvangbak 4 liter inhoud  
overschenkschaal met kruisstuk  
extractiezeefje met steundraden ( $\emptyset$  16 cm)  
klemring voor het vastzetten van de nematodenfilters  
2 nematodenfilters  
horlogeglas ( $\emptyset$  6 cm)  
extractieschaaltje  
evt. afdek materiaal voor extractieschaaltje  
trillingsvrije plaats om extractieschaaltje weg te zetten  
(bij constante, niet extreme temperatuur; ca 20°C)  
schoon water

#### *Werkwijze*

##### *Decanteren:*

- 1 Neem een (sub)monster (max. 50 g) volgens de richtlijnen in §1.4. Doe het in een beker en voeg  $\pm$  1 liter water toe.
- 2 Roer water en grond tot een homogene suspensie. Laat deze 15 sec bezinken en giet de suspensie af in een

opvangbak.

- 3 Roer het in de beker achtergebleven sediment opnieuw met water. Giet, na bezinken (15 sec), de suspensie af in de opvangbak bij de suspensie verkregen onder 2; herhaal deze procedure voor een derde keer. Daarna kan het sediment in de beker worden weggegooid. Laat de suspensie in de opvangbak minimaal 5 minuten bezinken.

Met een goed bezonken suspensie verloopt de opschoning m.b.v. nematodenfilters beter. Bij het overschenken loopt het filter goed door omdat de eerste liters suspensie die erover gaan vrijwel schoon water zijn. Als dan het bezinksel overgeschonken wordt met weinig water blijft het vuil op het filter liggen en is de eindsuspensie schoon.

#### *Opschoning suspensie m.b.v. nematodenfilters:*

- 4 Bevestig 2 nematodenfilters met een klemring in het extractiezeefje. Bevochtig ze met de sproeier om lucht-bellen (en evt. stof) tussen de filters te verwijderen. Zet het zeefje in een geheel met water gevulde overschenkschaal met kruisstuk en leg er een horlogeglas op.

Door het zeefje in het water te zetten ontstaat bij het overschenken van de suspensie een tegendruk die voorkomt dat de nematoden dóór het filter gesleurd worden. Tevens wordt het debris beter over het filter verspreid. Het horlogeglas voorkomt dat het filter wordt beschadigd door het overgieten.

- 5 Giet de bezonken suspensie uit de opvangbak voorzichtig via het horlogeglas op het filter. Schud de laatste 300-500 ml goed en schenk deze snel over. Verwijder het horlogeglas en, als het water is doorgelopen, ook de klemring. Voeg het monsterlabel bij het filter.

Laat het zeefje niet langer dan nodig op de met water gevulde overschenkschaal staan. Zeer beweeglijke nematoden zoals Ditylenchus en sommige rhabditiden kruipen snel door een filter en zijn dan voor de analyse verloren.

- 6 Zet een extractieschaaltje met daarin net voldoende water om het filter vochtig te houden ( $\pm$  80 ml) op een trillingsvrije plaats. Zet het uitgelekte zeefje er voorzichtig in. Verplaats het schaalje nu niet meer voordat het zeefje eruit is (punt 7) omdat er anders vuil van het zeefje in de suspensie kan komen. Dek het geheel eventueel af om verdamping en stof te voorkomen.

- 7 Na een extractieperiode van 16-48\* uur kan het zeefje verwijderd worden en de nematodensuspensie uit het schaalje worden overgegoten in een 100 ml bekersglas voor analyse.

\* Monsters van verschillende extractieduur kunnen slecht vergeleken worden! Door verschillen in activiteit (bv. Ditylenchus beweegt veel eerder door het filter dan trage soorten zoals Criconematidae), maar ook door het uitkomen van eieren en door vermeerdering van nematoden met een korte generatieduur leidt een langere extractietijd tot een hoger aantal nematoden in het extractieschaaltje. De aantalstoename door uitkomende eieren kan bij een onderzoek naar planteparasieten nog interessant zijn omdat eieren immers potentiële planteparasieten zijn (bv. eiproppen van Meloidogyne). Aantalstoename door snelle voortplanting (bv. bij sommige rhabditiden) leidt er echter toe dat de gevonden aantallen én soortverhoudingen niet meer de originele situatie weergeven.

**N.B.:** Zoals hierboven beschreven is de methode alleen geschikt voor zandgrond. Bij andere gronden zullen met het decanteren veel niet-bezonken fijne en lichte deeltjes meekomen die de eindsuspensie vuil maken. Oplossingen hiervoor zijn:

a. (volgens Oostenbrink 1960) Giet de suspensie zoals gebruikelijk op een dubbel filter, maar nu in een extractiezeefje zónder steundraden. Zet dit in een iets groter zeefje mét steundraden en een enkel filter en plaats het geheel in een extractieschaaltje. Zo staat de vuile bodem van het eerste zeefje niet direct in het water. De eindsuspensie is schoon, maar zal waarschijnlijk minder nematoden bevatten omdat ze door 3 i.p.v. 2 filters moeten kruipen.

b. Zeef de gedecanteerde suspensie eerst over vier 45  $\mu\text{m}$  zeven (of vier keer over één 45  $\mu\text{m}$  zeef, etc.). De fijne deeltjes zijn dan verdwenen en het van de zeven gespoelde debris kan dan zoals boven beschreven op een dubbel filter in een extractiezeefje met steundraden gespoeld worden.

#### ***Voor- en nadelen***

Met weinig water en simpel gereedschap kunnen nematoden geïsoleerd worden. Het resultaat is echter persoonsafhankelijk en de monstergrootte is beperkt tot 50 g (bij grotere monsters wordt de laag debris op het filter te dik waardoor de nematoden minder snel in het water kruipen). Tenzij het zandmonsters betreft is de eindsuspensie vaak nog vuil.

***Literatuur:*** Oostenbrink 1960

***Verder lezen:*** bijvoorbeeld Stolk 1989: over de relatie extractieduur-aantal nematoden dat door het filter kruipt.



### 2.3.2. Decanteren en zeven: Cobb's methode

#### *Toepassingsgebied*

De methode van Cobb wordt gebruikt voor de extractie van beweeglijke nematoden uit grond en sediment (max. 300 g).

#### *Principe*

De methode maakt gebruik van verschillen in grootte, vorm en bezinkingssnelheid tussen nematoden en gronddeeltjes en van de beweeglijkheid van nematoden.

Eerst wordt het monster in een beker met water geroerd zodat nematoden loskomen van de gronddeeltjes. Na bezinking van zware deeltjes wordt de suspensie met nematoden afgegoten (gedecanteerd). Vervolgens wordt de afgegoten suspensie gezeefd, waarbij nematoden op de zeven worden opgevangen en fijne gronddeeltjes door de zeven spoelen. Dit gebeurt stapsgewijs over een serie zeven van aflopende maaswijdte. Zo worden nematoden van verschillende grootte apart verzameld. Belangrijker is dat door deze manier van zeven de hoeveelheid gronddeeltjes in de suspensie steeds kleiner en fijner wordt, zodat als tenslotte de 45  $\mu\text{m}$  zeef gebruikt wordt, de poriën minder snel verstopt raken. Zo kunnen grotere monsters geëxtraheerd worden (tot 300 g). Tenslotte wordt het van de zeven gespoelde debris opgeschoond m.b.v. nematodenfilters. Nematoden bewegen door de filters in het water en kunnen na een extractieperiode als heldere suspensie worden afgegoten.

#### *Benodigdheden*

beker 2 liter inhoud (hoog model)  
roerhoutje  
3 plastic opvangbakken 4 liter inhoud  
set 'Cobb's zeven' ( $\emptyset$  15 of 20 cm):  
500  $\mu\text{m}$ , 350-375  $\mu\text{m}$ , 175  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$ , 45  $\mu\text{m}$  (er zijn ook andere sets in omloop)  
100 ml bekerglas  
overschenkschaal met kruisstuk  
extractiezeefje met steundraden ( $\emptyset$  16 cm)  
klemring voor het vastzetten van de nematodenfilters  
2 nematodenfilters  
horlogeglas ( $\emptyset$  6 cm)  
extractieschaaltje  
evt. afdek materiaal voor extractieschaaltje  
trillingsvrije plaats om extractieschaaltje weg te zetten (bij constante, niet extreme temperatuur; ca 20°C)  
100 ml bekerglas  
schoon water

#### *Werkwijze*

- 1 Neem een (sub)monster volgens de richtlijnen in §1.4. Doe het in een beker en voeg  $\pm$  1 liter water toe.
- 2 Roer water en grond tot een homogene suspensie. Laat deze 15 sec bezinken en giet de suspensie af in een opvangbak.

- 3 Roer het in de beker achtergebleven sediment opnieuw met water. Giet, na bezinken (15 sec), de suspensie af in de opvangbak bij de suspensie verkregen onder 2; herhaal deze procedure voor een derde keer. Daarna kan het sediment in de beker worden weggegooid.
- 4 Giet de suspensie uit de opvangbak door een 500  $\mu\text{m}$  zeef in een andere opvangbak. Schud de zeef in de suspensie om de nematoden erdoor te krijgen. Het debris dat dan nog op de 500  $\mu\text{m}$  zeef blijft liggen kan worden weggegooid.
- 5 Giet de suspensie door een 350  $\mu\text{m}$  zeef in een opvangbak. Spoel het debris van de 350  $\mu\text{m}$  zeef in een bekerglas.

De suspensie in het bekerglas kan meteen worden nagekeken op de aanwezigheid van grote nematoden zoals Longidorus en Xiphinema. Indien hieraan geen behoefte bestaat kan de suspensie toegevoegd worden aan de totaalsuspensie (verzamelbak, zie 6).

- 6 Giet de suspensie door een 175  $\mu\text{m}$  zeef in een opvangbak. Spoel het debris van de 175  $\mu\text{m}$  zeef in de derde opvangbak, de 'verzamelbak' waar hierna ook het debris van de 100  $\mu\text{m}$  en 45  $\mu\text{m}$  zeven in gespoeld wordt.

De spoelsels van de verschillende zeven kunnen natuurlijk ook apart verzameld worden als het doel is om de nematoden per grootte-klasse te analyseren. In dit voorschrift wordt ervan uitgegaan dat dat niet het geval is en gaat alles bij elkaar.

- 7 Giet de suspensie door een 100  $\mu\text{m}$  zeef in een opvangbak. Spoel het debris van de 100  $\mu\text{m}$  zeef in de 'verzamelbak'.
- 8 Giet de suspensie door een 45  $\mu\text{m}$  zeef in een opvangbak. Spoel het debris van de 45  $\mu\text{m}$  zeef in de 'verzamelbak'.
- 9 Herhaal punt 8 afhankelijk van de grondsoort nog 2 (zand) tot 4 keer (klei) om alle kleine nematoden te vangen. Uiteindelijk kan de suspensie die door de laatste zeef gaat weggegooid worden. De suspensie in de 'verzamelbak' niet weggooien!
- 10 Bevestig 2 nematodenfilters met de klemring in het extractiezeefje. Bevochtig ze met de sproeier om luchtbellen (en evt. stof) tussen de filters te verwijderen. Zet het zeefje in een geheel met water gevulde overschenkschaal met kruisstuk en leg er een horlogeglas op (voor uitleg bij punt 10-13, zie 2.3.1)
- 11 Giet de bezonken suspensie uit de 'verzamelbak' voorzichtig via het horlogeglas op het filter. Schud de laatste 300-500 ml goed en schenk deze snel over. Verwijder het horlogeglas en, als het water is doorgelopen, ook de klemring. Voeg het monsterlabel bij het filter.
- 12 Zet een extractieschaaltje met daarin net voldoende water om het filter vochtig te houden ( $\pm$  80 ml) op een trillingsvrije plaats. Zet het uitgelekte zeefje er voorzichtig in. Verplaats het schaalje nu niet meer voordat



het zeefje eruit is (punt 13) omdat er anders vuil van het zeefje in de suspensie kan komen. Dek het geheel eventueel af om verdamping en stof te voorkomen.

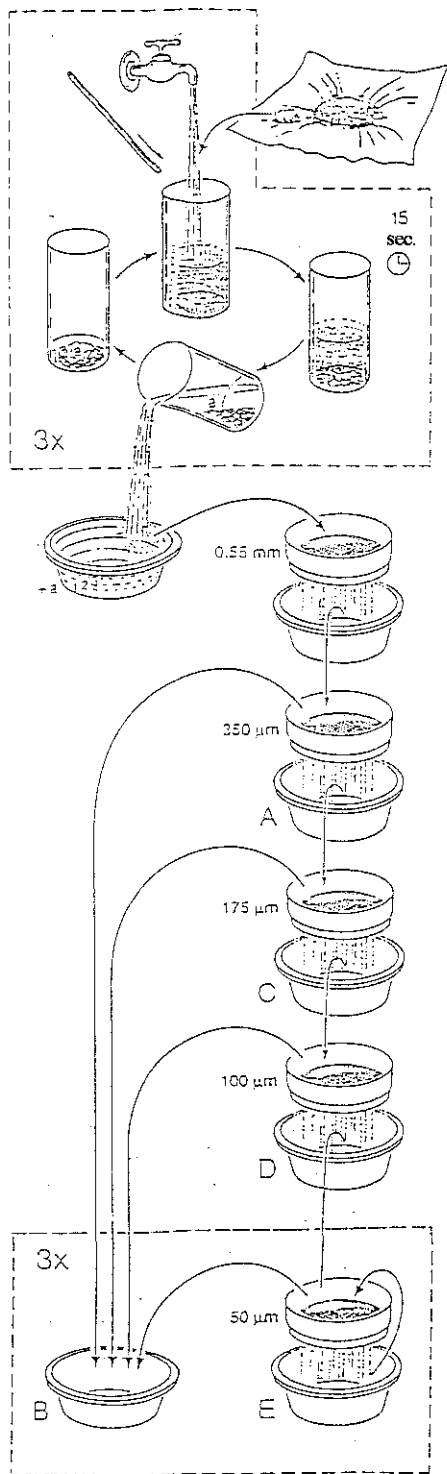
- 13 Na een extractieperiode van 16-48 uur (N.B.: monsters van verschillende extractieduur kunnen slecht vergeleken worden, zie 2.3.1) kan het zeefje verwijderd worden en de nematodensuspensie uit het schaalpje worden overgegoten in een 100 ml bekerglas voor analyse.

***Voor- en nadelen***

Met een klein setje zeven (gemakkelijk in een koffer mee te nemen) en weinig water wordt een hoge extractieëfficiëntie bereikt. De zeefjes zijn wel vrij duur en er is wat ervaring voor nodig om de methode betrouwbaar uit te voeren. Door de vele handelingen kost de methode relatief veel tijd. De methode vereist geen wateronderdruk en kan dus ook uitgevoerd worden buiten een laboratorium spoelbak.

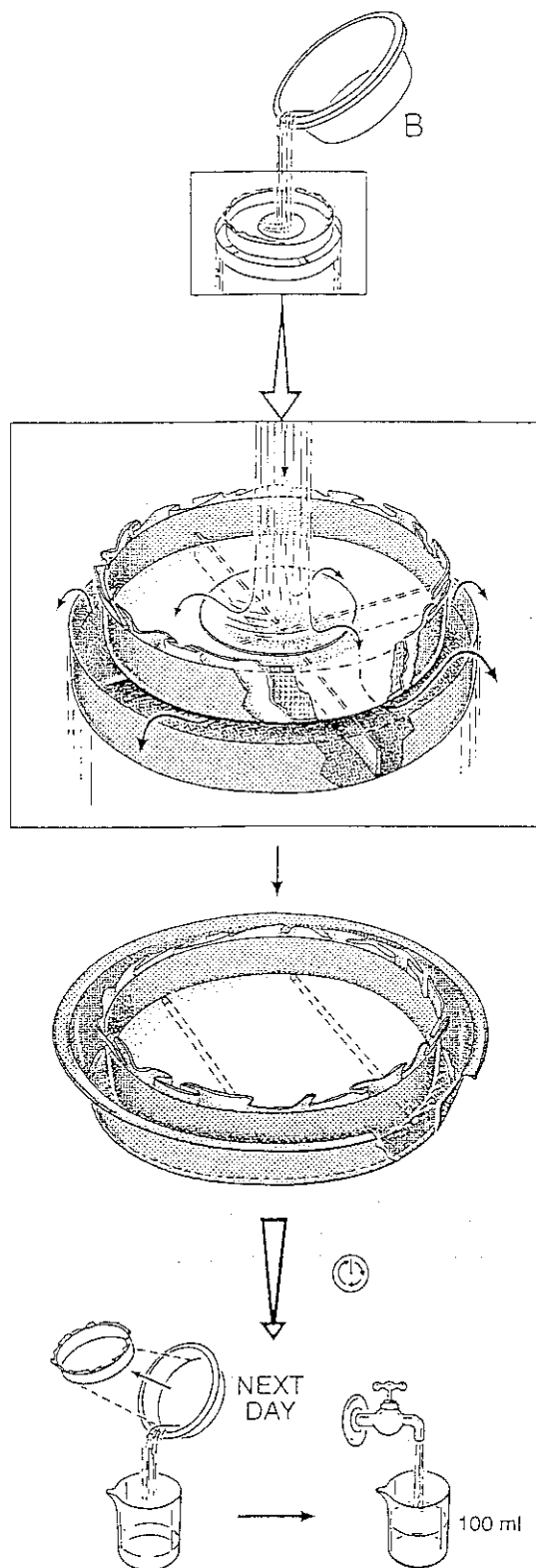
***Literatuur:*** Cobb 1918

***Verder lezen:*** bijvoorbeeld Southey 1986 (p.12-14)



**Figuur 9**  
**Cobb's methode in schema**

**Stap 10, 11, 12 en 13 extractie  
van actieve nematoden met de Cobb's methode**



### 2.3.3. Erlenmeyer- of (melk)flessenmethode

#### *Toepassingsgebied*

De Erlenmeyer of (melk)flessen methode wordt gebruikt voor de extractie van beweeglijke nematoden uit grond (max. 100 g).

#### *Principe*

De methode maakt gebruik van het verschil in grootte, vorm en bezinkingssnelheid tussen nematoden en gronddeeltjes en van de beweeglijkheid van nematoden.

Een fles met grondsuspensie wordt omgekeerd op een geheel met water gevulde fles gezet. Gronddeeltjes zakken uit de eerste in de tweede fles, terwijl ter vervanging van deze deeltjes water naar boven stroomt wat fijne gronddeeltjes en nematoden in de eerste minuten verhindert te zinken.

De verkregen suspensies worden gezeefd en het van de zeven gespoelde debris wordt opgeschoond m.b.v. nematodenfilters.

Nematoden bewegen door de filters in het water en kunnen na een extractieperiode als heldere suspensie worden afgegoten.

#### *Benodigheden*

statief met ring en klem

3 melkflessen, genummerd A, B en C

Oorspronkelijk werd de methode met erlenmeyers uitgevoerd maar deze zijn duur en erg breekbaar. Naast melkflessen kunnen alle soorten flessen met een grote opening en wijd (trechtersvormig) 'nekdeel' als alternatief gebruikt worden.

keukenzeef (maaswijdte 2 mm)

trechter met kurksluiting

'opzetstuk' met kurksluiting

4 zeven  $\emptyset$  30 cm, maaswijdte 45  $\mu$ m

plastic opvangbak 4 liter inhoud

overschenkschaal met kruisstuk

extractiezeefje met steundraden ( $\emptyset$  16 cm)

klemring voor het vastzetten van de nematodenfilters

horlogeglas ( $\emptyset$  6 cm)

2 nematodenfilters

extractieschaaltje

evt. afdek materiaal voor extractieschaaltje

trillingsvrije plaats om extractieschaaltje weg te zetten  
(bij constante, niet extreme temperatuur; ca 20°C)

bekerglas 100 ml

schoon water

#### *Werkwijze*

- 1 Neem een (sub)monster volgens de richtlijnen in §4.1.
- 2 Hang de met de kurk gesloten trechter boven fles A in de ring aan het statief. Vul de trechter met water, hang er een keukenzeef in en doe daarin het monster. Beweeg de zeef heen en weer zodat het monster door de zeef in de trechter spoelt. (Fig. 10)
- 3 Trek de kurk los en laat de suspensie uit de trechter in fles A stromen. Spoel trechter en zeef met water na tot fles A vol is. Bevestig een gesloten opzetstuk op fles A.

- 4 Vul fles B tot de rand met water en zet deze op het statief. Schud fles A goed en hang deze omgekeerd in de ring zodat het gesloten uiteinde van het opzetstuk in fles B hangt. Open snel het opzetstuk en laat het geheel 10 minuten staan. Gedurende die tijd zullen zware gronddeeltjes en grote nematoden bezinken uit fles A, in B. (Fig. 11A en 11B)
- 5 Sluit na 10 minuten het opzetstuk en neem fles A van fles B. Herhaal procedure (4) met fles B, op een geheel met water gevulde fles C, gedurende 3 minuten. Zware gronddeeltjes bezinken uit fles B in fles C, terwijl nematoden in fles B blijven zweven. De inhoud van fles C kan nadien worden weggegooid. (Fig.12)
- 6 Bevochtig de set 45  $\mu\text{m}$  zeven en giet hierover de inhoud van flessen A en B. Spoel het debris van de zeven meteen in een opvangbak. Houd hierbij de zeven schuin naar voren, spoel beide kanten en gebruik weinig water. Laat de suspensie in de opvangbak minimaal 5 minuten bezinken.
- 7 Bevestig 2 nematodenfilters met een klemring in een extractiezeefje. Bevochtig ze met de sproeier om lucht-bellen (en evt. stof) tussen de filters te verwijderen. Zet het zeefje in een geheel met water gevulde oversche-nkschaal met kruisstuk en leg er een horlogeglas op (voor uitleg bij punt 7-10, zie 2.3.1).
- 8 Giet de bezonken suspensie uit de opvangbak voorzichtig via het horlogeglas op het filter. Schud de laatste 300-500 ml goed en schenk deze snel over. Verwijder het hor-logeglas en, als het water is doorgelopen, de klemring.
- 9 Zet een extractieschaaltje met daarin net voldoende water om het filter vochtig te houden ( $\pm 80$  ml) op een tril-lingsvrije plaats. Zet het uitgelekte zeefje er voor-zichtig in. Verplaats het schaal-tje nu niet meer voordat het zeefje eruit is (punt 10) omdat er anders vuil van het zeefje in de suspensie kan komen. Dek het geheel eventueel af verdamping en stof te voorkomen.
- 10 Na een extractieperiode van 16-48 uur (N.B.: monsters van verschillende extractieduur kunnen slecht vergeleken worden, zie 2.3.1) kan het zeefje verwijderd worden en de nematodensuspensie uit het schaal-tje worden overgegoten in een 100 ml bekerglas voor analyse.

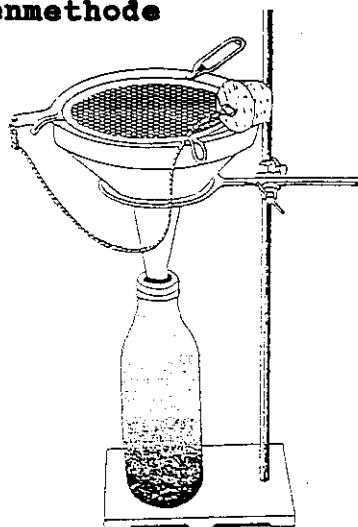
***Voor- en nadelen***

Met simpel materiaal en weinig water wordt een relatief hoge extractieëfficiëntie bereikt. De methode is wel bewerkelijk en als met één set flessen gewerkt wordt zijn de wachttijden lang.

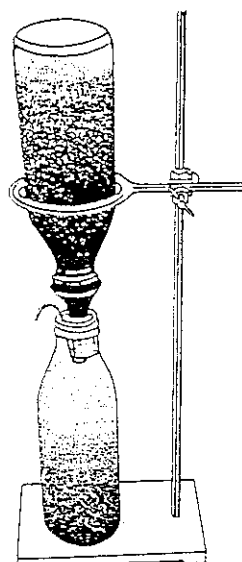
De methode vereist geen wateronderdruk en kan dus ook uitgevoerd worden buiten een laboratorium speelbak.

***Literatuur:*** Seinhorst 1955, 1962

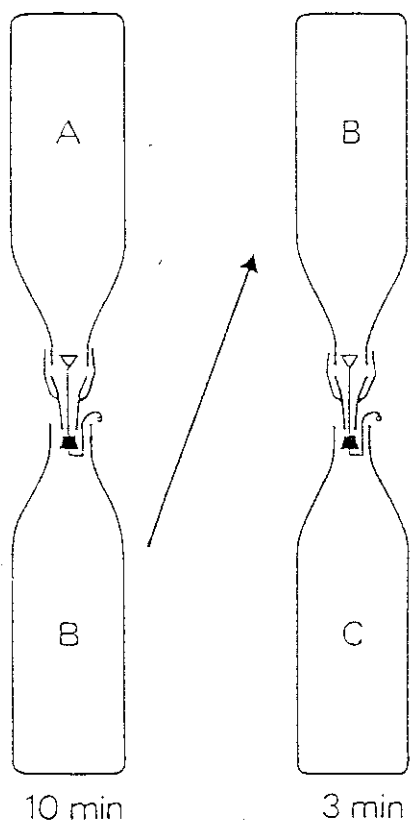
**Flessenmethode**



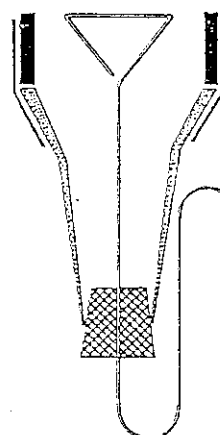
**Figuur 10**  
**Flessenmethode**  
 Voordat de fles gevuld wordt met suspensie, grond zeven door een huishoudzeef







**Figuur 11A**  
**Flessenmethode**  
 opstelling voor sedimentatie

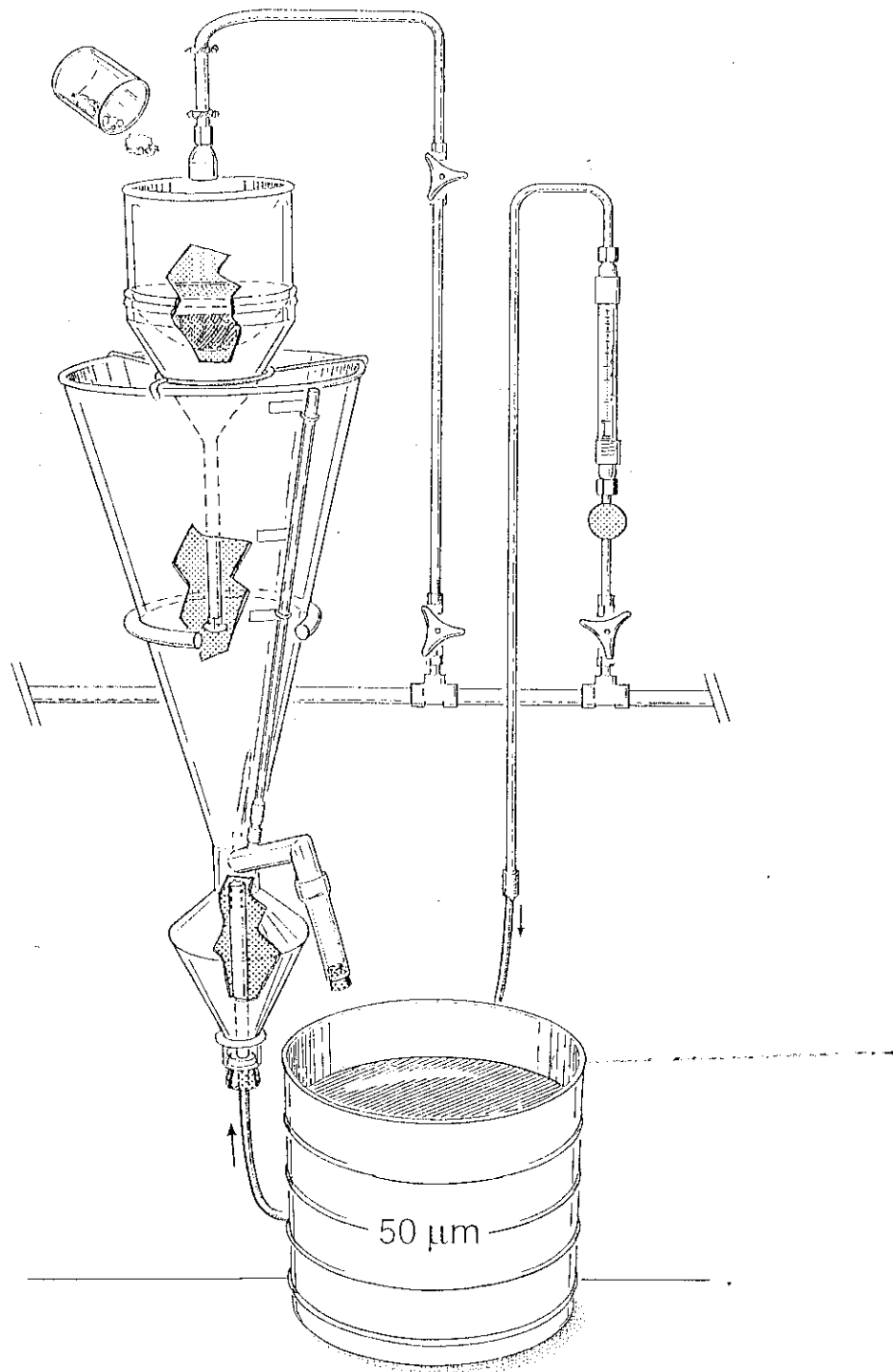


**Figuur 12**  
 Volgorde van handelingen bij de Flessenmethode



-  - Nek van de fles
-  - Trechter op maat gesneden
-  - Binnenband van een fiets
-  - Kurk

**Figuur 11B**  
 Trechterdeel voor de Flessenmethode



**Oostenbrink opstelling  
voor extractie van nematoden uit grond**



### 2.3.4. Oostenbrink trechter

#### *Toepassingsgebied*

De Oostenbrink trechter (elutriator) wordt gebruikt voor de extractie van nematoden uit grond, rivierslib, mest, strooisel en andere substraten die in suspensie zijn te brengen en waarin nematoden kunnen voorkomen (N.B.: 1.4.3). Afhankelijk van het type monster is de maximale monstergrootte 1 kg.

#### *Principe*

De methode maakt gebruik van het verschil in grootte, vorm en bezinkingssnelheid tussen nematoden en gronddeeltjes en van de beweeglijkheid van nematoden indien de suspensie met nematodenfilters wordt opgeschoond.

In de Oostenbrink trechter zorgt een opwaartse water-stroom dat nematoden en fijne deeltjes blijven zweven in de extractiekolom terwijl zware deeltjes bezinken in het onderste deel van het apparaat. De suspensie in de extractiekolom wordt afgetapt via de zijuitlaat en gezeefd om de fijne deeltjes te verwijderen. Het van de zeven gespoelde debris kan verder worden opgeschoond m.b.v. nematodenfilters. Nematoden bewegen door de filters in het water en kunnen na een extractieperiode als heldere suspensie worden afgegoten.

#### 2.3.4.1. Standaardgebruik

##### *Benodigdheden*

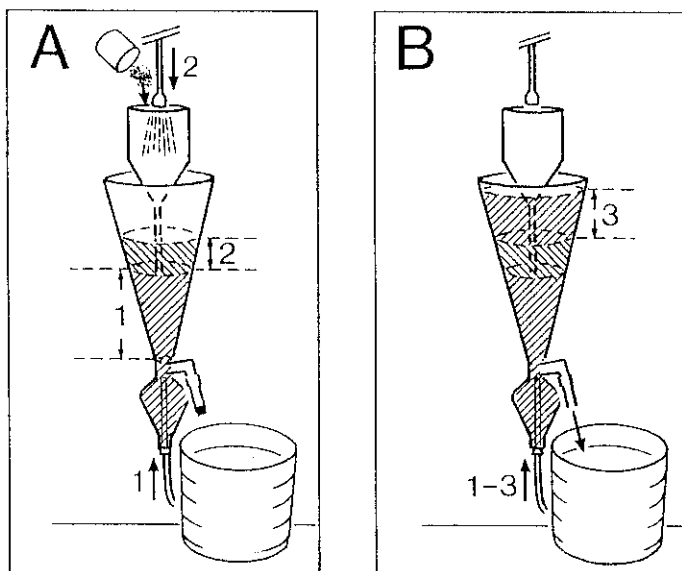
Oostenbrink trechter compleet (Catalogue, no 100)  
4 zeven  $\emptyset$  30 cm, maaswijdte 45  $\mu\text{m}$   
plastic opvangbak 4 liter inhoud  
overschenkschaal met kruisstuk  
extractiezeefje met steundraden ( $\emptyset$  16 cm)  
klemring voor het vastzetten van de nematodenfilters  
horlogeglas ( $\emptyset$  6 cm)  
2 nematodenfilters  
extractieschaaltje  
evt. afdek materiaal voor extractieschaaltje  
trillingsvrije plaats om extractieschaaltje weg te zetten  
(bij constante, niet extreme temperatuur; ca 20°C)  
bekerglas 100 ml  
schoon water

##### *Werkwijze*

- 1 Neem een (sub)monster volgens de richtlijnen in §1.4.
- 2 Spoel de trechter met water schoon. Sluit hierna de zijuitlaat met de rubber stop en de onderkant met de plug. Vul de trechter met water tot niveau 1 (waar de waterspiegel de onderkant van de kleine trechter raakt) en zet de onderstroom op 1000 ml/min.

Het kan nodig zijn om de opstroomsnelheid bij het inspoelen van grote (> 200 g) monsters te verhogen om te voorkomen dat de nematoden door de zware deeltjes omlaag gesleurd worden. Let wel dat een hogere opstroomsnelheid niet alleen meer nematoden maar ook meer vuil in de suspensie houdt.

Oostenbrink opstelling voor extractie van nematoden uit grond



- 3 Spoel het monster door de topzeef in de trechter m.b.v. de sproeier boven de topzeef, tot het waterpeil in de trechter niveau 2 (2/3 van de kolom) bereikt (het monster moet helemaal ingespoeld zijn!). Sluit dan de sproeier. Langzaam inspoelen van grotere monsters verhoogt de efficiëntie.
- Voor *Trichodorus teres*, of andere nematoden die zeer gevoelig zijn voor mechanische schade (/wrijving), wordt de topzeef niet gebruikt. Het monster wordt dan als suspensie in de bovenlaag van het water in de trechter gegoten, via een vlakke hand om te voorkomen dat de nematoden door de kracht van het gieten naar beneden worden gesleurd.
- 4 Breng enkele tellen na het sluiten van de sproeier de onderstroom terug tot 600 ml/min. De trechter wordt nu door deze onderstroom verder gevuld.
- 5 Bevochtig de vier 45  $\mu$ m zeven om dichtslaan van de poriën te voorkomen en plaats de set onder de zijuitlaat.
- Voor kleine nematoden, zoals *Paratylenchus*, kan het nodig zijn meer dan vier zeven te gebruiken. Voor grote nematoden kan het aantal zeven worden beperkt tot drie, soms twee (zie Oostenbrink 1954 en Seinhorst 1956). M.B.: kijk altijd even na of de zeven niet kapot zijn: vooral aan de randen kunnen gaten ontstaan omdat het gaas loslaat. Dit is goed te zien als de zeef tegen het licht gehouden wordt.
- 6 Neem als de trechter is volgestroomd tot niveau 3 de stop uit de zijuitlaat en laat de suspensie over de zeven stromen. Zet de zeven iets vrij van de ondergrond (aan een kant een houtje eronder of optillen) en klop op de zijkant van de zeven, dan loopt de suspensie beter door.
- De trechter kan eventueel nagespoeld worden als verwacht wordt dat er nog nematoden aan de wand plakken. Volgens waarnemingen zijn deze aantallen echter verwaarloosbaar klein.
- 7 Spoel het debris van de zeven meteen in een opvangbak. Houd hierbij de zeven schuin naar voren, spoel beide kanten en gebruik weinig water. Laat de suspensie in de opvangbak minimaal 5 minuten bezinken. Spoel intussen alle onderdelen van de trechter en de zeven goed schoon.
- 8 Bevestig 2 nematodenfilters met de klemring in het extractiezeefje. Bevochtig ze met de sproeier om luchtbelletjes (en evt. stof) tussen de filters te verwijderen. Zet het zeefje in een geheel met water gevulde overschenschaal met kruisstuk en leg er een horlogeglas op (voor uitleg bij punt 8-11, zie 2.3.1).
- 9 Giet de bezonken suspensie uit de opvangbak voorzichtig via het horlogeglas op het filter. Schud de laatste 300-500 ml goed en schenk deze snel over. Verwijder het horlogeglas en, als het water is doorgelopen, ook de klemring. Voeg het monsterlabel bij het filter.
- 10 Zet een extractieschaaltje met daarin voldoende water om het filter vochtig te houden ( $\pm$  80 ml) op een trillingsvrije plaats. Zet het uitgelekte zeefje er voorzichtig in. Dek het geheel eventueel af ter voorkoming van verdamping en stof.



- 11 Na een extractieperiode van 16-48 uur (N.B.: monsters van verschillende extractieduur kunnen slecht vergeleken worden, zie 2.3.1) kan het zeefje verwijderd worden en de nematodensuspensie uit het schaalpje worden overgegoten in een 100 ml bekersglas voor analyse.

#### **Voor- en nadelen**

De methode heeft een hoog rendement en is goed standaardiseerbaar. Vergeleken met decanteren vindt een meer kritische sedimentatie plaats van zware gronddeeltjes en worden de meeste fijne deeltjes door de zeven kwijtgeraakt. Hierdoor kunnen grote monsters verwerkt worden (tot 1 kg) en zijn de eindsuspensies toch schoon. De benodigde apparatuur is wel duur en gebruikt vrij veel water.

**Literatuur:** Oostenbrink 1954, 1960

**Verder lezen:** bijvoorbeeld Schouten & Arp 1991: toepassing van de Oostenbrink trechter voor extractie van *strooisel*. Het strooiselmonster wordt eerst gedurende minimaal 1 uur geweekt in water, daarna gehomogeniseerd met een bepermixer (10 sec) en dan opgespoeld volgens bovenstaande procedure).

#### **2.3.4.2. Modificatie voor de extractie van grote nematoden**

De opbrengst bij standaardgebruik van de Oostenbrink trechter is goed voor kleine en middelgrote nematoden, maar minder voor grote en dus zwaardere nematoden zoals *Longidorus* en *Xiphinema*. Om deze nematoden te isoleren is o.a. een hogere opstroomsnelheid nodig en moeten bij de opschoning van de suspensie geen nematodenfilters gebruikt worden omdat de grote nematoden daar moeilijk doorheen kruipen.

#### **Benodigdheden**

Zie onder 2.3.4.1 (Standaardgebruik), daarnaast:  
2 zeven van 175-180  $\mu\text{m}$  ( $\emptyset$  20 cm)  
'Longidorus' extractiezeefje (125  $\mu\text{m}$ )  
spuitfles water

#### **Werkwijze**

- 1 Neem een (sub)monster volgens de richtlijnen in §1.4. (de standaard monstergrootte voor EEG controle op *Longidorus/Xiphinema* is 200 ml). Doe het monster in een opvangbak en voeg water toe tot de grond juist onder water staat. Laat de grond een half uur weken.
- 2 Spoel de trechter met water schoon. Sluit de zijuitlaat met de rubber stop en de onderkant met de plug. Vul de trechter met water tot niveau 1 en zet de onderstroom op 1300 ml/min.

Door de hogere onderstroom zullen meer grote nematoden in suspensie blijven, maar ook meer vuil. Ook is er minder tijd beschikbaar tussen niveau 1 en 2 om het monster in de trechter te spoelen. Houd hier rekening mee bij het kiezen van de monstergrootte.

- 3 Breng de inhoud van de opvangbak in het apparaat door het via een vlakke hand in de bovenlaag van het water te gieten (dus niet via de toptrechter en topzeef). Doe dit voorzichtig om te voorkomen dat de nematoden door de gronddeeltjes en het gieten naar beneden gesleurd worden.
- 4 Breng na het inspoelen van het monster (bij het bereiken van niveau 2) de onderstroom terug op 800 ml per min.
- 5 Neem als de trechter is volgestroomd tot niveau 3 de stop uit de zijuitlaat en vang de suspensie op over de twee 180  $\mu\text{m}$  zeven.
- 6 Spoel het debris van de 180  $\mu\text{m}$  zeven in een opvangbak en concentreer dit nog eens door deze suspensie over een 45  $\mu\text{m}$  zeef te gieten.
- 7 Spoel het debris op de 45  $\mu\text{m}$  zeef naar één kant m.b.v. een spuitflesje. Zet een 125  $\mu\text{m}$  extractiezeefje in een schaalte met een bodempje water. Spoel het debris van de 45  $\mu\text{m}$  zeef voorzichtig in het extractiezeefje.
- 8 Zet het extractiezeefje voorzichtig over in een extractieschaaltje gevuld met schoon water ( $\pm$  80 ml). De minimale extractietijd is 20 uur (EEG standaard: 2 dagen)

**N.B.:** Het is mogelijk om in één routine zowel grote als middel- en kleine nematoden te vangen. Gebruik dan bij punt 5 i.p.v. de 180  $\mu\text{m}$  zeven de set van vier 45  $\mu\text{m}$  zeven, waarop dan alle maten nematoden worden opgevangen (plus extra vuil door de hogere opstroomsnelheid!). Spoel het debris van de 45  $\mu\text{m}$  zeven en giet dit via twee 180  $\mu\text{m}$  zeven in een tweede opvangbak. In die opvangbak komen dan de kleine en middelgrote nematoden terecht en op de 180  $\mu\text{m}$  zeven de grote nematoden. Opschoning van de suspensie in de bak gaat volgens standaardgebruik (2.3.4.1, punt 8-11), opschoning van het debris op de 180  $\mu\text{m}$  zeven volgens de richtlijnen hierboven (2.3.4.2, punt 6-8).

**Literatuur:** naar D'Herde en van den Brande 1964

### 2.3.4.3. Modificatie voor de extractie van stengelaaltjes

Omdat bij een populatiedichtheid van één *Ditylenchus dipsaci* (stengelaaltje) per kilo grond al economische schade aan het gewas te verwachten is, wordt een kilo grond opgespoeld en de gehele nematodensuspensie nagekeken.

#### Benodigdheden

Zie onder 2.3.4.1 (Standaardgebruik), daarnaast:  
i.p.v. 4 zeven van 45  $\mu\text{m}$ , 2 zeven van 75  $\mu\text{m}$  ( $\emptyset$  30 cm)  
10 g natriumhexametafosfaat (1% van het monstergewicht)  
eventueel: mengapparaat of vibromixer  
1% oplossing Halamid (100 ml)

#### Werkwijze

- 1 Doe het monster (1 kg) in een kom en bedek het met water tot de grond bijna onderstaat. Voeg 10 g natriumhexametafosfaat toe en laat de grond een half uur weken (zie 1.4)
- 2 Spoel het apparaat met water schoon en vul de trechter tot niveau 1. Zet de onderstroom op 1000 ml/min.  

Besteed extra aandacht aan het schoonmaken van de apparatuur, zodat zeker is dat als er Ditylenchus gevonden wordt, die niet uit een eerder gespoeld monster afkomstig is.
- 2 Spoel het gesuspendeerde monster door de topzeef in de trechter m.b.v. de sproeier boven de topzeef, tot niveau 2 (het monster moet helemaal ingespoeld zijn). Sluit dan de sproeier en breng de onderstroom terug tot 600 ml/min.
- 3 Plaats de set van twee 75  $\mu\text{m}$  zeven onder de zijuitlaat.  

Deze grotere maaswijdte is voldoende om Ditylenchus te vangen, maar kleinere nematode-soorten spoelen er doorheen. De eindsuspensie zal dus weinig kleine nematoden bevatten, zodat Ditylenchus makkelijker te vinden is.
- 4 Neem als de trechter is volgestroomd tot niveau 3 de stop uit de zijuitlaat en laat de suspensie over de zeven stromen.
- 5 Spoel het debris op de zeven meteen in een opvangbak. Houd hierbij de zeven schuin naar voren, spoel beide kanten en gebruik weinig water. Laat de suspensie in de opvangbak minimaal 5 minuten bezinken. Spoel intussen alle onderdelen van de trechter en de zeven goed schoon.
- 6 Bevestig 2 nematodenfilters met de klemring in het extractiezeefje en bevochtig ze met de sproeier. Zet het zeefje in een geheel met water gevulde overschenkschaal met kruisstuk en leg er een horlogeglas op (voor uitleg bij punt 6-9, zie 2.3.1).

7 Giet de bezonken suspensie uit de opvangbak voorzichtig via het horlogeglas op het filter. Schud de laatste 300-500 ml goed en schenk deze snel over. Verwijder het horlogeglas en, als het water is doorgelopen, ook de klemring. Voeg het monsterlabel bij het filter.

8 Vul een extractieschaaltje met  $\pm$  80 ml Halamid 1% oplossing en zet het extractiezeefje er voorzichtig in.

Halamid remt de beweging en kan ook sterfte veroorzaken bij veel nematodensoorten, Ditylenchus dipsaci is er echter ongevoelig voor. Zo zal de eindsuspensie bijna alleen maar Ditylenchus bevatten, die zo makkelijker te vinden is.

9 Na een extractieperiode van 18-24 uur kan de suspensie uit het extractieschaaltje worden overgegoten in een 100 ml bekersglas en geanalyseerd worden.

**Literatuur:** Kleijburg 1960, Oostenbrink 1960





### 2.3.5. Centrifuge-drijfmethode

#### *Toepassingsgebied*

De centrifuge-drijfmethode wordt gebruikt voor de extractie van zowel beweeglijke als onbeweeglijke nematoden(-stadia) uit grond, sedimenten en substraten zoals mest (N.B.: 1.4.3). Vaak vindt vóórextractie van het monster plaats en wordt een geconcentreerde suspensie gecentrifugeerd, zodat grote monsters bewerkt kunnen worden met een kleine tafelcentrifuge. Bij direct centrifugeren van het monster is de monstergrootte zeer beperkt, bovendien zou de extractieëfficiëntie lager zijn (Dickerson 1977).

#### *Principe*

De centrifuge-drijfmethode maakt gebruik van het verschil in soortelijk gewicht (s.g.) tussen nematoden en andere fracties van een monster. Door het monster te brengen in een extractievloeistof met een s.g. hoger dan dat van nematoden gaan deze drijven. Deeltjes met een hogere s.g. dan de vloeistof gaan zinken. Deze scheiding wordt door centrifugeren versneld. De methode bestaat uit twee stappen. Een niet-opgeschoonde nematodensuspensie (verkregen met één van de eerder besproken extractiemethoden) wordt gecentrifugeerd waardoor alle deeltjes met s.g. groter dan 1 (incl. nematoden) neerslaan en het water met de lichtere deeltjes (supernatant) kan worden afgegoten. Vervolgens wordt de neerslag (pellet) gesuspendeerd in de extractievloeistof. Na het centrifugeren drijven de nematoden in het supernatant terwijl de meeste andere deeltjes in de pellet neergeslagen zijn. De nematoden worden verzameld door het supernatant over een fijne zeef te gieten en kunnen meteen bekeken worden. Met deze methode kunnen zo niet alleen beweeglijke, maar ook trage soorten zoals Criconematidae en onbeweeglijke nematoden (immobiele stadia van wortelknobbelen en cysteaaltjes, eieren, geparasiteerde en gefixeerde (N.B.: zie 2.3.5.1) nematoden) geïsoleerd worden.

*Keuze van de extractievloeistof.* Oplossingen van suiker,  $MgSO_4$  en  $ZnSO_4$  worden het meest toegepast. Suiker lijkt goedkoop maar is niet herbruikbaar, de oplossing is bovendien erg plakkerig en de osmotische waarde zo hoog dat veel nematoden het niet overleven (vooral dorylaimide soorten zijn gevoelig).  $ZnSO_4$  heeft een lagere osmotische waarde dan suiker of  $MgSO_4$ , maar is zuur en toxisch.  $MgSO_4$  is iets duurder dan suiker maar kan worden hergebruikt. Soms worden colloïdale silica zoals Ludox, Percoll en Ficoll gebruikt. Het voordeel van die stoffen is dat ze nauwelijks osmotisch effect hebben maar ze zijn erg duur. In dit voorschrift wordt  $MgSO_4$  gebruikt.

*Dichtheid (s.g.) van de extractievloeistof.* Om de nematoden te laten drijven moet de s.g. tenminste gelijk zijn aan 1.084, het door Andrassy (1956) berekende s.g. van (levende) nematoden. Meestal worden oplossingen met een s.g. van 1.15 of 1.18 gebruikt. Verhoging van het s.g. hoeft niet altijd tot hogere

extractieëfficiëntie te leiden; door de toenemende osmotische spanning zullen meer nematoden beschadigd raken en suspensies worden vuiler omdat meer deeltjes blijven drijven.

Hoeveelheid stof (g) opgelost in water en aangevuld tot 1 liter om oplossingen van aangegeven s.g. te krijgen (Southey 1986)(s.g. controleren met densitometer):

S.g. (20°C)	1.15	1.18	1.22	1.28
Suiker	401	484	588	?
MgSO <sub>4</sub> (puur)	166	200	245	?
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	339	409	503	?
ZnSO <sub>4</sub> (puur)	156	187	229	?
ZnSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	279	335	410	?

**Centrifugatiekracht.** De relatieve centrifugale kracht (RCK, een veelvoud van de zwaartekracht g) is een functie van de straal van het midden van de centrifuge tot de bodem van de centrifugebuis (R, in cm) en het aantal omwentelingen per minuut (N):

$$RCK = 0.0000118 \times R \times N^2$$

RCK's van 700 tot 2900, maar meestal 1800 g worden gebruikt. Voor de twee Centaurcentrifuges van de vakgroep Nematologie geldt dat hiervoor de centrifuge ingesteld moet worden op  $\pm 3000$  omwentelingen per minuut (R = 16,3). De gebruikte RCK is niet echt kritisch, als er maar een stabiele pellet gevormd wordt (hangt mede af van het type monster) en de RCK bij alle te vergelijken extracties hetzelfde is.

#### **Benodigdheden**

- centrifuge
- vibromixer
- balans
- densitometer
- tenminste 2 centrifugebuizen
- 2 pipetjes voor tarreren (voor water en MgSO<sub>4</sub>)
- 10  $\mu$ m zeefje
- bekerglas
- sputfles met water
- MgSO<sub>4</sub> oplossing, s.g. 1.18

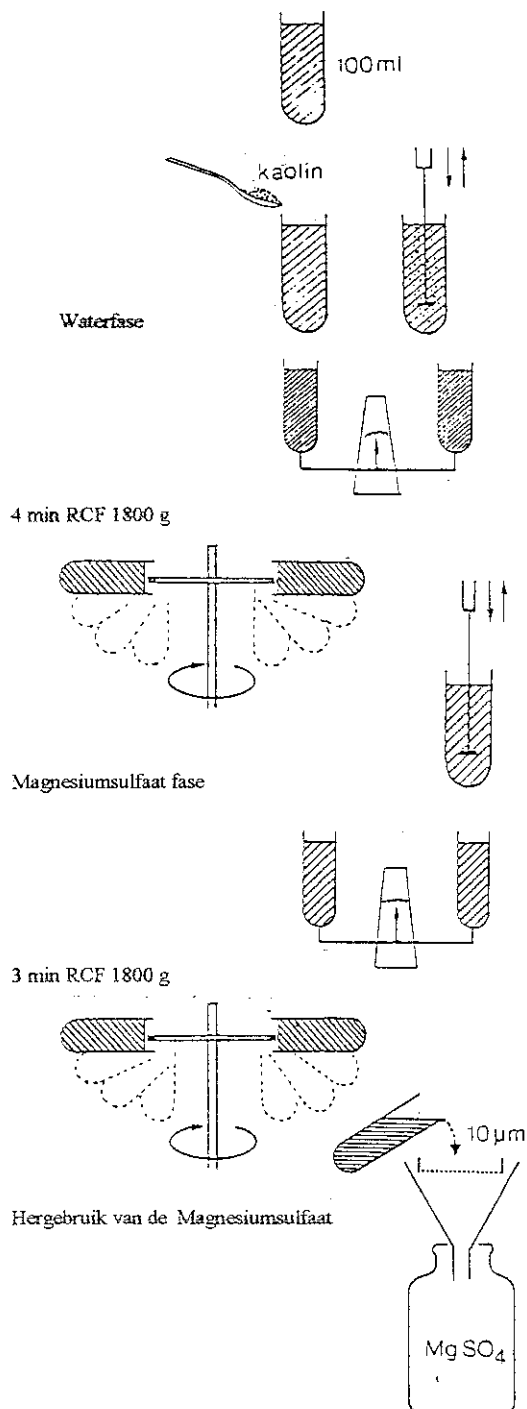
#### **Werkwijze**

- 1 Spoel een monster volgens één van de eerder beschreven methoden op om een kleine hoeveelheid (i.v.m. inhoud centrifugebuizen) suspensie te krijgen.

Bijvoorbeeld, als hiervoor de Oostenbrink trechter gebruikt wordt is het belangrijk dat de vier zeven met zo min mogelijk water afgespoeld worden. Dit kan met de volgende aanpassing: Spoel eerst met weinig water het debris op de bovenste zeef naar één kant en houd hierbij die zeef boven de andere drie zeven, zodat eventueel doorgespoelde nematoden worden opgevangen. Spoel dan het verzamelde debris met weinig water in een plastic opvangbak of maatbeker; herhaal dit voor de resterende drie zeven.

# Centrifuge methode in schema

## Procedure



2 Breng de suspensie in twee (of een ander even aantal) centrifugebuizen en tarreer deze op een balans met water. Centrifugeer gedurende 4 minuten bij 1800 g.

3 Giet het supernatant af door een 10  $\mu\text{m}$  zeefje.

Bij monsters met een lage slibfractie of weinig organisch materiaal kan bij het afgieten de pellet (waarin ook de nematoden zitten) opwarrelen. Door het supernatant dan af te gieten via een zeefje worden de niet-neergeslagen en opwarrelende nematoden opgevangen. Coolen en D'Herde (1972) gebruiken kaolien, een kleimineraal, om de pellet te verstevigen (bij de eerste maal centrifugeren 1 ml kaolien toevoegen per 100 ml suspensie, goed mengen). Het nadeel daarvan is wel dat de kaolien bij het voor de tweede maal centrifugeren wéér neerslaat en daarbij nematoden die dan eigenlijk moeten blijven drijven in de extractievloeistof, naar beneden kan sleuren.

4 Doe  $\text{MgSO}_4$  (1.18) bij de pellet en meng goed m.b.v. een vibromixer (20 sec). Spoel de kop van de mixer boven de centrifugebuis met  $\text{MgSO}_4$  na.

N.B.: De hoge osmotische waarde van de extractievloeistof veroorzaakt plasmolyse in de nematoden waardoor ze kunnen vervormen of zelfs doodgaan (soortsafankelijk). Het is dus essentieel om de verblijftijd van de nematoden in de vloeistof te beperken en ze daarna goed met water te spoelen (punt 6).

5 Tarreer de centrifugebuizen op de balans met  $\text{MgSO}_4$  en centrifugeer gedurende 3 minuten bij 1800 g.

6 Giet het supernatant over het 10  $\mu\text{m}$  zeefje. Spoel goed met water na en verzamel de nematoden van de zeef in een bekerglas. De  $\text{MgSO}_4$  die door het zeefje gaat kan opgevangen en hergebruikt worden.

#### **Voor- en nadelen**

De grote verdienste van de centrifuge-drijfmethode is dat er ook onbeweeglijke nematoden mee geïsoleerd kunnen worden. Binnen een half uur is het monster geëxtraheerd én is een relatief schone nematodensuspensie beschikbaar. De extractievloeistof heeft echter ook nadelige effecten op de nematoden. De vorm kan soms iets veranderen, wat problemen geeft voor de nauwkeurige identificatie. Dit probleem is voor taxonomische monsters op te lossen door de grondmonsters te fixeren voor de extractie. (zie 1.3.1. en 2.3.5.1.) Ook de vitaliteit kan beïnvloed worden (soortsafankelijk). Dit kan een probleem zijn als de nematoden voor infectie proeven gebruikt moeten worden. De benodigde apparatuur is duur (bv. centrifuge) maar hoort vaak wel tot de standaarduitrusting van een lab.

**Literatuur:** Gooris & D'Herde 1972

**Verder lezen:** bijvoorbeeld,

-Southey 1986: overzicht

-Byrd et al. 1966: beschrijven een drijfmethode zonder centrifugeren: door gebruik van een zware suikeroplossing blijven nematoden drijven terwijl gronddeeltjes neerslaan door toevoeging van 'flocculating chemicals' (o.a. Separan). Deze methode wordt vooral in de V.S. toegepast.

- Viglierchio & Yamashita 1983: vergelijken de extractie-opbrengsten met verschillende dichtheden van suiker, MgSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, Percoll en Ficoll, en de effecten van deze vloeistoffen op vier nematodesoorten.
- Coolen & D'Herde 1977, Griffiths et al. 1990: gebruiken Ludox (colloïdale silica)

### 2.3.5.1. Modificatie voor de extractie van gefixeerde monsters

Monsters van (anaerobe) zoetwaterbodems of mariene sedimenten worden meestal direct gefixeerd om zo de toestand op het moment van bemonsteren vast te leggen (zie ook 1.3.1). Door de fixatie is de huid van de nematoden permeabel geworden wat flotatie in de dichte vloeistof bemoeilijkt: de vloeistof kan vrijelijk het nematodenlichaam binnengaan, de nematode wordt zwaarder en zinkt alsnog. De verblijftijd in de vloeistof is dus nog kritischer dan bij levende nematoden; hoe korter hoe beter. Vooral voor de grote mariene nematoden geldt dat een s.g. van 1.18 niet genoeg is om ze te laten drijven. Momenteel wordt gewerkt met s.g. 1.28. *N.B.: Verdere aanpassing van het onderstaande voorschrift na meer ervaring met extractie van gefixeerde monsters wordt verwacht.*

#### **Benodigdheden**

Zie 2.3.5 (Centrifuge-drijfmethode), daarnaast:  
I.p.v. MgSO<sub>4</sub> s.g. 1.18: MgSO<sub>4</sub> s.g. 1.28

#### **Werkwijze**

- 1 Spoel het gefixeerde monster op, bijv. met de Oostenbrink trechter (2.3.4).
- 2 Concentreer de verkregen suspensie en breng deze over naar twee (of een ander even aantal) centrifugebuizen. Tarreer de buizen met water.
- 3 Centrifugeer gedurende 4 minuten bij 1800 g.
- 4 Giet het supernatant voorzichtig af, over een 10 µm zeefje zodat gecontroleerd kan worden of er nog nematoden in zitten. Bij heel zanderig sediment kan de pellet teveel opwarrelen, gebruik dan kaolien bij de eerste maal centrifugeren (zie 2.3.5, punt 3)
- 5 Voeg MgSO<sub>4</sub> 1.28 bij de pellet en mix met een vibromixer (20 sec). Tarreer de centrifugebuizen met MgSO<sub>4</sub> 1.28.
- 6 Centrifugeer kort: Zet als de maximumsnelheid (bij 1800 g) is bereikt (na ± 1 minuut) de centrifuge af.
- 7 Giet het supernatant af over een 10 µm zeefje (de MgSO<sub>4</sub> kan worden hergebruikt). Spoel goed met water om de MgSO<sub>4</sub> kwijt te raken en verzamel de nematoden in een bekerglas met water (breng na het tellen van de suspensie de

nematoden terug in formaline als de suspensie nog verder bewaard moet worden).

- 7a Eventueel kan voor een derde maal gecentrifugeerd worden als verwacht wordt dat in de pellet nog nematoden zitten (dat deze verwachting niet ongegrond is bewijst Claassen 1991). Herhaal dan punt 5-7.

*Literatuur:* Heip et al. 1985, Jacobs 1987, Bongers & van der Haar 1990, Claassen 1991

## **2.4. EXTRACTIE VAN CYSTEN**

### **2.4.1. Baunacke methode**

#### ***Toepassingsgebied***

De Baunacke methode (of witte kom methode) wordt gebruikt voor de extractie van cysten uit gedroogde grond (max. 50 g) en soms ook voor de opschoning van gedroogd debris.

#### ***Principe***

De methode maakt gebruik van het drijfvermogen van gedroogde cysten en van het verschil in grootte tussen cysten en andere fracties van het monster.

Eerst worden de fijne deeltjes verwijderd door het monster te zeven. Daarna wordt het debris van de zeef in een kom met water gespoeld. De cysten blijven drijven langs de rand terwijl de zware deeltjes zinken.

#### ***Benodigheden***

175-180  $\mu\text{m}$  zeef ( $\emptyset$  20 cm)  
witte kom met schuine wanden, inhoud 2-3 liter  
fijn penseel (no. 00, 0 of 1)  
putje, of horlogeglas met vochtig filtreerpapier  
schoon water

#### ***Werkwijze***

Droog (§1.4.4) een (sub)monster van maximaal 50 g. Plaats het monster op een 175  $\mu\text{m}$  zeef en was de fijne deeltjes met water door de zeef. Spoel het debris van de zeef in een witte kom. De cysten drijven langs de rand (gebruik eventueel een lamp) en kunnen met een penseel in een putje of horlogeglas gevist worden. Roer het sediment ook op want onder de bezonken gronddeeltjes kunnen cysten gevangen zitten. N.B.: De tijd om te vissen is beperkt, vooral volle cysten zakken snel.

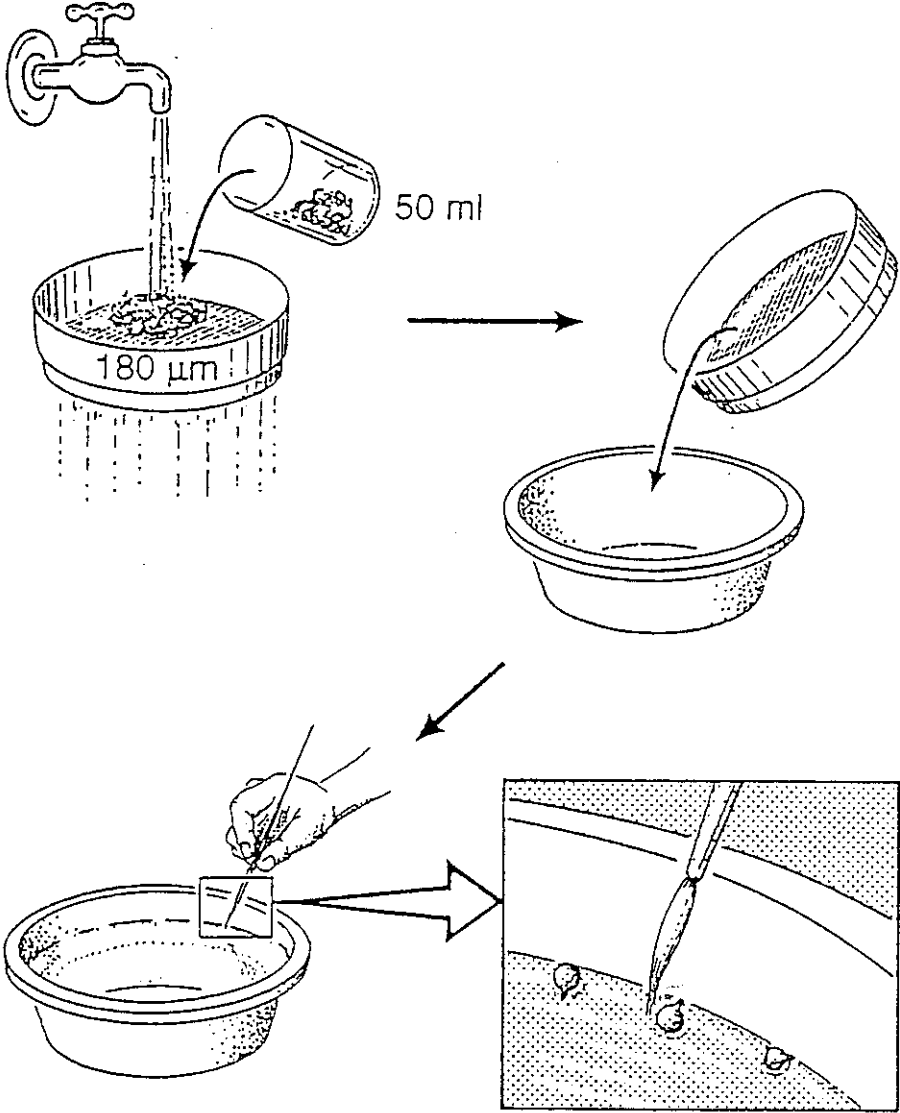
#### ***Voor- en nadelen***

De methode is uiterst simpel, snel, goedkoop en zuinig met water. De extractieëfficiëntie en de monstergrootte zijn echter beperkt en de resultaten persoonsafhankelijk. Bij grote aantallen cysten kost het uitvissen vrij veel tijd.

***Literatuur:*** Baunacke 1922, Oostenbrink 1950



**Baunacke of "witte kom" methode**



## 2.4.2. Fenwick Kan

### **Toepassingsgebied**

De Fenwick Kan wordt gebruikt voor de extractie van cysten uit gedroogde grond (max. 300 g). De standaardhoeveelheid voor het aardappelmoehedisonderzoek is 200 ml.

### **Principe**

De methode maakt gebruik van het drijfvermogen van gedroogde cysten en van het verschil in grootte tussen cysten en andere fracties van het monster. Bij de Fenwick Kan blijven grove delen van het monster op de topzeef achter terwijl zware deeltjes in de kan bezinken en fijne en lichte deeltjes waaronder cysten blijven drijven. De cysten spoelen bij het overlopen van de kan via de kraag op een zeef met een maaswijdte kleiner dan de lichaamsdiameter van cysten.

### **Benodigdheden**

gemodificeerde Fenwick Kan (Catalogue No 400)  
175-180  $\mu\text{m}$  zeef ( $\emptyset$  20cm)

### **Werkwijze**

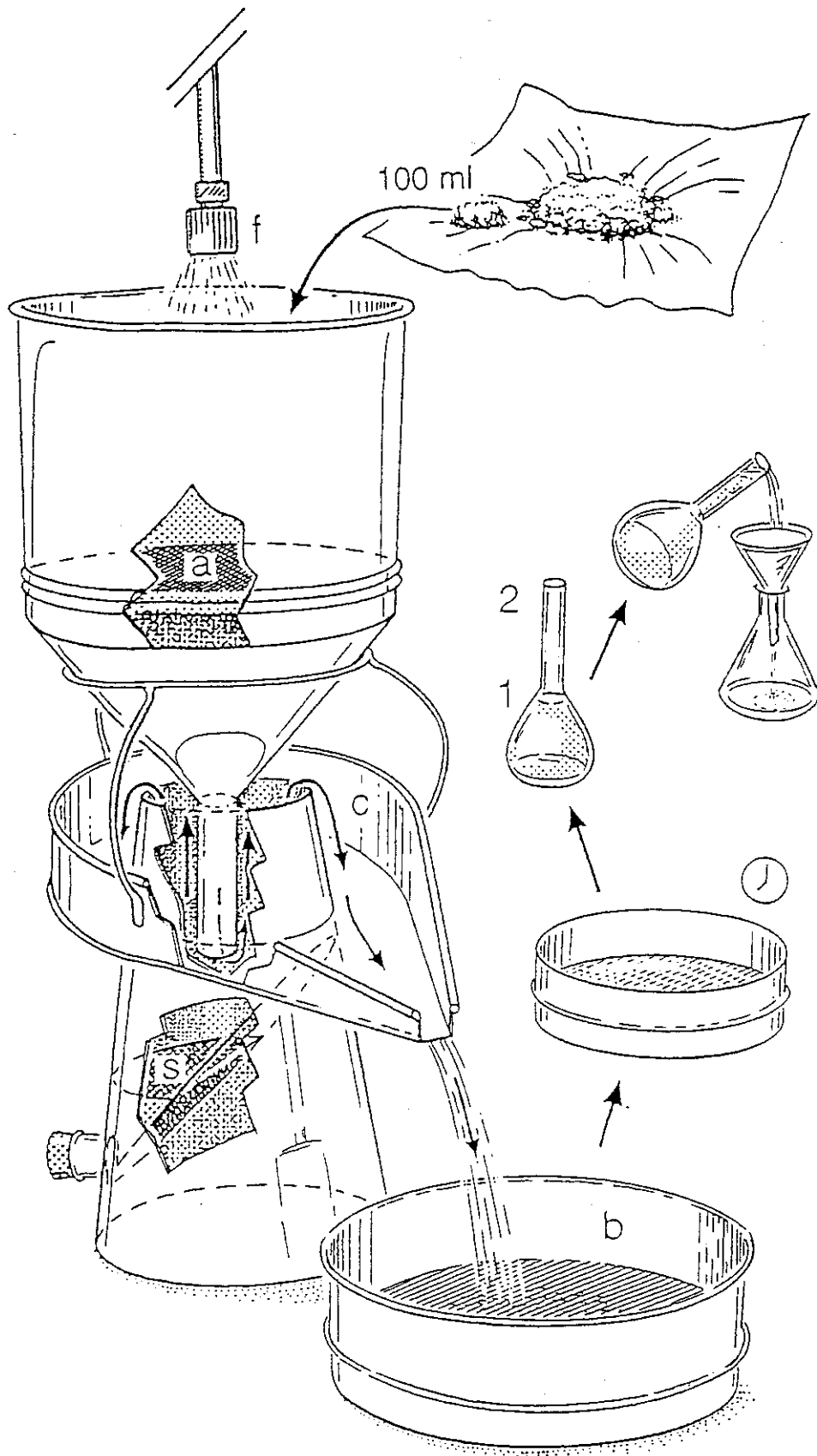
- 1 Droog een (sub)monster van maximaal 300 g (§1.4.4).
- 2 Spoel de kan met water schoon. Doe de stop in de uitlaat en vul de kan geheel met water. Plaats een 175  $\mu\text{m}$  zeef zó naast het apparaat dat het overlopende water via de kraag erop terecht komt. Zet de zeef iets schuin (aan een kant een houtje eronder), dan loopt hij beter door.

Voor *Heterodera carotae* en *H. urticae*, die kleine cysten vormen, is een 100  $\mu\text{m}$  zeef veiliger. Omgekeerd kan voor soorten die grote cysten vormen (bijv. *H. schachtii*) een maaswijdte van 250  $\mu\text{m}$  voldoende zijn (het voordeel is dat meer vuil dóór de zeven spoelt maar het risico is dat onvolgroeide kleinere cysten verloren gaan).

- 3 Spoel het monster door de topzeef m.b.v. de sproeier. Laat de sproeier 5 minuten aan staan.
- 4 Spoel de trechter en de kraag goed na met water zodat eventueel vastgekleefde cysten nog op de zeef komen. Verwijder dan de stop en maak de kan met water schoon.
- 5 Het debris op de zeef kan op verschillende manieren worden opgeschoond, bijvoorbeeld:
  - Droog het debris, spoel het in een witte kom en vis de drijvende cysten (2.4.1), of:
  - Droog het debris en isoleer de cysten m.b.v. organische oplosmiddelen (2.4.5.1) of:
  - Spoel het debris op een filtreerpapier en vis de cysten onder de binoculair, of:
  - Gebruik de centrifuge-drijfmethode voor cysten (2.4.5.2)

**Voor- en nadelen:** Grote monsters kunnen gestandaardiseerd verwerkt worden. De methode kost wel veel water. Ook gelden de nadelen van droge extractie (zie 2.1.4).

**Literatuur:** Fenwick 1940, Oostenbrink 1950



**Fenwick methode. Extractie van cysten uit gedroogde grond gevolgd door acetonmethode.**

### 2.4.3. Kort trechter

#### **Toepassingsgebied**

De Kort trechter wordt gebruikt voor de extractie van cysten uit grond (max. 300 g) die *niet* gedroogd hoeft te zijn en wordt derhalve aanbevolen voor extractie van *Heterodera* en *Punctodera* (indien een levende cystinhoud vereist is).

#### **Principe**

De methode maakt gebruik van verschillen in bezinkingssnelheid en grootte tussen cysten en gronddeeltjes. In de Kort trechter zorgt een onderstroom dat cysten blijven zweven terwijl gronddeeltjes bezinken. De cysten spoelen via een kraag op een zeef met een maaswijdte kleiner dan de lichaamsdiameter van cysten.

#### **Benodigheden**

Kort trechter (Catalogue No. 500)  
175-180  $\mu\text{m}$  zeef ( $\emptyset$  20 cm)

#### **Werkwijze**

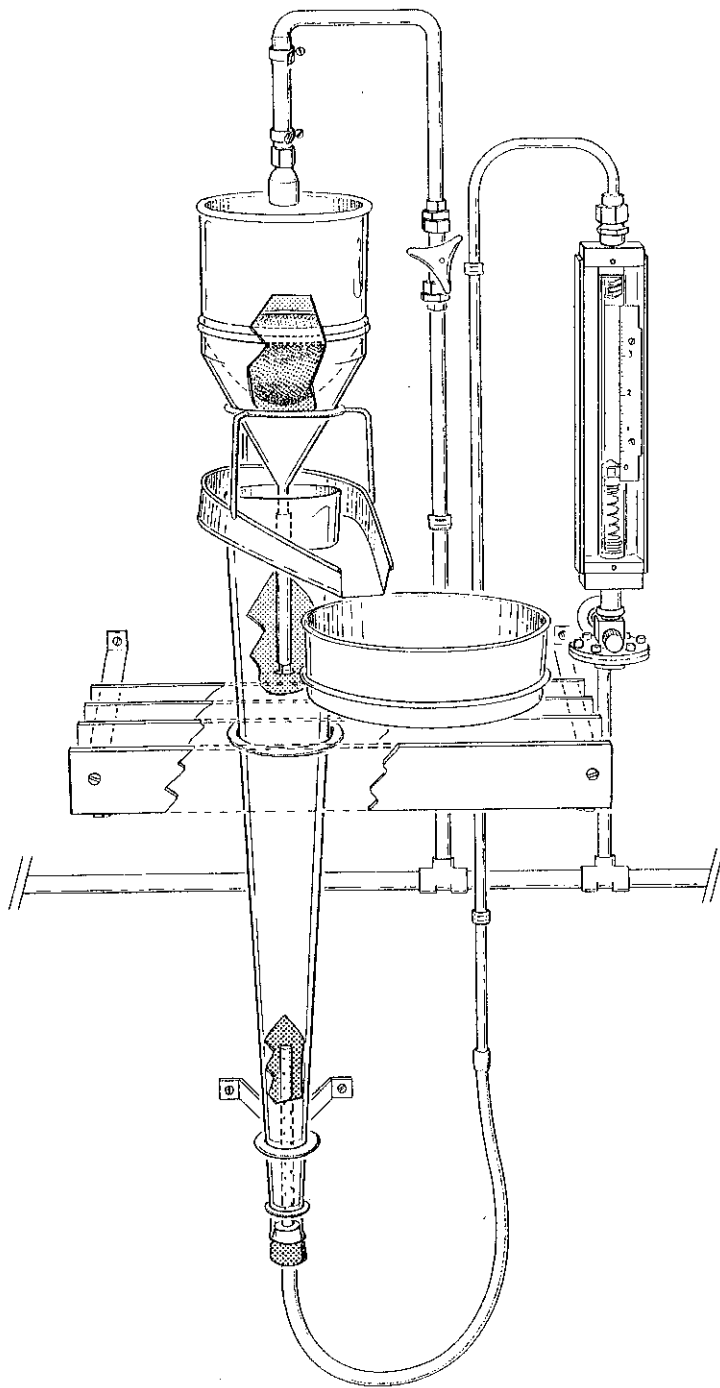
- 1 Neem een (sub)monster volgens de richtlijnen in §1.4.
- 2 Spoel de Kort trechter voor alle zekerheid schoon. Sluit het apparaat aan de onderkant met de plug en vul het met water. Zet de onderstroom op 3500 ml/min en plaats de 175  $\mu\text{m}$  zeef onder de kraag.

Voor *Heterodera carotae* en *H. urticae*, die kleine cysten vormen, is een 100  $\mu\text{m}$  zeef veiliger. Omgekeerd kan voor soorten die grote cysten vormen (bijv. *H. schachtii*) een maaswijdte van 250  $\mu\text{m}$  voldoende zijn (het voordeel is dat meer vuil dóór de zeven spoelt maar het risico is dat onvolgroeide kleinere cysten verloren gaan).

- 3 Spoel het monster via de topzeef in de trechter m.b.v. de sproeier. Sluit de sproeier en laat de onderstroom gedurende 5 minuten lopen.
- 4 Was de kraag goed na met water zodat eventueel vastgekleefde cysten nog op de zeef spoelen. Trek dan de plug eruit en spoel alle onderdelen van het apparaat schoon.
- 5 Uit het debris op de zeef kunnen cysten op verschillende manieren geïsoleerd worden, bijvoorbeeld:
  - Droog het debris, spoel het in een witte kom en vis de drijvende cysten (2.4.1), of:
  - Droog het debris en isoleer de cysten m.b.v. organische oplosmiddelen (2.4.5.1) of:
  - Spoel het debris op een filtreerpapier in een trechter en vis de cysten onder de binoculair, of:
  - Gebruik de centrifuge-drijfmethode voor cysten (2.4.5.2)

**Voor- en nadelen:** Grote monsters kunnen gestandaardiseerd verwerkt worden. Vergeleken met 'droge' extractiemethoden worden volle cysten beter geëxtraheerd en geldt als voordeel dat het monster niet gedroogd hoeft te worden. De methode kost wel veel water en de benodigde apparatuur is duur. Omdat het spoelsel nog veel vuil bevat moet het opgeschoond worden.

**Literatuur:** Kort 1960



**Kort's opstelling  
voor extractie van cysten uit niet gedroogde grond**

#### 2.4.4. Seinhorst trechter voor cysten

##### **Toepassingsgebied**

De Seinhorst trechter wordt gebruikt voor de extractie van cysten uit grond (max. 300 g) die niet gedroogd hoeft te zijn en wordt derhalve aanbevolen voor extractie van *Heterodera* en *Punctodera* (indien een levende cystinhoud vereist is).

##### **Principe**

De methode maakt gebruik van verschillen in bezinkingssnelheid en grootte tussen cysten en gronddeeltjes. In de Seinhorst trechter zorgt een onderstroom dat de cysten blijven zweven terwijl gronddeeltjes bezinken. De cysten spoelen via een kraag op een zeef met een maaswijdte kleiner dan de lichaamsdiameter van cysten. Volgens Seinhorst (1964) zijn dit vooral de lichte (half)lege cysten en blijven de zware volle cysten achter in de bovenste helft van de trechter (zie figuur). Het apparaat heeft daarom een zijuitlaat zodat de inhoud van de bovenste helft van de trechter ook over de zeef kan stromen.

##### **Benodigdheden**

- Seinhorst trechter voor cysten (Catalogue No 600)
- 2 mm keukenzeef ( $\varnothing$  20 cm)
- 175-180  $\mu\text{m}$  zeef ( $\varnothing$  20 cm)

##### **Werkwijze**

- 1 Neem een (sub)monster volgens de richtlijnen in §1.4.
- 2 Spoel het apparaat voor alle zekerheid schoon. Sluit de zijuitlaat en de onderkant en vul de trechter met water. Zet de onderstroom op 3500 ml/min. Plaats de 175  $\mu\text{m}$  zeef zó dat zowel de overstroom via de kraag en slang, als ook de afvoer via de zijuitlaat die later geopend wordt opgevangen worden. Zet de zeef iets schuin (aan een kant een houtje eronder), dan loopt hij beter door.

Voor *Heterodera carotae* en *H. urticae*, die kleine cysten vormen, is een 100  $\mu\text{m}$  zeef veiliger. Omgekeerd kan voor soorten die grote cysten vormen (bijv. *H. schachtii*) een maaswijdte van 250  $\mu\text{m}$  voldoende zijn (het voordeel is dat meer vuil dóór de zeven spoelt maar het risico is dat onvolgroeide kleinere cysten verloren gaan).

- 3 Plaats het monster in een keukenzeef in de open bovenkant van de trechter. Beweeg de zeef heen en weer in het water zodat het monster door de zeef in de trechter spoelt. Laat hierna de onderstroom gedurende 5 minuten lopen.
- 4 Spoel de kraag goed na met water zodat eventueel vastgekleefde cysten nog op de zeef komen. Open dan de zijuitlaat en vang de suspensie op de 175  $\mu\text{m}$  zeef. Open tenslotte de onderkant en spoel het apparaat schoon.



5 Uit het debris op de zeef kunnen cysten op verschillende manieren geïsoleerd worden, bijvoorbeeld:

- Droog het debris, spoel het in een witte kom en vis de drijvende cysten (2.4.1), of:
- Droog het debris en isoleer de cysten m.b.v. organische oplosmiddelen (2.4.5.1) of:
- Spoel het debris op een filtreerpapier in een trechter en vis de cysten onder de binoculair, of:
- Gebruik de centrifuge-drijfmethode voor cysten (2.4.5.2)

#### **Voor- en nadelen**

Grote monsters kunnen gestandaardiseerd verwerkt worden. Vergeleken met de 'droge' extractiemethoden worden volle cysten beter geëxtraheerd en geldt als voordeel dat het monster niet gedroogd hoeft te worden. De methode kost wel veel water en de benodigde apparatuur is duur. Omdat het spoelsel nog veel vuil bevat moet het opgeschoond worden.

**Literatuur:** naar Seinhorst 1964

### **2.4.5. Opschonen van het debris**

#### **2.4.5.1. Opschonen met behulp van organische oplosmiddelen**

##### **Toepassingsgebied**

De methode wordt gebruikt voor het opschonen van het debris dat overblijft na extractie met een van de eerder besproken methoden voor cysten. Het debris moet goed gedroogd zijn. De methode is vooral betrouwbaar voor *Globodera* spp. Bij veel andere cystesoorten zoals bijvoorbeeld de erwtecyst (*H. goettingiana*) zijn de cysten niet 'dicht' genoeg (open 'vensters', meer zwakke plekken en scheuren); de extractievloeistof dringt dan snel de cyst binnen waardoor deze zinkt en voor analyse verloren gaat.

##### **Principe**

De methode maakt gebruik van het verschil in structuur tussen cysten en de rest van het debris dat overblijft na extractie met een van de eerder besproken methoden.

Het gedroogde debris wordt in een organisch oplosmiddel gebracht. Door de lage oppervlaktetension (lage polariteit) blijven de 'dichte' cysten drijven terwijl het poreuze organische debris de vloeistof opneemt en zinkt. Als extractievloeistof worden aceton ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ), alcohol 96% ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) en mengsels van aceton of ethanol met carbontetrachloride ( $\text{CCl}_4$ ) toegepast. In het hier besproken voorbeeld wordt aceton gebruikt.

**Pas op: aceton is licht ontvlambaar en carbontetrachloridedamp is giftig. Werk dus in een geschikte afzuigkast (geen vonkende ventilatiemotor!) en pas op met vuur.**

##### **Benodigheden**

- 2 glazen trechters
- 2 stuks filtreerpapier ( $\varnothing$  18.5 cm)
- theezeefje
- 2 glazen 250 ml kolven
- petrischaal ( $\varnothing$  20 cm)



± 500 ml aceton  
fijn penseel (No. 0 of 1)  
binoculair

#### **Werkwijze**

- 1 Spoel een monster volgens één van de eerder beschreven extractiemethoden voor cysten op.
- 2 Spoel het verkregen debris van de zeef in een trechter met daarin een in vieren gevouwen filtreerpapier. Laat het debris in het filtreerpapier tenminste een nacht drogen bij kamertemperatuur.
- 3 Breng het gedroogde debris (pas op dat het niet wegwaait) via een theezeefje en een trechter in een 250 ml kolf. N.B.: het glaswerk moet goed droog zijn!
- 4 Voeg aceton toe tot niveau 1 (zie figuur bij 2.4.2.). Schud goed en vul dan aan tot niveau 2. Wacht 1 minuut.
- 5 Giet het drijvende materiaal in één beweging af over een filtreerpapier in een trechter op een tweede kolf. Draai hierbij de eerste kolf langzaam rond zodat de hals van de kolf zichzelf reinigt. Stop als de vloeistof in de eerste kolf op ongeveer niveau 1 terug is.
- 6 Schud deze vloeistof met het achtergebleven debris goed en vul opnieuw aan tot niveau 2 met aceton. Wacht 1 minuut en giet het drijvende materiaal weer in één beweging af. De aceton in de tweede kolf kan worden hergebruikt.
- 7 Breng het filtreerpapier met de cysten over naar een vochtige petrischaal. De cysten kunnen onder de binoculair met een penseel uit het debris worden gevist.

#### **Voor- en nadelen**

Het is een snelle, simpele en redelijk goedkope methode. De benodigde extractievloeistoffen hebben echter hun nadelen (ontvlambaarheid, giftigheid); ethanol 96% geldt in dit verband als veiligste alternatief maar is wel het duurst. Omdat ethanol een iets hogere polariteit heeft dan aceton is de scheiding ook wat minder goed. De methode is alleen geschikt voor het opschonen van *Globodera*.

**Literatuur:** den Ouden 1954 (aceton), Oostenbrink 1960 (aceton-carbontetrachloride mengsel), Seinhorst 1975 (ethanol 96%)

## 2.4.5.2. Opschonen met behulp van de centrifuge-drijfmethode

### *Toepassingsgebied*

De methode wordt gebruikt voor de opschoning van het debris dat overblijft na extractie met een van de eerder besproken methoden voor cysten. Het debris hoeft *niet* gedroogd te worden en de cysten hoeven niet 'dicht' te zijn zoals bij de hierboven beschreven opschoningsmethode. Derhalve wordt de methode aanbevolen voor opschoning van *Heterodera* en *Punctodera* spp. en voor met schimmels geïnfekteerde cysten waarbij de schimmel in kader van biologische bestrijdingsonderzoek intact moet blijven.

### *Principe*

De methode maakt gebruik van het verschil in soortelijk gewicht (s.g.) tussen de cysten en de rest van het debris dat overblijft na extractie met een van de eerder besproken methoden voor cysten. Door het debris te brengen in een extractievloeistof met een s.g. hoger dan dat van cysten gaan deze drijven. Deeltjes met een hogere s.g. dan de vloeistof zinken. Deze scheiding wordt door centrifugeren versneld.

De methode bestaat uit twee stappen. Het van de zeef gespoelde debris wordt gecentrifugeerd in water waardoor alle deeltjes met s.g. groter dan 1 (incl. cysten) neerslaan en het water (supernatant) kan worden afgegoten. Vervolgens wordt de neerslag (pellet) gesuspendeerd in de extractievloeistof. Na centrifugeren drijven de cysten in het supernatant terwijl de meeste andere deeltjes in de pellet neergeslagen zijn. Cysten worden verzameld door het supernatant over een zeef te gieten.

*Over de keuze en dichtheid van de extractievloeistof en de centrifugatiesnelheid, zie 2.3.5.*

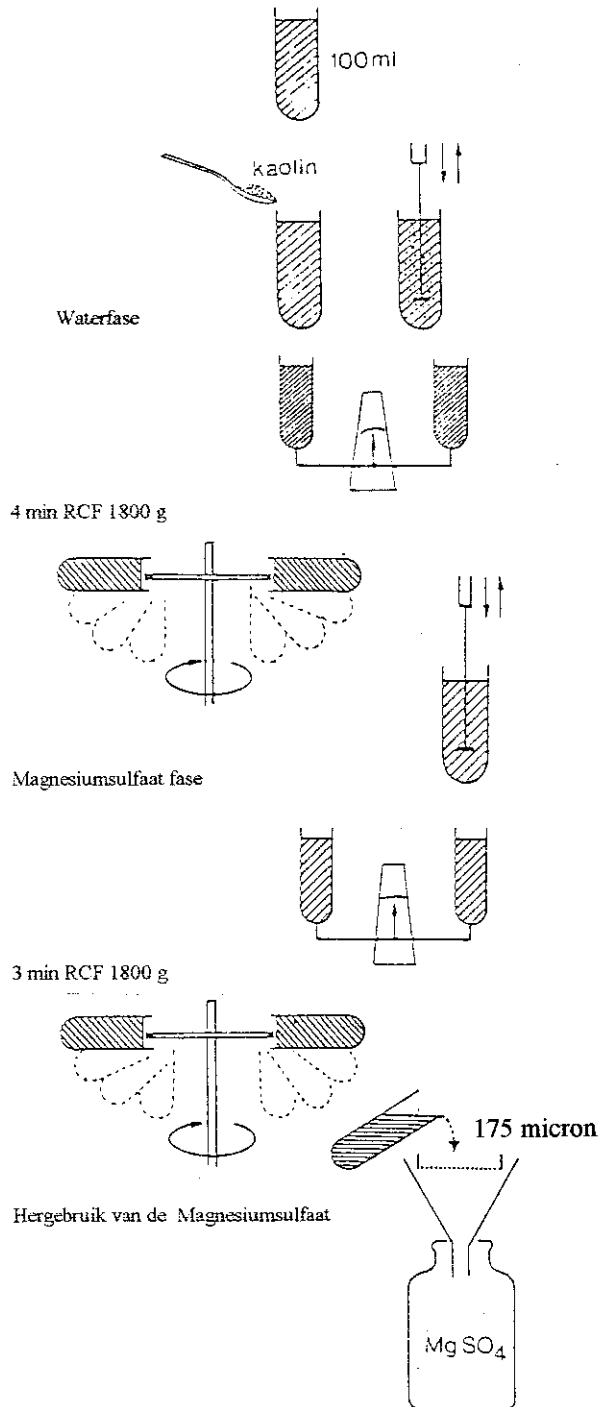
### *Benodigdheden*

- centrifuge
- vibromixer
- balans
- densitometer
- binoculair
- tenminste 2 centrifugebuizen
- 2 pipetjes voor tarreren (voor water en  $MgSO_4$ )
- 125  $\mu m$  zeefje ( $\emptyset$  10 cm)
- bekerglas
- sputfles met water
- filtreerpapier ( $\emptyset$  18.5 cm)
- penseel (No. 0 of 1)
- $MgSO_4$  oplossing, s.g. 1.28

### *Werkwijze*

- 1 Spoel een monster volgens één van de eerder beschreven extractiemethoden voor cysten op.

Procedure



- 2 Breng het verkregen debris in twee (of een ander, even aantal) centrifugebuizen en tarreer deze op een balans met water. Centrifugeer gedurende 4 minuten bij 1800 g.
- 3 Giet het supernatant af, via een 125  $\mu\text{m}$  zeefje om lege (en drijvende) cysten op te vangen.
- 4 Doe  $\text{MgSO}_4$  (1.28) bij de pellet en meng goed m.b.v. een vibromixer (20 sec). Spoel de kop van de mixer boven de centrifugebuis met  $\text{MgSO}_4$  na.
- 5 Tarreer de centrifugebuizen op de balans met  $\text{MgSO}_4$  oplossing en centrifugeer gedurende 3 minuten bij 1800 g.
- 6 Giet het supernatant over het 125  $\mu\text{m}$  zeefje. Spoel met water na en verzamel de cysten van de zeef in een bekersglas met water. De  $\text{MgSO}_4$  die door het zeefje gaat kan opgevangen en hergebruikt worden.
- 7 Doe een in vieren gevouwen filtreerpapier in een trechter en spoel de inhoud van het bekersglas hierop. De cysten kunnen onder de binoculair uit het debris worden gevist met behulp van een penseel.

#### ***Voor- en nadelen***

Omdat het debris niet gedroogd hoeft te worden is de methode ook bruikbaar voor het opschonen van cysten die niet tegen uitdroging kunnen. De gebruikte apparatuur is duur maar hoort vaak tot de standaarduitrusting van een lab. De centrifuge buizen moeten voldoende groot zijn, b.v. 100 ml.

***Literatuur:*** naar Dunn 1969

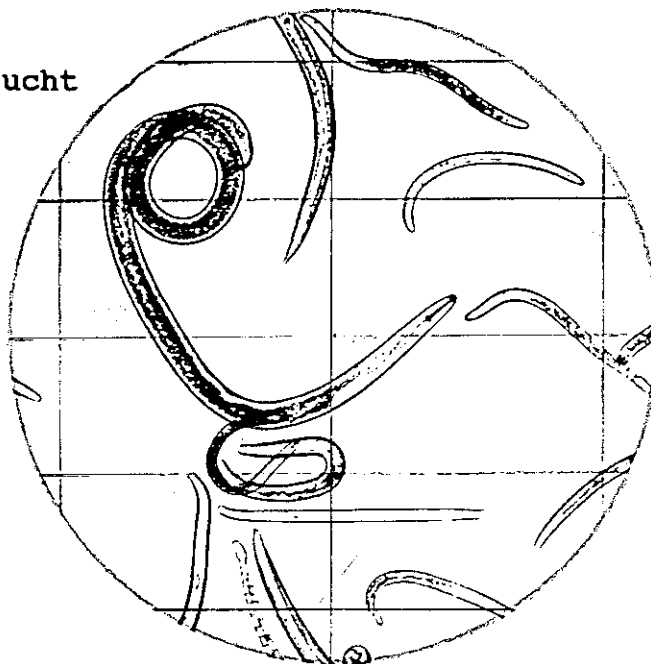
## 2.5. ANALYSE VAN EXTRACTEN

Als het extract bestaat uit een levende nematodensuspensie moet het zo spoedig mogelijk na extractie geanalyseerd worden, omdat de waterige suspensie beperkt houdbaar is (door schimmel-/bacteriegroei) en de oorspronkelijke nematodenaantallen veranderen door sterfte en reproductie. Bewaar het in de koelkast (4°C) of fixeer de nematoden meteen (3.4.1). Cysten kunnen droog lang bewaard worden. De vitaliteit van de cystinhoud kan wel achteruit gaan.

### 2.5.1. Tellen van suspensies

#### *Benodigdheden*

binoculair  
aquariumpompje of perslucht  
100 ml bekerglas  
10 ml pipetzuiger  
spuitfles met water  
telbakje  
schoon water



Nematodensuspensie onder de binoculair

#### *Werkwijze*

- 1 Vul de nematodensuspensie m.b.v. de spuitfles aan tot een bekend volume, bijv. 100 ml. Spoel de pipet en het mondstuk van het luchtslangetje met water schoon.
- 2 Meng de suspensie in het bekerglas zorgvuldig met behulp van lucht uit een aquariumpompje of perslucht en door de suspensie een paar keer met de pipet op te zuigen en terug te spuiten.
- 3 Houd nu de pipetpunt in het midden van de suspensie (*niet* in de luchtbelletjesstroom) en trek snel 10 ml vloeistof (of een andere hoeveelheid, afhankelijk van de dichtheid van de suspensie en de grootte van het telbakje). Pipet-

teer dit onmiddellijk in een telbakje. Beweeg de zuiger een paar keer heen en weer zodat alle vloeistof uit de pipet is. Vul op deze wijze een tweede telbakje.

- 4 Laat de nematoden bezinken (5 minuten) en tel ze bij 25-50 x vergroting. Doe tenminste twee tellingen (bakjes)\*

\*De twee tellingen zullen zelden exact hetzelfde aantal opleveren. Wat is een nog aanvaardbaar verschil? Meestal wordt de volgende regel gehanteerd: indien de tellingen meer dan 5% afwijken van het gemiddelde van die tellingen dan is een derde telling noodzakelijk. Het eindresultaat is dan een gemiddelde van drie i.p.v. twee tellingen, tenzij er één zo sterk afwijkt (bijv. door een pipetteerfout) dat het legitiem lijkt deze telling buiten te sluiten en het gemiddelde te bepalen met de overige twee tellingen (waarop weer de bovengenoemde regel van toepassing is!). Southey (1986) stelt dat, als de suspensie homogeen is, de tellingen Poisson-verdeeld zijn en dus dat de minimum standaardafwijking die voor elke telling (x) geldt de grootte  $\sqrt{x}$  heeft. Bij aantallen onder de 100 is de bovengenoemde regel dus meestal niet haalbaar.

telling x	1	4	16	25	100	400
Minimum SD = $\sqrt{x}$	1	2	4	5	10	20

### 2.5.2. Schatten en tellen van de cystinhoud

#### Schatten

##### Benodigdheden

binoculair

2 objectglaasjes

fijn penseel (No. 0 of 1)

schoon water

eventueel: doordrukglasje (= pletvenster, cyst squasher)

##### Werkwijze

Breng met behulp van een penseel de (gedetermineerde) cysten op een objectglaasje, op redelijke afstand van elkaar en elk in een kleine druppel water. Leg hierop een tweede objectglaasje en wrijf deze licht heen en weer zodat de cysten openbarsten en de eieren en larven zichtbaar worden. In plaats van een tweede objectglaasje kan hiervoor ook een speciaal doordrukglasje (zie figuur) gebruikt worden. Schat onder de binoculair het aantal eieren en larven per cyst.

Het voordeel van schatten boven tellen is dat het een snelle methode is. Voor aantallen eieren en larven onder de 250 per cyst levert het schatten een redelijk betrouwbaar getal op. Bij hogere aantallen wordt de afwijking groter.

#### Tellen

##### Benodigdheden

Zie 2.5.1 (Tellen van suspensies), daarnaast:

wrijfbuis (cyst homogenizer (Huijsman 1957))

fijn penseel (No. 0 of 1)

sputfles met water

##### Werkwijze

Breng met behulp van een penseel één of meer cysten met een paar druppels water op de punt van de piston van de wrijfbuis. Plaats de piston in de buis en draai hem voorzichtig heen en

weer zodat de eieren en larven uit de barstende cysten vrijkomen. Spoel dit met behulp van de spuitfles over in een 100 ml bekerglas. Spoel de buis en de piston met ruim water na en vul het bekerglas verder aan tot 100 ml. Vul met deze suspensie twee telbakjes volgens de werkwijze onder 'Tellen van suspensies'. Tel bij 25-50 x vergroting het aantal eieren en larven. Tel lege eierschalen niet mee en doe de bepaling tenminste in duplo (zie 2.5.1)

### 2.5.3. Weergave van de aantallen

#### Per VOLUME:

$$N_{vol} = \left( \frac{v2}{v1} \times n1 \right) \times \frac{100}{v3} \quad \text{nematoden per 100 ml monster}$$

met n1= aantal nematoden in v1  
v1= volume (ml) getelde suspensie uit v2  
v2= volume (ml) totale suspensie uit geëxtraheerd monster  
v3= volume (ml) monste

#### Per NAT GEWICHT:

$$N_{ng} = \left( \frac{v2}{v1} \times n1 \right) \times \frac{100}{G} \quad \text{nematoden per 100 g nat monster}$$

met n1= aantal nematoden in v1  
v1= volume (ml) getelde suspensie uit v2  
v2= volume (ml) totale suspensie uit geëxtraheerd monster  
G=gewicht (g) monster

#### Per DROOG GEWICHT:

$$N_{dg} = N_{ng} \times \frac{1}{DS} \quad \text{nematoden per 100 g droog monster}$$

met N<sub>ng</sub>= aantal nematoden in 100 g nat monster, zie boven  
DS= droge stof fractie monster (= 1 - vochtfractie):

$$DS = \frac{w2 - p}{w1 - p}$$

met p= gewicht leeg potje  
w1= gewicht potje met grond, vóór drogen  
w2= gewicht potje met grond, ná drogen

Per OPPERVLAKTE gebied (N.B.: (monster)diepte variabel) :

$$N = \left( \frac{v2}{v1} \times n1 \right) \times \frac{10000}{opp} \text{ nematoden per m}^2$$

met  $n1$ = aantal nematoden in  $v1$

$v1$ = volume (ml) getelde suspensie uit  $v2$

$v2$ = volume (ml) totale suspensie uit geëxtraheerd monster

$opp$ = monsteroppervlakte ( $\text{cm}^2$ ) = oppervlakte van de boorsteken waarmee het monster is genomen (indien ander monstergereedschap is gebruikt formule aanpassen):

$$opp = ns \times (\pi \times (\frac{1}{2}d)^2)$$

met  $ns$ = aantal boorsteken

$d$ = boordiameter (cm)

*N.B.: Voor aantallen larven en eieren uit cysten kunnen de formules gebruikt worden met toevoeging van de term (totaal aantal cysten in monster) gedeeld door (aantal cysten waarmee de suspensie gemaakt is)*



## HOOFDSTUK 3. BEWERKEN

---

### 3.1. VISSEN

Om nematoden uit een suspensie te isoleren ('vissen') is een goede visnaald (hengel) een vereiste.

#### Visnaald

Een visnaald kan op verscheidene manieren gemaakt worden, bijvoorbeeld:

- Snijd met een scheermesje een fijne punt aan een bamboe splinter (onder een binoculair) en zet deze vast in een naaldhouder, OF:

- Selecteer een haar (wenkbrauwhaar of varkenshaar, de laatste is steviger maar splijt eerder), een fijn visgraatje, een stukje nylon uit een tandenborstel of een fijn metalen draadje. Bevestig dit met glyceel op een bamboehoutje ( $\pm 3$  cm) in een naaldhouder, of op het uiteinde van een prepareernaald. Snijd de punt eventueel nog schuin af onder een binoculair. Zacht materiaal (haar) geeft de minste kans op 'lek prikken' of breken van de nematoden maar is soms niet stevig genoeg voor het vissen van zware nematoden. Voor steriel werken, bijvoorbeeld bij het overzetten van nematoden op agarplaten (Hoofdstuk 4) is een visnaald met een metalen draadje noodzakelijk omdat deze 'gegloeid' kan worden. Het spatelvormige uiteinde van het snorhaar van een kat is geschikt voor het vissen van nematodeeieren.

Vissen gaat het gemakkelijkst uit het midden van een ondiep schaaltje, bij een lage vergroting. Breng de nematode met de naald naar het wateroppervlak (volg dit met de microscoop door bij te schroeven) en trek het dier in één beweging door de meniscus. Levende nematoden vissen is makkelijker dan dode, omdat ze om de naald krullen en er dan niet zo snel afglijden. Voor het vissen van cysten en andere gezwollen stadia wordt een (vochtig) fijn penseeltje (No. 00, 0 of 1) gebruikt. Hesling (1952) viste cysten uit debris met een aspirator (verbeterd door Bijloo 1954; zie Fig. 3.1).

### 3.2. CONCENTREREN

Om nematodensuspensies te concentreren, bijvoorbeeld tot een standaardvolume om te tellen, of tot enkele druppels voor fixatie, wordt gebruik gemaakt van de grootte of van de bezinkingssnelheid van de nematoden: overtollige vloeistof wordt verwijderd door de suspensie te zeven of, na bezinking, af te gieten (decanteren) of af te zuigen.

*Zeven:* De suspensie wordt gezeefd over een of meer fijne ( $\leq 45 \mu\text{m}$ ) zeven. De nematoden worden daarna met weinig water (bv. met behulp van een spuitflesje) van de zeven gespoeld en verzameld.

*Laten bezinken en daarna afgieten of afzuigen:* De tijd die nodig is om de suspensie goed te laten bezinken is o.a. afhankelijk van de hoeveelheid suspensie, de vorm van de beker of kom en de soort nematoden (vooral Dorylaimiden en Mononchiden blijven door hun vette cuticula nog weleens lang drijven). Naar gelang de gewenste nauwkeurigheid kan als bezinkingstijd één, tot 24 uur genomen worden. In plaats daarvan kan de suspensie ook gecentrifugeerd worden (3 minuten bij 1800 g). Over het algemeen verloopt afzuigen nauwkeuriger dan afgieten.

Het afgieten moet in één, rustige, beweging gebeuren om te voorkomen dat het bezinksel opwarrelt. Afzuigen kan met behulp van een (micro)pipet, een hevefles of waterstraalpomp. De opening daarvan wordt kleiner gekozen naarmate er een kleinere hoeveelheid vloeistof (nauwkeuriger) moet worden afgezogen.

#### Micropipet

Een micropipet kan worden gemaakt van een pasteurpipet door het dunne einde daarvan rond te draaien in een vlam en, zodra het glas zacht wordt, deze met een pincet uit te trekken tot een glasdraad. Het dichtgesmolten einde wordt met de pincet opengebroken.

Bij het afzuigen moet de punt van de pipet etc. net in het wateroppervlak gehouden worden en mag het bezinksel niet opwervelen. In kleine potjes kan de bezinking onder de binoculair gecontroleerd worden en gevolgd worden of bij het afzuigen geen nematoden verdwijnen. Bongers et al. (1989) gebruiken glazen trechttertjes waarvan de steel is verwijderd en het gat is dichtgesmolten. De nematoden bezinken in het puntje en de vloeistof kan met een micropipet worden afgezogen zonder het bezinksel te beroeren. Het trechttertje past onder een binoculair, wat controle van bezinking en afzuigen mogelijk maakt.

### **3.3. ANAESTHETISEREN**

Veel structuren zoals de oesophagus of de stekel zijn duidelijker te zien bij levende nematoden dan bij dode of gefixeerde beesten. Om de levende nematoden stil te laten liggen kunnen ze verdoofd worden, waarna observatie in een tijdelijk preparaat (zie 3.6.2) mogelijk is. Vis hiertoe de nematoden op een objectglas in een druppel:

- dichloro-diethyl-ether oplossing (van 2-10 druppels in 50 ml water, goed schudden) (Southey 1986), of
- 0.5-1% propyleen-phenoxetol oplossing (Ellenby & Smith 1964, Townshend 1984), of
- 0.01 M oplossing natriumazide (Nelson et al. 1983).

De nematoden komen weer bij als vers kraanwater wordt toegevoegd (duurt soms enkele uren).

### **3.4. DODEN EN FIXEREN**

Als een nematodensuspensie niet meteen kan worden geteld, opgestuurd moet worden naar een taxonoom, of ter voorbereiding op verdere conservering in preparaten etc., dan moeten de nematoden gedood en gefixeerd worden. Het resultaat (effect op verschillende lichaamsstructuren, houdbaarheid) is afhankelijk van de methode en géén van de bestaande technieken is voor alle nematoden even succesvol. De beste resultaten worden doorgaans behaald als de nematoden snel gedood (meestal d.m.v. verhitting tot 65-90°C) en onmiddellijk gefixeerd worden, welke stappen gecombineerd kunnen worden door gebruik van warm fixatief. Door de hitteschok nemen de nematoden een karakteristieke vorm aan die per soort kan verschillen, bv. kaarsrecht, C-vormig, of spiraalvormig. Onmiddellijk afkoelen is

nodig omdat te lange verhitting vervormingen kan veroorzaken.

Formaline (4-5%) is een van de meest gebruikte fixatievloeistoffen. Het werkt verhardend en veroorzaakt een licht krimpen van de nematoden. Combinaties met stoffen met een tegenovergesteld effect, zoals azijnzuur en propionzuur, worden toegepast om deze krimpemde werking zoveel mogelijk op te heffen (3.4.2).

### 3.4.1. Massafixatie

Bij deze methode voor de fixatie van nematodensuspensies vinden doding en fixatie tegelijk plaats door gebruik van warm fixatief. De techniek is een afgeleide van de Seinhorst (1966, 1973) methode voor fixatie van individuele nematoden.

#### Benodigdheden

afsluitbaar buisje (inh. 10 ml)  
reageerbuis in bekerglas met water  
pipet, waterstraalpompe of hevefles  
micropipet  
formaline 4% in spuitfles

#### Werkwijze

- 1 Laat de nematodesuspensie tenminste 24 uur bezinken (of korter als een lagere betrouwbaarheid aanvaardbaar is). Zuig de bovenstaande vloeistof voorzichtig af tot er  $\pm$  10 ml over is.

Afzuigen kan plaatsvinden met een pipet, een hevefles of een waterstraalpompe. Zorg dat de punt van de pipet etc. niet in het wateroppervlakte gehouden wordt en let op dat het bezinksel niet opwerfelt (zie 3.2).

- 2 Schud de overgebleven suspensie en giet deze over in een buisje (inh. 10 ml). Laat dit tenminste 1 uur bezinken.
- 3 Zuig dan de vloeistof zo ver, en zo voorzichtig mogelijk af m.b.v. een micropipet (zie 3.2) onder de binoculair zodat gecontroleerd kan worden of er nematoden worden opgezogen. Voor optimale doding en fixatie moet er zo weinig mogelijk water achterblijven.
- 4 Verhit een paar ml formaline 4% (of formaline/ propionzuur mengsel 4:1, zie 3.4.2) in een reageerbuis in een bekerglas met water, tot er belletjes opstijgen (90°C). **Doe dit in een zuurkast of op een goed geventileerde plaats, formaline is schadelijk voor de gezondheid!**
- 5 Giet het hete fixatief op de nematoden en koel meteen af (om vervorming van de nematoden te voorkomen) door er koude formaline 4% bij te schenken en/of door het buisje in koud water te dompelen. Sluit het buisje goed af om verdamping van de vloeistof tegen te gaan.

Netscher (1971) vermeed de tijdrovende fase van bezinken en

afzuigen tot een druppel water, door de suspensie te concentreren op een vacuümfilter. Zodra het filter droog viel werd hete F.P. 4:1 toegevoegd. Na affiltreren van de F.P. 4:1 kon het filter met formaline worden afgespoeld in een flesje.

### 3.4.2. Recepten voor fixatieven

**SOMMIGE FIXATIEVEN (m.n. FORMALINE) ZIJN SCHADELIJK VOOR DE GEZONDHEID! WERK DUS IN EEN ZUURKAST!**

#### Formaline 4%

formaline (= 37% formaldehyde)	10.8 ml
gedest. water	89.2 ml

Bij sommige soorten leidt fixatie met formaline tot een korrelige lichaamsstructuur. Waarschijnlijk komt dit door de vorming van 'free formic acid' wat voorkomen kan worden door de toevoeging van een beetje calciumcarbonaat bij de stockoplossing (Baker 1945).

#### F.A. 4:1 of F.A. 4:10

formaline (= 37% formaldehyde)	10.8 ml
ijsazijnzuur	1 of 10 ml
gedest. water	aanvullen tot 100 ml

Aziijnzuur heft de krimpde werking van formaline op. Het nadeel van de mengsels (vooral 4:10) is dat de nematoden bruin worden en het achterste deel van de stekel vervaagt.

#### F.P. 4:1

formaline (= 37% formaldehyde)	10.8 ml
propionzuur	1 ml
gedest. water	88.2 ml

Propionzuur heft de krimpde werking van formaline op en werkt licht contrastverhogend. F.P. is geschikt voor jarenlange fixatie, alhoewel Netscher en Seinhorst (1969) de voorkeur geven aan fixatie in alleen formaline 4%, na doding met warme F.P. (of F.A.).

#### F.G. 4:1

formaline = 37% formaldehyde	8.5 ml
glycerine	2 ml
gedest. water	89.5 ml

Nematoden komen via dit fixatief (De Grisse 1969) direct in de glycerine indien de andere componenten van de vloeistof verdampen. Als de verdamping ongewenst optreedt (bv. bij een slecht afgesloten potje) drogen de nematoden door de glycerine in elk geval niet uit.

#### T.A.F.

formaline (= 37% formaldehyde)	7.6 ml
triethylamine	2 ml
gedest. water	90.4 ml

Fixatie in T.A.F. (Courtney et al. 1955) geeft goede resultaten, maar Hooper et al. (1983) vonden bij sommige nematoden dat na 20 jaar de cuticula was gedegenereerd, zodat T.A.F. in Southey (1986) niet als 'long term' fixatief wordt aanbevolen.

### F.A.A. (Ditlevsen's)

formaline (= 37% formaldehyde)	6.5 ml
ethanol 96%	20 ml
ijsazijnzuur	1 ml
gedest. water	39.5 ml

Door de alcohol heeft F.A.A. een dehydrerende, en dus krimpde werking. Dit kan nuttig zijn om bv. de annulatie of natuurlijke inkepingen beter zichtbaar te maken (Southey 1986).

### **3.5. OVERBRENGEN NAAR GLYCERINE**

In gefixeerde nematoden wordt de darmstructuur vaak korrelig. Door ze over te brengen naar glycerine treedt een verheldering op waardoor o.a. de gonaden weer duidelijk zichtbaar worden (lichtbrekende structuren zoals de stekel vervagen echter). Glycerine is tevens een duurzaam medium, geschikt voor het insluiten van permanente preparaten.

Juist gefixeerde, nog niet uitgeharde, nematoden kunnen niet rechtstreeks in de glycerine worden gebracht omdat ze door de hogere osmotische waarde zullen verschrompelen. Bij de glycerine-ethanol methode (Seinhorst 1959) worden de nematoden stapsgewijs gedehydrerd en met glycerine geïnfilteerd d.m.v. twee oplossingen (S.1 en S.2). Bij de glycerine-formaline methode (Bongers 1993) blijven de nematoden eerst 6 weken in de formaline om uit te harden waarna pure glycerine tot een verhouding glycerine-formaline 1:1 wordt toegevoegd. De eerste methode kost veel tijd en wordt gebruikt voor het overbrengen van individuele nematoden voor permanente preparaten. De tweede methode wordt vooral toegepast voor het overbrengen van een hoeveelheid nematoden tegelijk, voor massapreparaten (3.6.3.2). Voorlopige resultaten wijzen erop dat deze directe methode goede beelden oplevert maar de houdbaarheid op lange termijn is nog niet bekend.

#### **3.5.1. Glycerine-ethanol methode**

##### ***Benodigdheden***

stoof (40°C)  
exsicator  
glazen putje en petrischaal  
micropipet, visnaald  
S.1 (20 ml ethanol 96%, 1 ml glycerine, 79 ml gedest.  
water)  
S.2 (93 ml ethanol 96%, 7 ml glycerine)  
ethanol 96%  
watervrije glycerine  
silicagel

##### ***Werkwijze***

- 1 Fixeer de nematoden volgens de Seinhorst methode (zie 3.4.1) en laat de nematoden 1-2 weken uitharden.
- 2 Vis de nematoden over naar een putje en voeg S.1 toe. Zet het putje in een exsicator (of een ander goed afsluitbaar

vat, bv. een plastic doos) waarin een laagje ethanol 96% is aangebracht. Plaats het geheel in de stoof (40°C).

Door de ethanol en de hoge temperatuur vormt zich een verzadigde alcohol damp waardoor de alcoholconcentratie in het putje oploopt en de nematoden dehydreren. In stap 3 (met S.2) verdampt de alcohol en blijven de nematoden in de glycerine achter.

- 3 Zuig de S.1 na 16-24 uur onder de binoculair af met een micropipet en voeg S.2 toe. Zet het putje terug in de stoof in een gesloten petrischaal. Voeg na 2 uur, 2 druppels water vrije glycerine toe.
- 4 Als de alcohol verdampt is (na 16-24 uur) worden de laatste sporen water verwijderd door het putje een paar dagen in de exsicator te houden met daarin silicagel of een ander droogmiddel (bv. calcium-chloride).

**N.B.:** De methode kan ook worden gebruikt voor het overbrengen van massa's, door de S.1 en S.2 aan geconcentreerde suspensies toe te voegen. De volgende methode is echter veel sneller:

### 3.5.2. Glycerine-formaline methode

#### *Benodigdheden*

micropipet  
pasteurpipet met afgebroken punt  
water vrije glycerine

- 1 Fixeer de nematoden volgens de Seinhorst methode (zie 3.4.1) en laat de nematoden 6 weken uitharden.
- 2 Zuig de formaline af tot  $\pm 1$  ml en voeg met een pasteurpipet waarvan de punt is afgebroken een paar druppels glycerine aan het buisje toe. Na twee dagen kunnen de nematoden in een (massa-)preparaat worden gebracht.

### 3.6. IN PREPARAAT BRENGEN

#### 3.6.1. Materialen

Nematodepreparaten worden op gewone objectglazen of in Cobb's preparaathouders (voor Cobb's preparaten, de 'aluminium double coverglass slides') gemaakt. De eerste zijn goedkoper en worden vooral toegepast voor tijdelijke preparaten. Permanente preparaten worden in Cobb's preparaathouders gemaakt. Het voordeel daarvan is dat de preparaten aan beide zijden bekeken kunnen worden. Omdat het glas tussen dikkere kartonnetjes is ingeklemd breekt het glas als het preparaat mocht vallen niet zo snel en kunnen ze gestapeld worden zonder dat de glazen delen van de preparaten elkaar raken. Voor routineanalyse van nematodengemeenschappen wordt meestal gebruik gemaakt van massapreparaten, waarbij honderden nematoden op één groot (76

x 50 mm) objectglas ingesloten worden (Bongers et al. 1989). Om te voorkomen dat de nematoden door het dekglas worden platgedrukt en dat de preparaten uitdrogen moet het dekglas ondersteund en het preparaat afgesloten worden (Tabel 3.1). De paraffine-ring dient beide functies tegelijk en heeft als voordeel dat de nematode in een klein veld wordt ingesloten (dus makkelijk is te vinden) en dat het preparaat er steviger van wordt. Het resultaat is duurzaam en de methode kost weinig tijd. Het preparaat is wel temperatuurgevoelig i.v.m. het relatief lage smeltpunt van paraffine (52-64°C). De preparaten voor de collectie van de vakgroep worden tegenwoordig allemaal met de paraffine-ring gemaakt.

Een andere methode voor permanente preparaten is die waarbij het dekglas met stukjes glaswol (Tabel 3.1) wordt ondersteund en het preparaat wordt afgesloten met glyceel. Het resultaat is duurzaam maar de methode is arbeidsintensief.

**Tabel 3.1** Verschillende materialen voor het ondersteunen van het dekglas en het afsluiten van het preparaat.

DOEL	MIDDEL	opmerkingen	Duurzaamheid <sup>(1)</sup>
dekglas ondersteunen	Paraffine-ring	Dient na smelten en stollen tevens als afsluiting van het preparaat; Pas de dikte van de ring aan aan de dikte van de nematode(n)	+++
	Stukjes glaswol	Selecteer diameter overeenkomstig de dikte van de nematode(n); Rangschik de stukjes radiaal (Fig. 3.2)	+++
	Stukjes dekglas	Bij hele dikke nematoden (bv mermitiden)	+++
	Glyceel- (nagellak, etc) ring	Maak deze op een draaitafel	+++
preparaat afsluiten	Kaarsvet	Gebruik een juist gedoofde kaars met de lont als penseel	-
	Nagellak	Lost op in aceton	+
	Paraffine-ring	Laat de paraffine smelten (verwarmingsplaat, vlam) en weer stollen	++(+) <sup>(2)</sup>
	Glyceel	Lost op in alcohol en butyl-acetaat <sup>(3)</sup> ; Maak penseel schoon met alcohol	+++ <sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Duurzaamheid heeft betrekking op o.a. twee aspecten: het dekglas wordt voldoende ondersteund zodat de nematoden niet platgedrukt worden, en het preparaat is goed afgesloten zodat het niet kan uitdrogen, ook niet na tientallen jaren.

<sup>(2)</sup> De duurzaamheid wordt verder vergroot door het dekglas met glyceel te ringen.

<sup>(3)</sup> Breng tenminste 2 lagen aan (tenzij de glyceel dik is).

<sup>(4)</sup> Houd hier rekening mee als het preparaat, bijvoorbeeld na gebruik van immersie-olie, moet worden schoongemaakt! Doe dit bij voorkeur door met een droge tissue de olie zoveel mogelijk op te nemen en het preparaat daarna met een nieuwe tissue voorzichtig op te wrijven. Als hier alcohol (70%) bij nodig is moet de glyceelring zoveel mogelijk ontzien worden.



### 3.6.2. Tijdelijke preparaten

#### 3.6.2.1. Waterpreparaat

Levende nematoden kunnen snel geïdentificeerd en bestudeerd worden in een waterpreparaat. Hierin zijn een aantal structuren zoals stekel, lumen van de oesophagus en excretiepoort beter te zien dan bij dode en gefixeerde nematoden. Waterpreparaten worden meestal op gewone objectglazen gemaakt, met een paraffine-ringetje (zie 3.6.3.1), of met nagellak of kaarsvet.

#### *Benodigdheden*

schoon object- en dekglas  
visnaald, pincet  
filtreerpapier  
nagellak of kaarsje

#### *Werkwijze*

- 1 Breng op een objectglas een kleine druppel water.

Esser & MacGowen (1973) behandelen de objectglazen met 'Siliclad', een siliconenpasta, waardoor de druppel bol blijft. Het water verdampt dan minder snel en de kans op luchtbelletjes als het dekglas wordt aangebracht is kleiner.

- 2 Plaats de nematode(n) met behulp van een visnaald in het midden van de druppel. Zorg dat ze op de bodem komen te liggen en niet op de druppel drijven.

Als de nematoden teveel bewegen kunnen ze geanaesthetiseerd worden (zie 3.3) of gedood door het objectglas 1 à 2 seconden te verhitten boven een vlam of op een verwarmingsplaat (60°C). Op de verwarmingsplaat verloopt de doding het beste (weinig kans op oververhitting of dat de nematode juist nog leeft) maar de plaat moet wel een kwartier van tevoren zijn aangezet.

- 3 Breng met een pincet het dekglas aan. Verwijder overtollig water met filtreerpapier en verzegel het dekglas met nagellak of kaarsvet (eerst op drie punten vast zetten en dan ringen). Laat de ring goed drogen (10 minuten) alvorens het preparaat onder de microscoop te bekijken.

#### 3.6.2.2. Lactofenolpreparaat

Deze preparaten zijn veel langer houdbaar dan waterpreparaten. Ze worden vooral toegepast bij de insluiting van perineaal patronen (zie 3.6.3.3) maar soms ook voor het insluiten van hele nematoden. Bij de laatste kan al na enkele weken verving van bepaalde structuren optreden en wordt voor lang houdbare preparaten meestal glycerine gebruikt. Soms is het echter handig om snel een redelijk houdbaar preparaat te hebben: het overbrengen van gefixeerde nematoden naar lactofenol is, in tegenstelling tot het overbrengen naar glycerine, zó gebeurd. Breng hiertoe de gefixeerde nematoden over naar een druppel warme lactofenol op een objectglas en laat dit een half uur op een verwarmingsplaat (30°C) liggen. Maak een preparaat zoals beschreven onder 3.6.3.1 (met lactofenol).  
**Fenol is schadelijk, werk in een zuurkast!**

### 3.6.3. Permanente preparaten

#### 3.6.3.1. Glycerinepreparaat

Preparaten met glycerine kunnen met recht 'permanent' genoemd worden: mits goed afgesloten zijn ze onbeperkt houdbaar. Ze worden meestal in Cobb's preparaathouders gemaakt. Voor het ondersteunen van het dekglas kunnen verschillende materialen worden gebruikt, zoals een paraffine-ring (a) of glaswol (b).

#### *Benodigdheden*

- Cobb's preparaat: aluminium houder  
vierkant dekglas (25 x 25 mm) No. 1  
rond dekglas (Ø 18 mm) No. 1  
twee stukjes karton (25 x 25 mm)
- pincet, visnaald  
penseel (No. 1)  
watten  
watervrije glycerine  
ethanol 96%  
glyceel
- (a) verwarmingsplaat  
(spiritus)brander  
stempel (koperen buisje, int. Ø 10 mm, ext. Ø 12 mm)  
petrischaal met paraffine  
prepareernaald met afgeplatte en geslepen punt  
wasbenzine
- (b) glaswol  
filtreerpapier

#### *Werkwijze (a) (paraffine-ring)*

- 1 Fixeer de nematoden en breng ze over naar glycerine (zie 3.4.1 en 3.5.1).
- 2 Leg een vierkant dekglas in een Cobb's preparaathouder. Verhit de stempel in de vlam, druk hem licht op de paraffine en stempel een ringetje op het glas.
- 3 Plaats in het midden van het ringetje een kleine druppel watervrije glycerine. Breng de nematode(n) met behulp van de visnaald op de bodem van de druppel.
- 4 Breng met de pincet een (warm) dekglas aan. Leg het preparaat op de verwarmingsplaat (65°C) tot de paraffine smelt. Druk het dekglas licht aan met de pincet en laat het preparaat op tafel afkoelen zodat de paraffine stolt.
- 5 Schraap overtollige paraffine weg met een afgeplatte prepareernaald en maak de randen schoon met wasbenzine en daarna ethanol (gebruik hierbij een stukje watten, gewonnen om een pincetpunt). Leg kartonnetjes aan weersijden van het glas.

- 6 Ring het dekglas met glyceel. De glyceel moet een nacht drogen voordat het preparaat bekeken kan worden. Vouw de randen van de preparaathouder dicht en schrijf gegevens met watervaste inkt op de kartonnetjes.

#### **Werkwijze (b) (glaswol)**

- 1 Fixeer de nematoden en breng ze over naar glycerine (zie 3.4.1 en 3.5.1).
- 2 Leg een vierkant dekglas tussen twee kartonnetjes in een Cobb's preparaathouder. Plaats op het dekglas een druppel watervrije glycerine en breng de nematode(n) met behulp van de visnaald op de bodem van de druppel.
- 3 Rangschik 3 stukjes glaswol (lengte elk  $\pm$  1 mm, selecteer diameter overeenkomstig de dikte van de nematoden) op de bodem van de druppel (Fig. 3.2). Breng met een pincet een (warm) dekglas aan. Verwijder overtollige glycerine met filtreerpapier en daarna ethanol (gebruik hierbij een stukje watten, gewonden om een pincetpunt).
- 4 Zet het dekglas op drie plaatsen vast met glyceel en ring het daarna met 1-2 lagen (draaitafel). De glyceel moet een nacht drogen voordat het preparaat bekeken kan worden. Vouw de randen van de houder dicht en schrijf gegevens met watervaste inkt op de kartonnetjes.

#### **3.6.3.2. Massapreparaat**

##### **Benodigdheden**

verwarmingsplaat  
(spiritus)brander  
petrischaal met paraffine  
vierkante paraffinestempel (45 x 45 mm)  
objectglas 76 x 50 mm  
dekglas 45 x 45 mm, No. 1  
pasteurpipet, pincet  
(penseel No. 1)  
(glyceel)

##### **Werkwijze**

- 1 Fixeer de nematoden en breng ze na 6 weken over naar glycerine-formaline (zie 3.4.1 en 3.5.2). Laat de nematoden hierin 2 dagen staan.
- 2 Verhit de stempel in de vlam, druk hem licht op de paraffine en stempel een vierkant op het objectglas.
- 3 Zuig met een pasteurpipet voorzichtig de bezonken nematoden van de bodem van het buisje en pipetteer hiervan 3 druppels in het midden van het paraffine-vierkant.

- 4 Breng met een pincet een dekglas aan. Leg het preparaat even op een verwarmingsplaat (65°C) tot de paraffine smelt. Druk het dekglas licht aan met de pincet en laat het preparaat op tafel afkoelen zodat de paraffine stolt.
- 5 Verzegel het dekglas eventueel met glyceel. De glyceel moet een nacht drogen voordat het preparaat bekeken kan worden. Merk het preparaat met een glasstift of etiketje.

### 3.6.3.3. Preparaat van perineaal patroon

Identificatie van *Meloidogyne* sp. vindt mede plaats aan de hand van de cuticulaire patronen rond anus en vulva (perineaal patroon). Dit preparaat wordt in lactofenol-katoenblauw ingesloten. **Fenol is schadelijk, werk in een zuurkast!**

#### **Benodigdheden**

verwarmingsplaat  
 (spiritus)brander  
 stempel (koperen buisje, int.  $\varnothing$  10 mm, ext.  $\varnothing$  12 mm)  
 petrischaal met paraffine  
 putje met lactofenol-0.03% katoenblauw  
 prepareernaalden en pincet  
 scalpel, penseel (No. 1), (zachte) visnaald  
 prepareernaald met afgeplatte en geslepen punt  
 Cobb's preparaat (onderdelen zie 3.6.3.1)  
 stukje perspex (snijplaatje)  
 watten  
 ethanol 96%  
 glyceel, wasbenzine

#### **Werkwijze**

- 1 Spoel wortels met gallen voorzichtig schoon en prepareer hieruit de *Meloidogyne* vrouwtjes (of: mix de wortels in water in een bekermixer (5 sec) en vis de vrouwtjes uit de suspensie). Prik de nematoden aan de kopzijde open en druk de lichaamsinhoud naar buiten zodat de kleurstof van twee zijden kan binnendringen. Vis de vrouwtjes in het putje lactofenol-katoenblauw en laat dit 24 uur staan.
- 3 Breng een nematode in een druppel lactofenol-katoenblauw op een stukje perspex en snijd onder de binoculair de achterzijde eraf. Snijd dit bij tot een vierkant stukje huid met in het midden de vulva en anus (donker gekleurd) Verwijder met een visnaald de restjes lichaamsinhoud.
- 4 Stempel een ringetje paraffine op een vierkant dekglas in een houder (zie 3.6.3.1), leg een druppel lactofenol-katoenblauw in het midden en op de bodem daarvan het stukje huid met de buitenzijde naar boven.
- 5 Breng met de pincet een dekglas aan. Leg het preparaat op de verwarmingsplaat (65°C) tot de paraffine smelt. Druk

het dekglas heel licht aan met de pincet en laat het preparaat op tafel afkoelen zodat de paraffine stolt.

- 6 Schraap overtollige paraffine weg met een afgeplatte prepareernaald en maak de randen schoon met wasbenzine en daarna ethanol (gebruik een stukje watten, gewonden om een pincetpunt). Leg kartonnetjes aan weerszijden van het dekglas, ring het met glyceel en klem de houder dicht. De glyceel moet een nacht drogen voordat het preparaat bekeken kan worden.

*Literatuur:* s'Jacob & van Bezooijen 1984, Southey 1986

#### **3.6.3.4. Preparaat van vulvakegel**

De identificatie van cystnematoden is, naast de vorm en kleur van de cyst, gebaseerd op de bouw van de vulva, fenestra en omringende interne en externe structuren. Omdat de cuticula van de gedroogde cyst al hard is kan de vulvakegel direct in de glycerine worden gebracht.

#### **Benodigdheden**

verwarmingsplaat  
(spiritus)brander  
stempel (koperen buisje, int.  $\varnothing$  10 mm, ext.  $\varnothing$  12 mm)  
petrischaal met paraffine  
prepareernaalden en pincet  
scalpel, penseel (No. 1), visnaald  
prepareernaald met afgeplatte en geslepen punt  
Cobb's preparaat (onderdelen zie 3.6.3.1)  
stukje perspex (snijplaatje)  
watten  
watervrije glycerine  
ethanol 96%  
glyceel, wasbenzine

#### **Werkwijze**

- 1 Spoel de cysten uit de grond (2.4) en laat ze goed drogen
- 2 Breng een cyst in een druppel watervrije glycerine op een stukje perspex en snijd onder de binoculair de achterkant af. Snijd de achterzijde bij tot een (vierkant) stukje huid met in het midden de vulva en fenestra. Verwijder met een (zachte) visnaald de restjes lichaamsinhoud.
- 3 Stempel een ringetje paraffine op een vierkant dekglas in een houder (zie 3.6.3.1; het paraffine-ringetje moet iets dikker worden aangebracht omdat de vulvakegel vrij hoog is). Leg een druppel watervrije glycerine in het midden en op de bodem daarvan het stukje huid met de buitenzijde van de huid naar boven.

- 4 Breng met een pincet een dekglas aan. Leg het preparaat op de verwarmingsplaat (65°C) tot de paraffine smelt. Druk het dekglas heel licht aan met de pincet en laat het preparaat op tafel afkoelen zodat de paraffine stolt.
- 5 Schraap overtollige paraffine weg met een afgeplatte prepareernaald en maak de randen schoon met wasbenzine en daarna ethanol (gebruik een stukje watten, gewonden om een pincetpunt). Leg kartonnetjes aan weerszijden van het dekglas, ring het met glyceel en klem de houder dicht. De glyceel moet een nacht drogen voordat het preparaat bekeken kan worden.

**Bron:** H.H.B. van Megen (mond. meded.)

**Verder lezen:** s'Jacob & van Bezooijen 1984: gebruiken verse (uit de wortel geprepareerde) cysten, die eerst gefixeerd en gekleurd (eosine) worden.

### 3.6.3.5. Preparaat van kop en doorsneden

In dit preparaat kan de kop van een nematode van bovenaf bestudeerd worden. De methode kan ook worden toegepast voor andere doorsneden.

#### **Benodigdheden**

(spiritus)brander

draaitafel

objectglas

Cobb's preparaat (onderdelen zie 3.6.3.1)

prepareernaalden en pincet

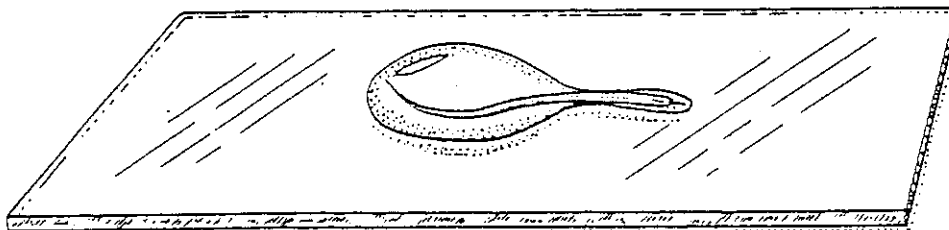
scalpel, penseel (No. 1), visnaald

glaswol of penseelhaar

glyceel

glycerine-gelatine

Week 20 g gelatine in 40 ml water gedurende 2 uur. Voeg dan 50 ml glycerine en 1 ml fenol (giftig, werk in zuurkast!) toe. Verwarm het mengsel in een waterbad gedurende 15 minuten en roer het tot een homogene oplossing (Southey 1986).



**Figuur 13**  
**Glycerine-gelatine druppel met nematode voor bereiding van kop-en dwarsdoorsneden**

### **Werkwijze**

- 1 Smelt een druppel glycerine-gelatine op een objectglas boven de vlam. Trek de druppel naar één kant uit met een prepareernaald en breng daarin een nematode (gefixeerd en overgebracht naar glycerine), met de kop in dezelfde richting als waarin de druppel is uitgetrokken (zie Fig. 13). Laat de gelei hard worden.
- 2 Snijd de kop (neem als lengte 1-3 kopbreedtes) zo haaks mogelijk af. Breng de kop met een visnaald over naar een druppel gesmolten glycerine-gelatine op een vierkant dekglas in een Cobb's preparaathouder.
- 3 Selecteer 3 stukjes glaswol of penseelhaar met een diameter gelijk aan de hoogte van de kopsectie en rangschik ze in de druppel (Fig. 13). Zet nu de kop voorzichtig recht op, met de lippen naar boven. Laat de gelei hard worden.
- 4 Breng met een pincet een dekglas aan. Leg het preparaat onder de microscoop (lage vergroting) en verschuif indien nodig het dekglas tot de kop helemaal rechtop staat. Raak met een warme prepareernaald het dekglas boven de kopsectie aan zodat de gelei smelt en het dekglas op het glaswol of penseelhaar komt te rusten.
- 5 Zet het dekglas op drie plaatsen vast met glyceel en controleer nog eens of de kop nog rechtop staat. Wacht een half uur en ring dan het dekglas op een draaitafel met 1-2 lagen glyceel. De glyceel moet een nacht drogen voordat het preparaat bekeken kan worden.

**Literatuur:** s'Jacob & van Bezooijen 1984

**Verder lezen:** Southey 1986 (pags. 78-79)

### 3.6.3.6. Perspex preparaat voor cysten

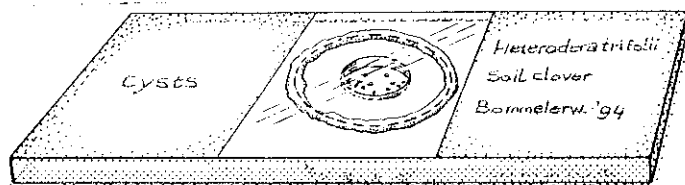
#### Benodigdheden

draaitafel  
stukje perspex (76 x 25 x 3 mm) waarin met een 8 mm vlak-  
bodemboor een ronde, vlakke holte van max. 2 mm diep  
is gemaakt, of een objectglas met uitsparing  
rond dekglas (Ø 19 mm)  
penseel (No. 1)  
fijn schuurpapier (P250)  
watten  
aceton  
glyceel  
blanke vernis

#### Werkwijze

- 1 Breng met de penseel 15-20 goed droge cysten in de uitsparing van het stukje perspex of objectglas.
- 2 Breng het dekglas aan. Zet het op drie plaatsen vast met glyceel (gebruik kleine stipjes, anders loopt de lijm onder het dekglas, op de cysten) en ring het daarna op de draaitafel. Laat het preparaat drogen.
- 3 Bij het perspex preparaat kunnen de vlakken aan weerszijden van de uitsparing met fijn schuurpapier worden bewerkt en daarna schoongemaakt met watten en aceton, zodat er met watervaste inkt op geschreven kan worden. Dek het label eventueel af met blanke vernis.

**Literatuur:** s'Jacob & van Bezooijen 1984



#### Perspex preparaat met cysten



### 3.7. KLEUREN VAN WORTELMATERIAAL

Bij directe observatie van wortelmateriaal onder de microscoop kan kleuring het opsporen van een eventuele nematodeninfectie vergemakkelijken. Hiervoor worden kleurstoffen gebruikt die wel aan de nematoden hechten maar niet of nauwelijks aan het planteweefsel, zoals katoenblauw, zuur fuchsine en jodium.

#### 3.7.1. Kleuren in lactofenol-katoenblauw

**Fenol is schadelijk: werk in een zuurkast!**

Deze methode wordt, ondanks de onaangenaamheid van werken met lactofenol, het meest gebruikt. De resultaten zijn goed en de uit de wortels geprepareerde nematoden zijn meestal in een conditie die identificatie onder hoge vergroting toestaat (Southey 1986). De nematoden worden blauw gekleurd (of rood als 'acid fuchsin' is gebruikt) en het planteweefsel blijft min of meer helder, behalve de meristematische zones.

#### *Benodigdheden*

bekerglas  
2 petrischaaltjes  
schaar of mes  
pincet  
lactofenol-0.1% katoenblauw (of -0.1% 'zuur fuchsine')  
lactofenol  
glycerine-water 1:1  
water

#### Recept lacotpfenol:

Vloeibare fenol	94 ml.
Melkzuur	83 ml.
Glycerine	160 ml.
Gedest. water	100 ml.

Bewaar de vloeistof in een donkere fles en/of in een donkere omgeving. In het licht wordt de vloeistof snel geel van kleur.

#### *Werkwijze*

- 1 Spoel de wortels voorzichtig schoon en knip de fijne worteltjes (met symptomen zoals knobbels of lesies) eraf.
- 2 Breng deze worteltjes met de pincet in warme (80°C) lactofenol-katoenblauw en laat ze daarin 1-3 minuten staan zodat de kleurstof het materiaal kan binnendringen.  
*OF: ('koude kleuring')*  
Breng de worteltjes met de pincet in lactofenol-katoenblauw en laat ze daarin 12 uur tot enkele maanden staan (dit is mogelijk omdat lactofenol ook fixeert).
- 3 Spoel de overmaat kleurstof af met water en breng het materiaal over naar pure lactofenol. De kleurstof trekt

dan uit het planteweefsel, maar niet uit de nematoden. Laat dit minimaal 15 minuten staan; voor optimaal contrast wordt 24 uur aanbevolen.

- 4 Bekijk de worteltjes onder de binoculair, in een petri-schaal met glycerine-water 1:1. Dit mengsel heeft dezelfde brekingsindex als lactofenol, maar niet de giftigheid en de onaangename lucht daarvan. Glycerine-water is een niet houdbare vloeistof. De preparaten worden na observatie weggegooid. Moet het materiaal bewaard blijven dan kan teruggegaan worden naar de pure lacofenol oplossing.

**Literatuur:** Bridge et al. 1982, s'Jacob & van Bezooijen 1984, Southey 1986

### 3.7.2. Kleuren in Lugol's oplossing

Deze methode wordt vooral gebruikt voor de detectie van *Globo-dera/Heterodera* stadia in dunne wortels. De nematoden worden donkerbruin gekleurd en het planteweefsel blijft helder, behalve de meristematische zones.

#### **Benodigdheden**

bekerglas

petrischaaltje

schaar of mes

pincet

Lugol's oplossing:

jodium 1 deel

kaliumjodide 2 delen

gedest. water 200 delen

water

#### **Werkwijze**

- 1 Spoel de wortels voorzichtig schoon en knip de fijne worteltjes (met symptomen zoals knobbels of lesies) eraf.
- 2 Breng deze worteltjes met de pincet in de Lugol's oplossing en laat ze daarin 15 minuten staan.
- 3 Bekijk de worteltjes onder de binoculair, in een petrischaal met water. N.B.: De tijd hiervoor is beperkt omdat de kleurstof spoedig verdunt ( $\pm$  15 min.).

**Literatuur:** s'Jacob & van Bezooijen 1984

### 3.8 HISTOLOGIE

Snijden met de microtoom

Goede handgesneden secties van ziek plantenmateriaal kunnen veel informatie geven. Is het materiaal moeilijk met de hand te snijden of is het nodig om series preparaten klaar te maken dan is inbedden in parafine een goede methode. Met de microtoom kunnen dan secties worden gemaakt op gewenste dikte, maar die ook in juiste volgorde te bekijken zijn.

#### 3.8.1. Klaarmaken van plantenmateriaal voor microtoomsnijden

##### *Benodigdheden*

ziek plant materiaal, zo mogelijk kleine stukjes. Max 0,5 cm. Klein en dun geeft de beste resultaten.  
glazen buisjes, inhoud ongeveer 10 ml  
"Au Bain Marie" opstelling  
F.P. 4:1 of F.A. 4:1 (zie 3.4.2.)  
formaline 4% (zie 3.4.2.)  
Bouin's fixatief (zie recept pag 75)  
vacuum excicator  
ethanol 50%, 60%, 70%, 80%, 90% en 96%  
methylbenzoaat  
methylbenzoaat met 2% celloidine  
tolueen  
parafine (b.v met smeltpunt 56°C)  
porceleinen inbedschaaltjes  
verwarmingstafel

##### *Werkwijze*

Denk aan de dampende vloeistoffen en werk in de zuurkast of op een afgezogen werkplek.

- 1 Doodt de kleine stukjes van het zieke plantmateriaal in een glazen buisje met 1,5-2 cc F.P. 4:1 opgewarmd tot ongeveer 90°C in de "Au Bain Marie" opstelling. Overgiet het materiaal met de warme vloeistof en koel direct daarna met 4-8 cc koude Formaline 4%.
- 2 De vloeistof kan direct worden afgegoten in een afvalvatje. Het materiaal wordt daarna overgoten met Bouin's fixatief.
- 3 Plaats het materiaal in een vacuum excicator met 25-30 cm onderdruk gedurende 30 minuten
- 4 Dehydratie vindt plaats door het materiaal te overgieten met ethanol in steeds stijgende concentraties.  
Ethanol 50%, drie keer gedurende steeds 30 minuten de gele kleur van het fixatief verdwijnt

Ethanol 60%, gedurende 30 minuten  
Ethanol 70%, gedurende tenminste 3 uur deze  
periode mag ook langer duren, b.v. laten  
staan tot de andere dag  
Ethanol 80%, gedurende 30 minuten  
Ethanol 90%, gedurende 30 minuten  
Ethanol 96%, twee keer gedurende 15 minuten

- 5 Clearing vindt plaats door het materiaal op een niet vezelig filtreepapier te drogen en direct daarna over te brengen in Methylbenzoate in een schoon en droog nieuw flesje. Het materiaal zal eerst drijven, maar na 10-60 minuten een glasachtig aanzien krijgen en zinken naar de bodem.
  - 6 Na afgieten kan het plantmateriaal overgoten worden met Methylbenzoate 2% celloidine, hierin blijft het materiaal tenminste 3 dagen.
  - 7 Breng het materiaal voorzichtig met een pincet over naar een nieuw buisje met toluen en ververs de vloeistof twee keer na telkens 10 minuten.
  - 8 Breng het materiaal over naar een schaalte met gesmolten verwarmde parafine. Laat het materiaal hierin 15 minuten staan.
- Gebruik hiervoor dezelfde soort parafine als waarin de uiteindelijke inbedding zal plaats vinden. Voorkom oververhitting van de parafine omdat dat een hardende werking op het weefsel heeft.
- 9 Breng het materiaal over naar een nieuw schaalte met parafine. Laat het materiaal hierin weer tenminste 15 minuten staan.
  - 10 Maak de porceleinen inbeddschaaltjes goed schoon met ethanol 96% en wrijf deze na drogen in met een druppel glycerine.
  - 11 Giet schone gesmolten parafine in het bakje en breng het plantmateriaal over als de bodem van het schaalte al iets begint te stollen. Orienteer de objecten en maak een aantekening van de plaats waar het materiaal is ingebed. (Inbeddingsplan) Zorg dat het materiaal aan alle zijden ruim omgeven is door parafine.
  - 12 Als het materiaal op de juiste plaats is weggelegd en de parafine geheel is gestold wordt het gehele schaalte in een bak met schoon leidingwater gelegd. Na enkel minuten zal het parafineblokje zichzelf losmaken van het bakje.
  - 13 Leg de blokjes in een koelkast bij 4°C, daar zijn ze vrijwel onbeperkt houdbaar.

### 3.8.2. Snijden op de microtoom

Voor het snijden op de microtoom worden de objecten ieder afzonderlijk op een snijblokje gemonteerd. De accuratesse van dit monteren is van invloed op het uiteindelijke resultaat. Rustig en netjes werken is een vereiste.

#### *Benodigdheden*

ijzerzaagje  
houten blokjes in parafine gekookt  
spatels van 1,5 cm breed  
spiritusbrander  
tissues  
2 scalpels  
microtoom  
2 penselen  
pincet met fijne punt  
prepareernaalden  
platte gladde dozen om snijlinten weg te leggen.  
diamantschrijver  
objectglaasjes

#### *Werkwijze*

- 1 Met het ijzerzaagje wordt het parafineblokje voorzichtig gezaagd in stukjes volgens het inbeddingsplan.
- 2 Met de scalpel wordt overtollige parafine voorzichtig weggesneden. Voorkom dat de objecten worden geraakt. Probeer een pyramidevorm te maken.
- 3 Op de houten blokjes wordt een stukje parafine gesmolten, waarna met een verwarmde spatel het parafineblokje met de onderkant van de pyramide in een vloeiende beweging wordt vastgesmolten op het houten blokje.
- 4 Zet het materiaal weg in de koelkast bij 4°C gedurende tenminste 15 minuten.
- 5 Met een scalpel wordt de pyramide nauwkeurig getrimd zodat het te snijden object omgeven blijft met parafine, maar zodanig dat het te snijden oppervlak zo klein mogelijk is.
- 6 Met de microtoom kunnen nu coupes worden gesneden in een dikte van 5 of meer micron. De minimale dikte is afhankelijk van de kwaliteit van het materiaal. De dikte kan ook afhankelijk zijn van de doelstelling van de observaties.
- 7 De gesneden linten worden bewaard in een afluitbare schone doos.
- 8 Linten worden in stukjes van ongeveer 3 cm gesneden (Ont-houd de volgorde)

- 9 Objectglasjes schoongemaakt met ethanol worden voorzien van een laagje eiwit-glycerine in water, waarop de stukjes van de linten in volgorde worden aangebracht.
- 10 Op een verwarmingstafel worden de linten gestrekt, waarna de overtollige vloeistof wordt verwijderd. De linten "plakken" door de eiwit-glycerine.
- 11 Na afvloeien op schoon filtreerpapier worden de preparaten gedroogd in een stoof bij ongeveer 30°C gedurende tenminste 10 uren.
- 12 Merk de preparaten met een diamantschrijver om de bovenzijde te blijven herkennen.

### 3.8.3. Kleuren van microtoompreparaten

Voor het kleuren bestaan vele methoden (zie literatuur). Gericht op de te observeren weefsels is er een keuze te maken uit deze methoden, die soms erg arbeidsintensief zijn. De hierna beschreven Cason kleurmethode is een zeer eenvoudige weinig arbeidsintensieve methode. Wel moet zorgvuldig worden gewerkt om goede resultaten te bereiken. Zie het schema hierna voor een samenvatting.

**LET OP! Xylene is zeer giftig, werk in de zuurkast.**

#### *Benodigdheden*

spiritusbrander  
 grote pincet  
 16 bekerglazen van ongeveer 100-150 ml  
 kleurstof Cason  
 Canada balsam  
 glasstaafje  
 dekglasjes 24 x 50 mm  
 ethanol series  
 xylene

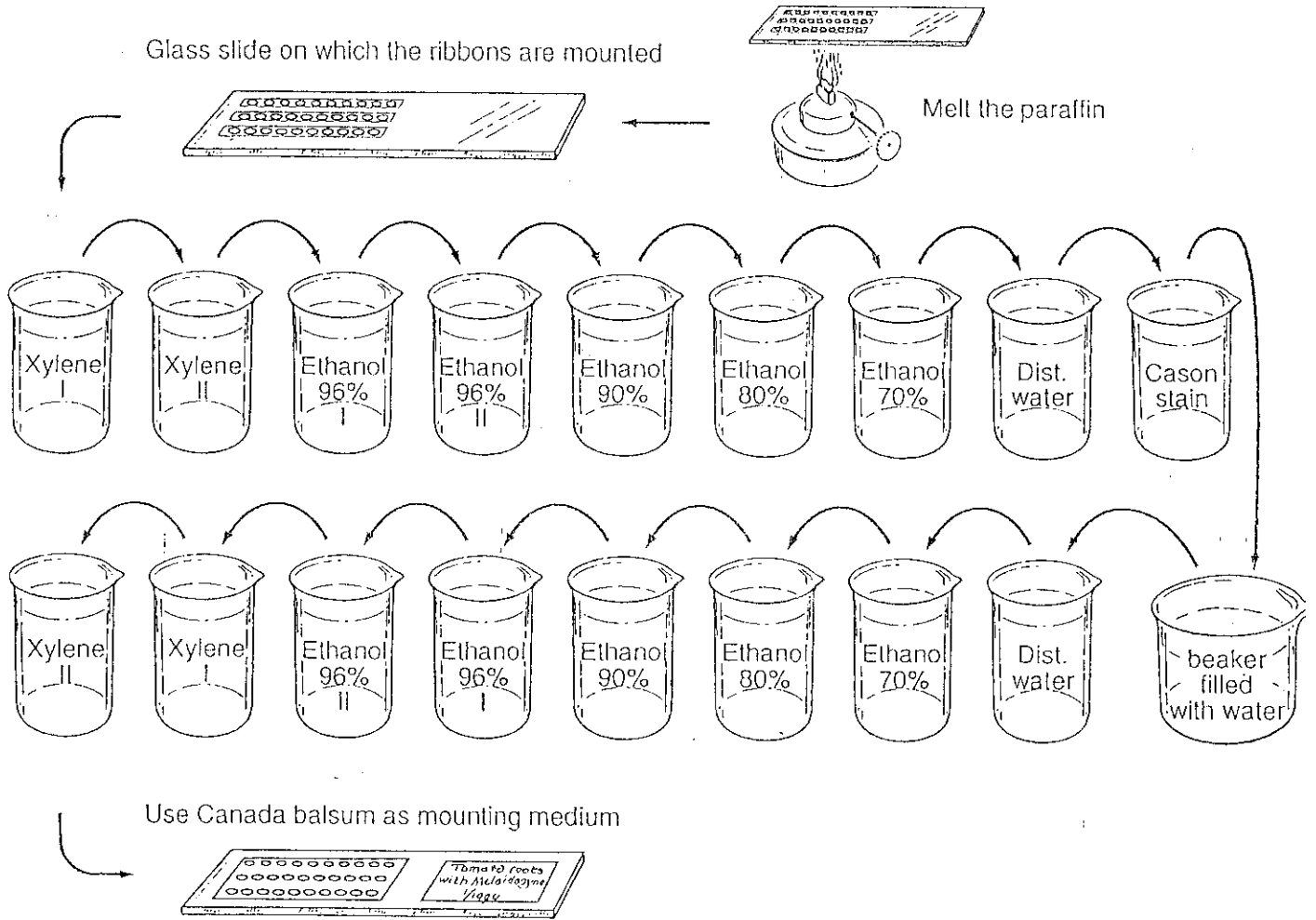
#### *Werkwijze*

- 1 Verwarm de preparaten boven de spiritusbrander om de parafine te smelten. Niet oververhitten.
- 2 Dompel het preparaat in xylene om de gesmolten parafine te verwijderen.
- 3 Spoel nogmaals in schone xylene.

- 4   Hydreer de preparaten door ze achtereenvolgens te dompelen, gedurende tenminste 5 seconden, in
  - Ethanol 96% I
  - Ethanol 96% II
  - Ethanol 90%
  - Ethanol 80%
  - Ethanol 70%
  - Gedestilleerd water
  
- 5   Kleur de preparaten door ze 5 minuten in een Cason kleurvloeistof te brengen.
  
- 6   Dehydreer de preparaten door ze SNEL (1-2 sec.) te brengen in achtereenvolgens
  - Leidingwater
  - Gedestilleerd water
  - Ethanol 70%
  - Ethanol 80%
  - Ethanol 90%
  - Ethanol 96% I
  - Ethanol 96% II
  - Xylene I
  - Xylene II
  
- 7   Breng met een glasstaafje Canadabalsam aan op een met ethanol schoongemaakt dekglas en breng dit voorzichtig op het natte preparaat.
  
- 8   Laat de preparaten drogen in een stoof bij 30°C gedurende ten minste 12 uren. De preparaten zijn nu schoon te maken met een doekje met xylene en klaar voor gebruik.



**Figuur 14 Kleuren van microtooppreparaten**



### 3.8.4. Recepten voor Histologie

#### Bouin's fixatief:

Picrinezuur, verzadigde oplossing.....	15 ml
Formaline (37% formaldehyde).....	5 ml
Ijszijn.....	1 ml

#### Methylbenzoaat 2% celloidin

Celloidine vlokken*.....	2 gr
Methylbenzoaat.....	98 ml

\*Celloidine vlokken zijn explosief en daarom niet meer in de handel. Met het vervangende kant en klareproduct Necoloidine is nog weinig ervaring opgedaan met plant/nematode materiaal.

#### Cason's kleurvloeistof

Phosphotungsticzuur kristallen AR.....	1 gr
Orange G.....	2 gr
Aniline blauw, wateroplosbaar.....	1 gr
Zuurfuchsine.....	3 gr
Gedestilleerd water.....	200 ml

#### Eiwit glycerine

Als het product niet gekocht kan worden is het mogelijk de vloeistof zelf te bereiden.  
Neem het wit van een vers kippenei, voeg daar een thymol-kristal aan toe en mix dit tot een schuimige substantie. Laat dit enkele uren staan en filtreer het vocht af. Dit filtraat wordt gemengd met een gelijke hoeveelheid glycerine. Voeg nog enkele thymol kristallen toe. Bewaar het product bij 4°C. Het is nu een houdbaar product.

Om preparaten te lijmen worden 6 druppels van de oplossing toegevoegd aan 10 ml gedestilleerd water.

#### Tabel voor het klaarmaken van ethanol

Gewenst %	Volume ethanol 96%	Volume gedestilleerd water
90%	93,5	6,5
80%	83,5	16,5
70%	72,9	27,1
60%	62,5	37,5
50%	52,1	47,9

## HOOFDSTUK 4. HET KWEKEN VAN AALTJES IN VITRO

---

### 4.1. HET AZIJNAALTJE *Turbatrix aceti*

Het azijnaaltje kan gekweekt worden op een voedingsoplossing bestaande uit 50% (v/v) azijnzuur ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) die aangeënt is met een stam van de bacterie *Acetobacter*. Een Erlenmeyer fles met bijvoorbeeld een grootte van 400 ml voldoet om deze nematode te kweken. Opvallend is dat *Turbatrix aceti* negatieve geotaxis vertoont. Om de cultuur te handhaven moet het medium iedere 5 maanden ververscht worden. Dat wordt gedaan door 30 ml uit de oude cultuur te nemen en die over te brengen in een andere Erlenmeyer met daarin een verse 50 (v/v) azijnzuur oplossing. Deze handeling zorgt ervoor dat de bacteriecultuur, het voedsel van de nematode, vitaal blijft. Gewone huishoudazijn, zonder bijmengen, is ook te gebruiken (niet verdunnen).

### 4.2. HET VRIJLEVENDE AALTJE *Panagrellus redivivus*

Ook *Panagrellus redivivus* leeft op bacteriën, in dit geval melkzuurbacteriën. De bacteriën kunnen gekweekt worden op havermeel. Maal daartoe haver en breng dit over in een glazen reageerbuis (diameter 0,9 cm, hoogte 6 cm). Autoclaveer de reageerbuis met inhoud gedurende 30 min. bij 120°C. Voeg 40 ml. steriel leidingwater toe aan iedere 20 g havermeel, en inoculeer de voedingsbodem met een melkzuurbacterie-stam en *Panagrellus redivivus*. Incubatie bij 24°C leidt tot groei van de nematodepopulatie, na enige dagen zal de reproductie haar aanvang nemen.

### 4.3. RHABDITIS

*Rhabditis* spp. zijn bacterie eters. De vele geslachten en soorten zijn meestal gemakkelijk te kweken op een simpel medium.

Samenstelling van het medium:

- mout (Difco) 10 g
- agar 14 g
- leidingwater 500 ml

Na het fijnmalen van de mout, wordt 10 g toegevoegd aan 500 ml water. Deze suspensie wordt 'au-bain-marie' opgewarmd. Filter het geheel door kaasdoek en vul het volume met gedistilleerd water aan tot (weer) 500 ml. Voeg 14 g agar toe het verhit het geheel. Giet porties van 60 ml over in 100 ml Erlenmeyer flesjes en autoclaveer het geheel gedurende 30 min. bij 120°C. Na enig afkoelen kunnen petrischalen gegoten worden met medium. Nadat de agar is gestold worden 5 *Rhabditis* exemplaren op de bodem aangebracht. Met meest eenvoudig is dit te doen door onder een binoculair te werken. Variant: Gebruik niet verrijkte wateragar 1% en breng daarop de *Rhabditis* aan. De vermenigvuldiging is nu wat trager maar de schalen blijven vrij

lang schoon. Variant: plaats op de agar steriele stukjes aardappel, plaats hierbij enkele *Rhabditis* spp. Incubeer de cultuur bij 20°C en kijk dagelijks wat er met deze stukjes en de nematoden gebeurt.

#### 4.4. HET CHRYSANTENBLADAALTJE *Aphelenchoïdes ritzemabosi*

*Aphelenchoïdes ritzemabosi* is een obligate planteparasiet en moet dus op levend plantenmateriaal, in dit geval zaailingen van tabak, gekweekt worden.

De zaailingen worden als volgt geïnoculeerd:

- Maak een suspensie van *A. ritzemabosi* in een oplossing van 2% methylcellulose.
- Inoculeer 2 weken oude tabakszaailingen met een druppel van de bovengenoemde suspensie.
- plaats de geïnoculeerde zaailingen:
  - dag 0-3: in een incubator met een relatieve luchtvochtigheid van 100% bij 20°C.
  - dag 3-6: in een kas bij een temperatuur van 20°C
  - dag 6-9: in een incubator met een relatieve luchtvochtigheid van 100%.
  - dag 9-12: in een kas bij een temperatuur van 20°C totdat de eerste symptomen zichtbaar worden (duurt in totaal ongeveer 14 dagen).

#### 4.5. DE AARDAPPELCYSTEALTTJES *Globodera rostochiensis* of *G. pallida*

Deze niet-steriele *in vitro* methode is geschikt voor:

- het volgen van het infectieproces
- het doen van kruisingen tussen verschillende genotypen van *Globodera rostochiensis* of *G. pallida*
- histologische studies (het uitgangsmateriaal is relatief schoon)
- het testen van waardplantresistentie

Procedure:

- a. Was aardappelknollen en verwijder aanhangende grond en planteresten. Bewaar deze knollen gedurende drie weken bij 20°C.
- b. Om wortellexudaat te verkrijgen (nodig voor het uit het ei komen van de nematode) worden aardappels gekweekt waarbij de wortels in een bekerglas met leidingwater hangen. Het exudaat wordt door de wortel afgegeven.
- c. Incubeer cysten van *Globodera rostochiensis* of *G. pallida* in een oplossing van wortellexudaat gedurende 3 - 14 dagen. Dit gebeurt in speciaal daarvoor gemaakte petrischaaltjes. Schaaltjes met *G. rostochiensis* worden weggezet bij 22°C, schaal-tjes met *G. pallida* worden geïncubeerd bij een temperatuur van 18°C.

d. Voor de aardappelcultuur wordt een 3% wateragar-bodem gebruikt. De agar wordt onder verhitting opgelost in het water en nadat het schuim dat hierbij ontstaat is verwijderd, wordt het geheel geautoclaveerd. De wateragar wordt in steriele petrischalen gegoten. Deze handeling vindt plaats in een steriele flowkast. Iedere petrischaal krijgt ongeveer 20 ml en de petrischaaltjes worden pas gesloten als de agar gestold is (anders krijgt men veel condens op de deksel). Vervolgens worden de vers gegoten petrischalen voor enkele dagen bij kamertemperatuur weggezet.

e. Snij met een scalpel wigvormige stukjes uit de aardappelknollen die in het midden een oog bevatten. Houdt de scalpel van tevoren in een 96% ethanol oplossing en flambeer hem af. Plaats het aardappelstukje zo op de agar dat het oog naar het centrum van de agarplaat wijst.

f. De schalen worden weggezet bij 20°C. Wanneer de wortels 2 cm lang zijn, worden J2's op de wortel gezet. Bij voorkeur vindt inoculatie in de strekkingzone van de wortel plaats. Deze handelingen worden onder een binoculair gedaan. Na ongeveer 18 dagen moet opzwellen van de aardappelwortel zichtbaar zijn.

#### **4.6. HET WORTELKNOBBELAALTJE *Meloidogyne spp***

Wortelknobbelaaltjes kunnen bijvoorbeeld op tomatenwortels gekweekt worden. De procedure is dan als volgt:

a. Oppervlakkige sterilisatie van tomatenzaden. Zaden gedurende een nacht voorweken in leidingwater. Tomatenzaden worden gedurende 10 min. geïncubeerd in een 4-5% Chlorix oplossing (HClO). Het geheel wordt continu gemengd doordat er een roervlo wordt toegevoegd, het geheel worden op een automatische roerder geplaatst. Wanneer het oppervlak van het zaad gelijk van kleur wordt, wordt de Chlorix oplossing afgegoten. De nu steriele zaden worden gewassen in steriel leidingwater.

b. Steriele zaden worden op een 2% wateragar-bodem te kiemen gelegd. Kieming gebeurt bij 20°C.

c. Steriele plastic of glazen petrischalen worden gebruikt. Let wel: plastic schaaltes worden steriel geleverd, glazen schalen moeten geautoclaveerd worden (2,5 uur bij 120°C).

d. Het plaatsen van de zaailingen op wateragar. Als de wortels 1 cm lang zijn, worden deze afgesneden. Omdat ze nu geen voedsel meer krijgen uit het zaad worden ze overgeplaatst op voedingsmedium.

e. Als voedingsbodem wordt Gamborg B5 medium gebruikt met 20 g/l sucrose. Giet de schalen in de laminaire flowkast, laat ze daar open afkoelen. Na overplaatsing van de wortelsegmenten worden de petrischalen gesloten met Parafilm. Breng ze vervolgens over naar een incubator van 25°C.

f. Oppervlakkige sterilisatie van *Meloidogyne* eieren. Verzamel eiproppen van de wortels. De eiproppen moeten volgroeid zijn

en lokbare eieren bevatten. Ze mogen niet te oud zijn omdat de sterilisatie dan vaak onvolledig verloopt. Incubeer ze in 1% Chlorix in een vacuum exsiccator met 30 cm Hg onderdruk. Plaats de nu steriele eieren na wassing in steriel water bij de tomatenwortels. Incubeer de platen bij 23°C en bekijk de platen regelmatig.

Samenstelling Gamborg B5 medium (Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K. (1968) Exp. Cell Res. 50, 151):

CaCl <sub>2</sub>	113,23 mg/1
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
FeNaEDTA	36,7
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,00
KI	0,75
KNO <sub>3</sub>	2500,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	250,0
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	10,0
NaHPO <sub>4</sub>	130,44
NaMoO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,25
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134,0
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,00
myo-inositol	100,0
nicotinic acid	1,0
pyridoxine HCl	1,0
thiamine HCl	10,0

Voor het oppervlakkig steriliseren van *Globodera* cysten: zie methode van Heungens et al. (1996)

Desinfectie van *Globodera* larven uit cysten.

Heungens et al. 1996

- 1 Verwijder de top van een 20 ml kunststof injectiespuit met een hete naald.
- 2 Smelt de oppervlakte van het open snijvlak en druk dit deel snel op een stukje nylon zeefgaas met een poriegrootte van 25  $\mu\text{m}$ . Controleer of de verbinding rondom dicht is en verwijder de overtollige zeefgaasranden.
- 3 Autoclaveer the injectiespuit met zuiger gedurende 20 minuten, voor het gebruik.
- 4 Oppervlakte sterilisatie van de cysten moet worden uitgevoerd in een entkast met steeds steriele materialen.
- 5 Breng ca 30 droge cysten in de spuit en dompel dit in 90% ethanol gedurende 15 seconden, beweeg de zuiger om de alcohol rond de cysten te laten spoelen.
- 6 Direct daarna worden de cysten in een 1,3% Chlorix oplossing gebracht totdat ze verbleken en beginnen open te gaan.  
Afhankelijk van herkomst en staat van ontwikkeling zal dit 7-9 minuten duren.
- 7 Spoel de cysten 3 keer in steriel water.
- 8 Verwijder het zeefgedeelte van de spuit door deze te snijden met een hete naald op ongeveer 1.5 cm hoogte. Het zo verkregen zeefje wordt in een horlogeglas geplaatst wat in een petrischaal is gelegd.
- 9 Vul het horlogeglas met 5 ml steriel water en sluit de petrischaal. Sluit de randen met parafilm.
- 10 Incubeer deze cysten gedurende 3 dagen in het donker bij 20°C.
- 11 Breng het zeefje met cysten over naar een nieuw horlogeglas gevuld met 5 ml steriele PRD en incubeer weer bij 20°C
- 12 Larven kunnen nu worden verzameld in gewenste hoeveelheden. Vul de PRB steeds weer aan.



## HOOFDSTUK 5. MICROSCOPIE

---

### 5.1. INLEIDING

#### Principes

De meeste nematoden zijn microscopisch klein, een microscoop is dan ook onontbeerlijk voor een nematoloog. De microscoop moet ook van een goede kwaliteit zijn. Omdat men bij het analyseren van een experiment vaak vele uren achter de microscoop zit is het belangrijk dat de optische mogelijkheden van de microscoop optimaal benut worden. Staat de microscoop verkeerd afgesteld dan wordt het analyseren bemoeilijkt en kunnen er lichamelijke klachten ontstaan zoals hoofdpijn. Let goed op deze signalen.

Voor routinewerk worden er binnen de vakgroep Nematologie twee typen microscopen frequent gebruikt: "de binoculair" en "de microscoop".

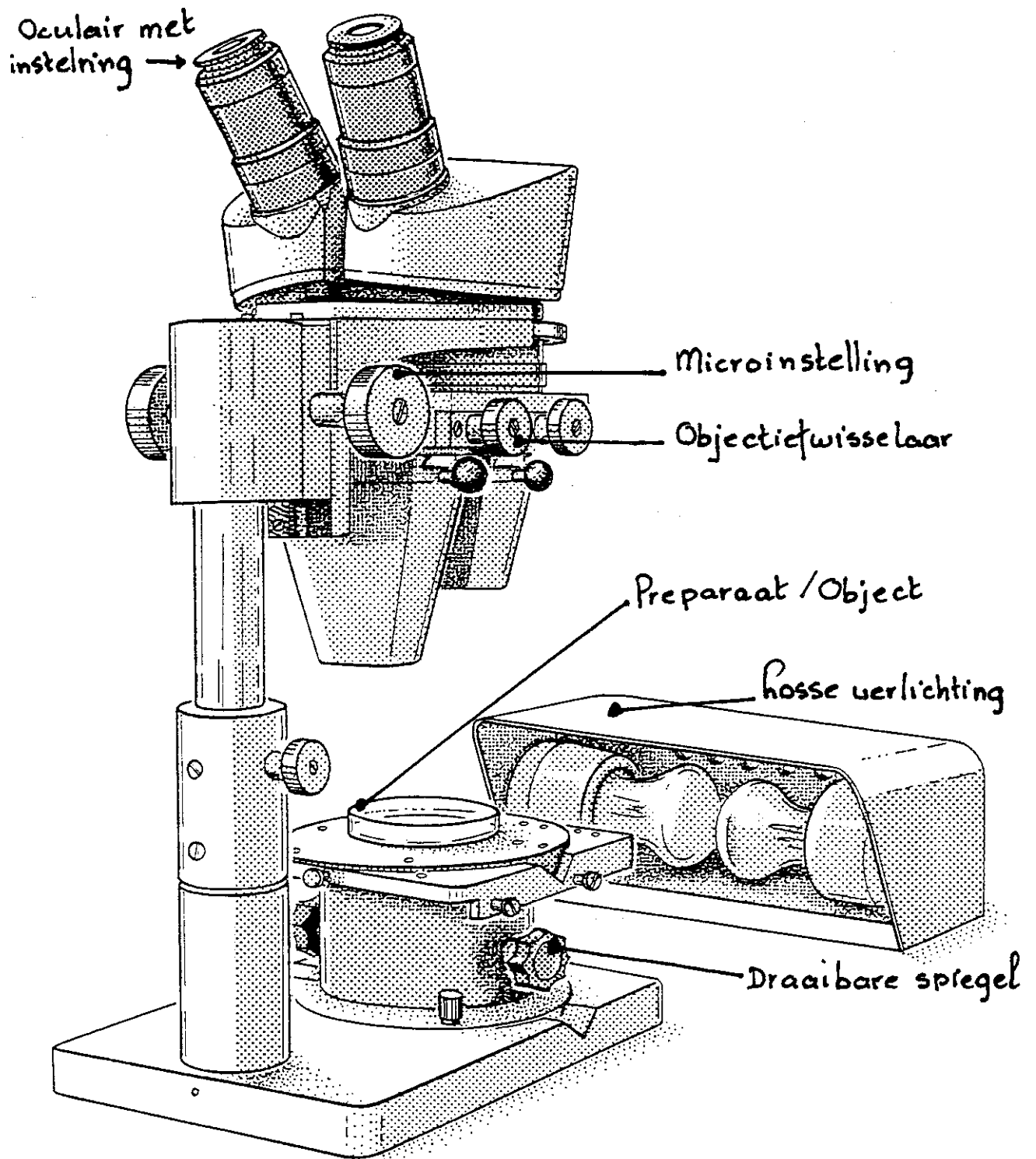
De "**binoculair**" is een stereoscopische prepareermicroscoop met een kleine vergroting (10-50x) en daardoor een groot gezichtsveld. Deze microscoop wordt vooral gebruikt om nematodensuspensies te analyseren en voor prepareerwerk.

De "**microscoop**" is een binoculaire lichtmicroscoop waarmee vergrotingen tussen de 40 en 1000 x kunnen worden verkregen. Bij 1000 x vergroting wordt met een olielens gewerkt. De microscoop wordt gebruikt voor de identificatie van nematoden en andere gedetailleerde waarnemingen. Meestal betreft het materiaal dat eerst onder de binoculair in preparaat is gebracht.

(Op de vakgroep Nematologie worden voor specifieke doeleinden ook nog andere lichtmicroscopen gebruikt zoals de omkeermicroscoop, fluorescentiemicroscoop en interferentie/fasecontrast, zij worden hier verder niet besproken)

Als de kwaliteit van de microscoop goed is dan kan met de juiste afstelling een optimaal gebruik worden gemaakt van de goede kwaliteit. Een goede microscoop die niet goed is ingesteld geeft een lagere observatiekwaliteit en zal bij de gebruiker klachten veroorzaken als moeheid, pijnlijke ogen en hoofdpijn. Treedt dit op stel dan de microscoop opnieuw in. Elk persoon heeft een eigen instelling van de microscoop nodig om de oogafwijkingen te compenseren, ook niet-bril dragers!

# "Binoculair" met losse verlichting



**Figuur 15**  
**Binoculair voor observatie en tellen van nematoden**

## 5.2. DE BINOCULAIR (prepareermicroscoop)

De binoculair heeft of een ingebouwde verlichting of een los lampenbakje. De verlichting dient zo opgesteld of ingesteld te zijn dat de lichtopbrengst in het observatievlak maximaal en egaal verdeeld is. Zorg voor een juiste hoek van de spiegel, voor zover van toepassing, en plaats de losse verlichting op ongeveer 8 cm van de binoculairtafel.

### Instellen van de oculairen

- 1 Leg een preparaat op de objecttafel.
- 2 Stel scherp op het object.
- 3 Sluit een oog en kijk met het andere oog naar een deeltje binnen het object, bij voorkeur in het midden van het gezichtsveld.
- 4 Stel scherp met behulp van de statiefinstelling, kijk goed en herinner de scherpste van dat beeld.

De statiefinstelling nu niet meer aanraken.

- 5 Kijk nu met het andere oog naar hetzelfde deeltje en stel scherp met behulp van de instellingsring op het oculair.

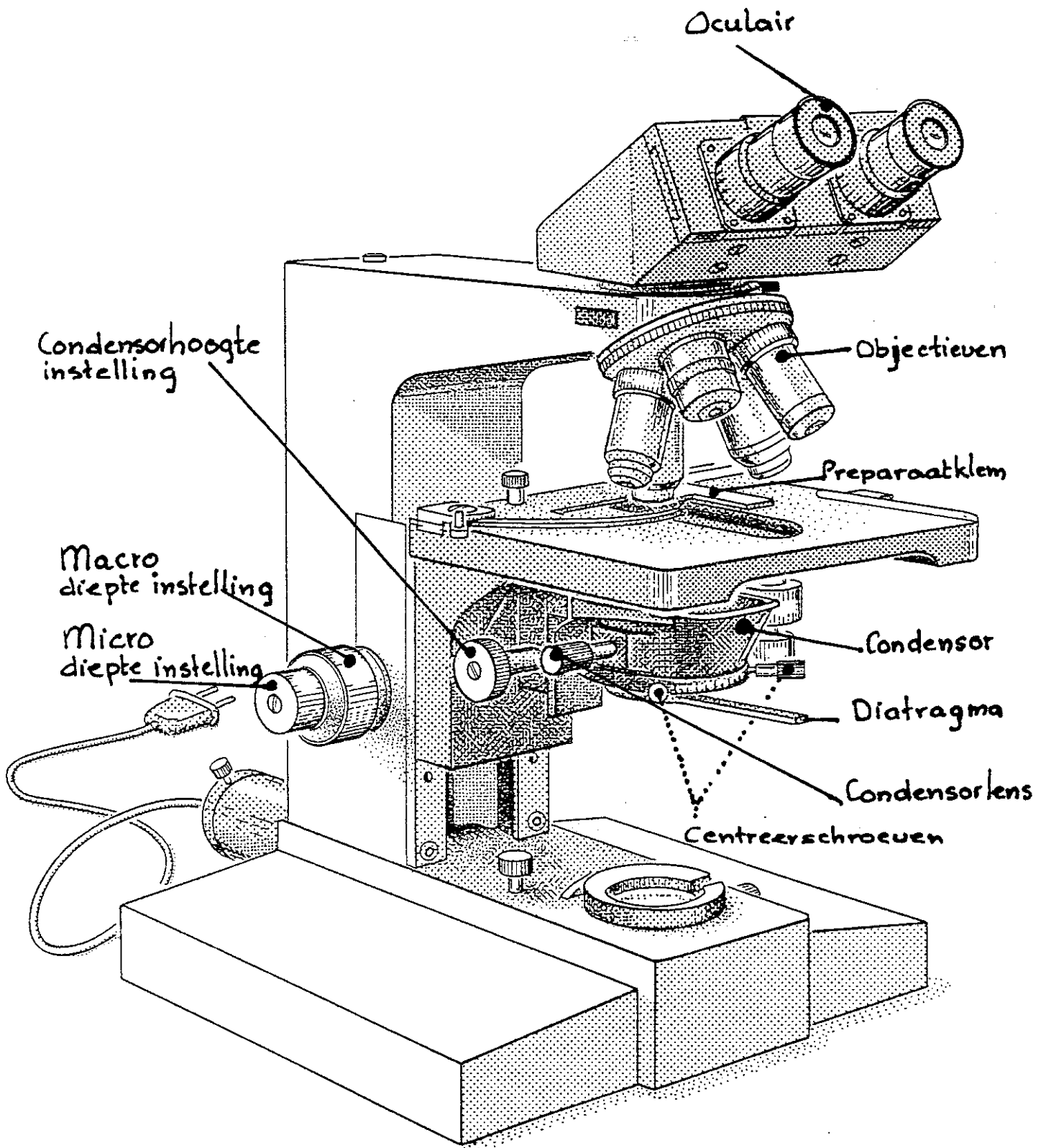
Nu is voor de afzonderlijke ogen de optimale instelling bereikt.

- 6 Breng de twee oculairen zover mogelijk uit elkaar. Kijken zal nu twee afzonderlijke ronde beelden opleveren.
- 7 Door de oculairen rustig naar elkaar toe te bewegen terwijl wordt gekeken zullen de twee beelden over elkaar heen gaan en een enkel beeld gaan vormen.

De binoculair is nu ook ingesteld op de oogafstand.

Herhaal deze procedure direct als wordt getwijfeld aan de juiste instelling van het binoculair. Men kan de oogafstand ook eerst instellen en daarna de oculairen scherpstellen.

Zet nooit iets op het lampenbakje, vanwege brandgevaar, en zet de lamp uit als de microscoop niet wordt gebruikt.



**Figuur 16**  
**Microscop voor observaties onder grote vergroting**

### 5.3. DE MICROSCOOP

De microscoop heeft een ingebouwde verlichting die gevoed wordt door een ingebouwde of losse transformator.

#### Centreren van de verlichting

- 1 Zet de transformator op ongeveer 2 à 3 volt.
- 2 Breng de condensor in de hoogste stand.
- 3 Klap de condensorlens uit de gezichtslijn.
- 4 Leg een preparaat onder de microscoop.
- 5 Stel scherp op het preparaat met de 10 x lens.
- 6 Klap de condensorlens in de gezichtslijn.
- 7 Stel scherp op het verlichte vlak, zorg voor scherpe omrandingen. Het verlichte vlak moet volledig gecentreerd binnen het gezichtsveld liggen. Is dat niet het geval stel dan bij met de twee schroeven aan voorkant van de condensor.
- 8 Draai de 25 x lens in de gezichtslijn. Het gehele vlak moet nu gelijkmatig zijn verlicht. Is dit niet het geval dan moet de lamp worden gecentreerd. Bij moderne microscopen is dit niet nodig.
- 9 Klap de condensorlens uit de gezichtslijn.
- 10 Breng het object exact in het midden van het gezichtsveld.
- 11 Observaties met de 40 x lens zijn nu mogelijk.

#### Instellen van de oculairen

- 12 Stel scherp op het object.
- 13 Sluit een oog en kijk met het andere oog naar een deeltje binnen het object, bij voorkeur in het midden van het gezichtsveld.
- 14 Stel scherp met behulp van de statiefinstelling, kijk goed en herinner de scherpste van het beeld.

De statiefinstelling nu niet meer aanraken.

- 15 Kijk nu met het andere oog naar hetzelfde deeltje en stel scherp met behulp van de instelling op de oculair-tubus.

Nu is voor de afzonderlijke ogen de optimale instelling bereikt.

- 16 Breng de twee oculairen zover mogelijk uit elkaar. Kijken zal nu twee afzonderlijke ronde beelden geven.
- 17 Door de oculairen rustig naar elkaar toe te bewegen terwijl wordt gekeken zullen de twee beelden over elkaar heen gaan en een enkel beeld gaan vormen.

De microscoop is nu ingesteld op de oogafstand.

- 18 Als de olie-immersie gebruikt moet worden, zorg dan dat het object onder de 40 x lens goed gecentreerd ligt.
- 19 Draai de 10 x lens in de gezichtslijn en draai de tafel naar beneden.
- 20 Breng de condensorlens in de gezichtslijn, zorg er voor dat niet aan de tafel wordt geschoven.
- 21 Breng een klein druppeltje olie aan op het verlichte vlakje.
- 22 Breng de 100 x lens in de gezichtslijn en draai de tafel van de microscoop omhoog terwijl van opzij wordt gekeken wanneer de oliedruppel de lens raakt.
- 23 Breng de tafel verder omhoog terwijl door het microscoop wordt gekeken. Het object zal als een donkere structuur in beeld komen.
- 24 Klap de condensorlens in de gezichtslijn en regel met het diafragma en de transformator de hoeveelheid licht op.

Herhaal de procedure direct als wordt getwijfeld aan de juiste instelling van de microscoop.

#### **5.4. HET ONDERHOUD VAN MICROSCOPEN**

Stof en vuil verstoren de observaties door microscopen. Zorg daarom dat de microscoop zoveel mogelijk in een schone omgeving staat. Meldt het direct als je vermoed dat de microscoop mankementen vertoont!

Lenzen worden vrij gemaakt van olieresten met een schone tissue met een beetje wasbenzine. De microscoop zelf kan regelmatig worden schoongemaakt met een schone doek of een tissue.

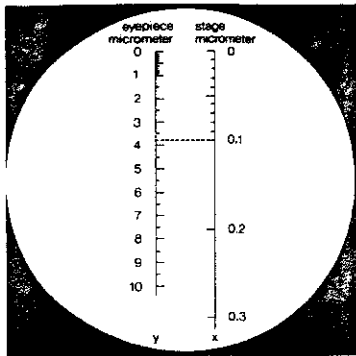
Na het gebruik de microscoop met een hoes bedekken en in de kast plaatsen.

#### **5.5. METEN MET DE MICROSCOOP**

Om metingen te verrichten aan nematoden is een meetoculair nodig. In het meetoculair zit een glaasje met honderd schaaldelen. Maten binnen nematoden kunnen worden uitgedrukt in aantallen schaaldelen. Deze waarden kunnen voor eigen waarneming voldoende zijn om vergelijkingen te maken. Voor het opmeten in absolute waarden, bv. voor identificaties, dient het meetglaasje geijkt te worden. Dit doet men met een ijk-glaasje, een preparaat met een schaalverdeling van 2 mm, onderverdeeld in 200 schaaldelen.

Om de meetwaarden in microns aan te kunnen geven wordt met behulp van de micrometer de vergrotingsfactor per microscoop en per lens vastgesteld. op het micrometerpreparaat is elk schaaldeel exact 10 micron. Door de onderverdeling van de

oculair te vergelijken met de micrometerwaarde kan de waarde van een oculairschaaldeel nu ook uitgedrukt worden in micronwaarde. Door deze calibratie voor alle lenzen op een microscoop uit te voeren kan men voorkomen dat kleine mechanische afwijkingen de meetresultaten beïnvloeden.



In het voorbeeld komt oculair waarde 38 overeen met 100 micron. Dat wil dus zeggen dat 1 schaaldeel van de meetoculair gelijk is aan  $100/38 = 2.63$  micron.

#### 5.6. NEMATODE METINGEN (Ratio's)

Nematode metingen worden gemeld in de beschrijvingen van nematoden. Er zijn vele ratio's. De Man (1880) is de grondlegger van het gebruik van ratio's. Vele taxonomen hebben de ratio's overgenomen en het aantal uitgebreid. De meest gebruikte ratio's worden hier genoemd.

- L = Totale lichaamslengte in microns of milimeters
- a = Lichaamslengte ÷ grootste breedte
- b = Lichaamslengte ÷ slokdarm lengte
- b' = Lichaamslengte ÷ slokdarm lengte tot het einde van de slokdarmklieren
- c = Lichaamslengte ÷ staartlengte
- c' = Lichaamslengte ÷ lichaamsbreedte bij de anus
- G<sup>1</sup> = Totale lengte van het voorste ovarium vanaf de vulva x 100 ÷ lichaamslengte
- G<sup>2</sup> = Totale lengte van het achterste ovarium vanaf de vulva x 100 ÷ lichaamslengte
- V = Afstand van de vulva vanaf de lippen x 100 ÷ lichaamslengte

## HOOFDSTUK 6. OVERIGE TECHNIEKEN

---

### 6.1. CONCENTREREN EN OPPERVLAKTE STERILISATIE VAN NEMATODEN SUSPENSIES

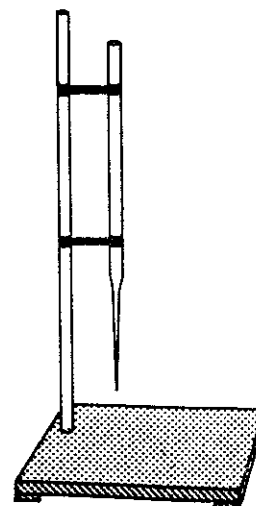
Voor inoculatie in steriele kweken kan het nodig zijn om nematoden oppervlakkig te steriliseren. De kans op verontreinigingen van kweken wordt daarmee teruggebracht. Geheel schoon worden de populaties niet omdat alleen de oppervlakte door het desinfectiemiddel wordt geraakt. Bij een goede uitvoering van de methode is de kans op infecties heel gering. De methode is ook te gebruiken met alleen water om nematodensuspensies te concentreren tot druppelformaat.

#### *Benodigdheden*

glasbuis diameter ongeveer 15 mm, ongeveer 50 cm lang  
sterilisatievloeistof (b.v. 1% commerciële Chlorix)  
statief met klem  
horlogeglas  
wattenpropje

#### *Werkwijze*

- 1 De in een fijne (gesloten) punt uitgetrokken glasbuis wordt in de statiefklem opgehangen.
- 2 Vul de buis met de desinfectievloeistof tot bijna bovenaan.
- 3 Breng een klein propje witte watten aan op de bovenkant van de vloeistof.
- 4 Pipeteer of giet een voorgeconcentreerde suspensie op de wattenprop.
- 5 Laat de nematoden door het wattenpropje kruipen en bezinken in de fijne punt van de glasbuis. Afhankelijk van de dikte en compactheid van het wattenpropje zal dit 30 minuten tot enkele uren duren.
- 6 Houdt met de duim de bovenkant van de glasbuis dicht en breek het onderste deel van de fijne punt met een pincet weg. Laat een kleine beetje lucht onder de duim door en verzamel de nematoden in een tevoren met siliconen bestreken en geflambeerd horlogeglas.



Zo mogelijk de handelingen uitvoeren in een clean air kast of een andere zo schoon mogelijke ruimte.



## 6.2. KWANTITATIEVE EXTRACTIE VAN RUSTSPOREN VAN NEMATODEN PARASITAIRE SCHIMMELS MET BEHULP VAN EEN CENTIFUGE DRIJF METHODE.

Biologische bestrijding van nematoden heeft de laatste jaren steeds meer aandacht gekregen. Voor de schimmelgroepen die rustsporen vormen is het mogelijk om deze kwantitatief uit een grondmonster te verzamelen. De methode is arbeidsintensief maar maakt het mogelijk om voor proefomstandigheden kwantitatieve informatie te verzamelen, die gebruikt kan worden voor verklaring van gevonden biologische bestrijdingseffecten.

### *Benodigdheden*

grondzeef met 5 mm doorlaat  
mengzeiltje  
balans  
zeven 1000, 15, 35 en 10 micron doorlaat  
vibromixer  
centrifuge met buizen van tenminste 100 ml  
magnesiumsulfaat oplossing S.g. 1.30

### *Werkwijze*

- 1 Neem een grondmonster van 25 gram voor de rustsporen extractie. Volg de richtlijnen uit par. 1.4.
- 2 Neem een grondmonster van 100 gr voor de vochtbepaling.
- 3 Spoel het 25 gram monster achtereenvolgens door de zeven van 1000, 150 en 35 micron doorlaat.
- 4 De suspensie wordt steeds opgevangen en na de 35 micron zeef wordt de suspensie over een 10 micron zeef gevoerd.

Het geheel zal moeilijk doorlopen. Een spons tegen de onderkant van de 10 micron zeef kan de doorloop bespoedigen. Ook het trillen van de zeef tegen een vibro mixer kan helpen.

- 5 Spoel het materiaal van de 10 micron zeef in een centrifugebeker. Spoel het materiaal in de beker met een spuitfles met magnesiumsulfaat s.g. 1.30.
- 6 Centrifugeer gedurende 4 minuten bij een R.C.F. waarde van 39 (dat is 465 toeren op de Centaur van de vakgroep).
- 7 Spoel de gecentrifugeerde vloeistof over een 10 micron zeef en verzamel het gezeefde in een kleine conische centrifugebuis met schaalverdeling (Of geef het 0,5 ml niveau aan). Gebruik een spuitfles met water. Gebruik zo weinig mogelijk water.

- 8 Herhaal de centrifuge stap omdat nog sporen in het pellet achtergebleven kunnen zijn. Verzamel het gezeefde in dezelfde kleine centrifugebuis met schaalverdeling.
- 9 Centrifugeer de kleine centrifugebuis gedurende 5 minuten bij een R.C.F. waarde van 850 (dat is 2200 toeren op de Centaur van de vakgroep).
- 10 Zuig de bovenstaande suspensie af tot ongeveer een 0,5 ml is overgebleven.
- 11 Meng de overgebleven suspensie door met een kleine pipet lucht door te blazen.
- 12 Neem een 0,01 ml monster en breng dat op een sporen-telplaat. Een zelfgemaakt van lijnen voorzien objectglas is ook te gebruiken. Breng het monster op een kleine druppel van een 50% glycerine/water mengsel. De glycerine voorkomt uitdroging.
- 13 Breng een dekglasje aan en tel de sporen bij een vergroting van ongeveer 250 maal. Tel tenminste drie sub monsters.
- 14 Nadat met het 100 gram monster het drooggewicht is bepaald, kan worden aangegeven hoeveel sporen per gram drooggewicht voorkomen.

### 6.3. FYTOTOXICITEITSPROEF

Als een grond behandeld is met middelen die de kieming en groei van gewassen belemmeren, zoals bij veel grondontsmettingsmiddelen, is het goed om via de fytotoxiciteitsproef vast te stellen of de grond al geschikt is voor zaaien of poten van gewassen.

#### *Benodigdheden*

twee luchtdichtafsluitbare glazen flessen, inhoud minimaal 0,5 liter  
wattenproppen  
dunne draad (garen)  
zaad van Sterrekers (*Lepidium sativum* L.)

#### *Werkwijze*

- 1 Neem de glazen fles naar het te bemonsteren veld en neem grond op meerdere plaatsen op een diepte van 3-10 cm. Zorg voor een laag van ongeveer 5 cm op de bodem. Sluit direct luchtdicht af.
- 2 Neem een andere fles en vul deze op dezelfde wijze met schone grond. Dit is de controle.
- 3 Maak wattenbolletjes en bevestig deze aan een dun draadje. Bevochtig de bolletjes en rol ze door het sterrekerszaad. Strooi ook wat zaden op de grond in de pot.
- 4 Hang de wattenbolletjes met zaad in de flessen en sluit direct goed af. Maak eventueel eerst de grond wat vochtig.
- 5 Na 24-48 uur (afhankelijk van de temperatuur) zal het zaad gaan kiemen. Het verschil tussen de kieming van de sterrekers van de behandelde grond en de schone grond geeft de mate aan van kiemremming.
- 6 Als in de behandelde grond geen kieming optreedt, kan de proef na een verdere grondbewerking of een extra wachtperiode, herhaald worden.

## LITERATUUR

---

- Alkemade, R. (1993). *Bemonsteren van nematodenpopulaties*. RIVM Bilthoven.
- Andrássy, I. (1956). Die Rauminhalts- und Gewichtsbestimmung der Fadenwürmer (Nematoden). *Acta Zoologica, Budapest* 2: 1-15.
- Ayoub, S.M. (1980). *Plant Nematology. An Agricultural Training Aid*. NemaAid Publications, P.O Box 23085, Sacramento, California 95823.
- Baermann, G. (1917). Eine einfache Methode zur Auffindung von *Ankylostomum* (nematoden) Larven in Erdproben. *Geneesk. Tijdschr. Ned-Indië* 57: 131-137.
- Baker, J.R. (1945). *Cytological technique*. London, Methuen.
- Barker, K.R., Campbell, C.L. (1981). Sampling nematode populations. In: *Plant Parasitic Nematodes, Vol. III* (B.M. Zuckerman, R.A. Rohde, eds.), pp. 451-474. Academic Press, New York.
- Barker, K.R., Nusbaum, C.J., Nelson, L.A. (1969). Seasonal population dynamics of selected plant-parasitic nematodes as measured by three extraction procedures. *J. Nematology* 1: 232-239.
- Barker, K.R., Townshend, J.L., Michell, R.E., Norton, D.C., Rhuele, J.L., Bird, G.W., Chapman, R.A., Dunn, R.A., Oostenbrink, M., Powell, W.M., Thomason, I.J., Fisher, K.D., Southards, C.J., Mai, W.F., Smart, G.C. Jr., Rhode, R.A., Dickson, D.W., Malek, R.B., Griffin, G.D., Taylor, P.L., Thames, W.H. Jr., Murad, J.L. (1978). Determining nematode population responses to control agents. In: *Methods for Evaluating Plant Fungicides, Nematicides and Bactericides* (E.I. Zehr, G.W. Bird, K.D. Fisher, K.D. Hickey, F.H. Lewis, R.F. Line, S.F. Rickards, eds.), pp. 114-125. American Phytopathological Society, St Paul.
- Baunacke, W. (1922) Untersuchungen zur Biologie und Bekämpfung der Rübennematoden, *Heterodera schachtii* Schmidt. *Arb. Biol. Reichsanst. Berlin* 11: 185-288.

- VAN Bezooijen, J., Stemerding, S. (1971). *Catalogue for equipment used in work with plant and soil nematodes*. Wageningen, 53 pp.
- VAN Bezooijen, J., Ettema, C. (1996). *Practicumhandleiding Nematologie* (Gedeeltelijk herziene versie).
- Bijloo, J.D. (1954). A new method for estimating the cyst contents of the potato-root eelworm *Heterodera rostochiensis* Wollenweber. *J. Helminthology* 28: 123-126.
- Bongers, T. (1993). *Praktikumhandleiding identificatiecursus*. Vakgroep Nematologie, Wageningen.
- Bongers, T., DE Goede, R.G.M., Kappers, F.I., Manger, R. (1989). *Ecologische typologie van de Nederlandse bodem op basis van de vrijlevende nematodenfauna*. Rapportnr. 718602002, RIVM, Bilthoven.
- Bongers, T., VAN DE Haar, J. (1990). On the potential of basing an ecological typology of aquatic sediments on the nematode fauna: an example from the river Rhine. *Hydrobiological Bulletins* 24: 37-45.
- Bridge, J., Page, S., Jordan, S. (1982). An improved method for staining nematodes in roots. *Rep. Rothamst. exp. Stn for 1981*, Part 1, p 71.
- Byrd, D.W. Jr., Nusbaum, C.J., Barker, K.R. (1966). A rapid flotation-sieving technique for extracting nematodes from soil. *Plant Disease Rept.* 50: 954-957.
- Byrd, D.W. Jr., Barker, K.R., Ferris, H., Nusbaum, C.J., Griffin, W.E., Small, R.H., Stone, C.A. (1976). Two semi-automatic elutriators for extracting nematodes and certain fungi from soil. *J. Nematology* 8: 206-212.
- Carbonell, T.E., Angulo, A.E. (1979). Tamaño óptimo relativo de muestra para evaluar nematodos en vamous caneros. *Nematropica* 9: 8-15.
- Catalogue, zie VAN Bezooijen, J., Stemerding, S. (1971).
- Claassen, Y. (1991). *Effecten van verontreinigd sediment op de nematodenfauna van het land van Saefthinge*. Vakgroep Bodemkunde en Geologie, Wageningen.

- Cobb, N.A. (1918). Estimating the nema population of the soil. *Agric. Tech. Circ. Bur. Pl. Ind. U.S. Dep. Agric. No.1.* 48 pp.
- Coolen, W.A. (1979). Methods for the extraction of *Meloidogyne* spp. and other nematodes from roots and soil. In: *Root-knot nematodes (Meloidogyne species) systematics, biology and control* (F. Lamberti, C.E. Taylor, eds.), pp. 317-329. Academic Press, London & New York.
- Coolen, W.A., D'Herde, C.J. (1972). A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. State Agricultural Research Centre, Ghent, Belgium.
- Coolen, W.A., D'Herde, C.J. (1977). Extraction de *Longidorus* et *Xiphinema* spp. du sol par centrifugation en utilisant du silica colloidal. *Nematologia Mediterranea* 5: 195-206.
- Courtney, W.D., Polley, D., Miller, V.L. (1955). TAF, an improved fixative in nematode technique. *Plant Disease Rept.* 39: 570-571.
- Dickerson, O.J. (1977). An evaluation of the direct centrifugal-flotation methods of recovering nematodes from soil. *Plant Disease Rept.* 61: 1054-1057.
- Dunn, R.A. (1969). Extraction of *Heterodera* species from soils by centrifugation in high density solutions. *J. Nematology* 1: 7.
- Ellenby, C., Smith, L. (1964). A narcotic and an immersion medium for living nematodes with some observations on the refractive index of the cuticle. *Nematologica* 10: 342-343.
- Elliott, J.M. (1979). Statistical analysis of samples of benthic invertebrates. *Freshwater Biological Association Scientific Publication No. 25*, pp. 14-93; 126-137. The Ferry House, Ambleside, Cumbria.
- Elmiligy, I.A., DE Grisse, A. (1970). Effect of extraction technique and adding fixative to soil before storing on recovery of plant-parasitic nematodes. *Nematologica* 16: 353-358.
- Esser, R.P., MacGowen, J.B. (1973). Mountant control on glass. *J. Nematology* 5: 76.

- Fenwick, D.W. (1940). Methods for the recovery and counting of cysts of *Heterodera Schachtii* from soil. *J. Helminthology* 18: 155-172.
- Ferris, H. (1984). Nematode damage functions: The problem of experimental and sampling error. *J. Nematology* 16: 1-9.
- Freckman, D.W., Kaplan, D.T., Van Gundy, S.D. (1977). A comparison of techniques for extraction and study of anhydrobiotic nematodes from dry soils. *J. Nematology* 9: 176-181.
- Goodell, P.B. (1982). Soil sampling and processing for detection and quantification of nematode populations for ecological studies. In: *Nematodes in Soil Ecosystems* (D.W. Freckman, ed.), pp. 178-198.
- Gooris, J., D'Herde, C.J. (1972). A method for the quantitative extraction of eggs and second stage juveniles of *Meloidogyne spp.* from soil. State Agricultural Research Centre, Ghent, Belgium.
- Greco, N., D'Abbaddo, T. (1990). Efficient procedure for extracting *Tylenchulus semipenetrans* from citrus roots. *J. Nematology* 22: 590-593.
- Griffiths, B.S., Boag, B., Neilson, R., Palmer, L. (1990). The use of colloidal silica to extract nematodes from small samples of soil or sediment. *Nematologica* 36: 465-473.
- DE Grisse, A.T. (1969). Redescription ou modification de quelques techniques utilisées dans l'étude des nématodes phytoparasitaires. *Meded. Rijksfaculteit Landbouwwetenschappen Gent* 34: 351-369.
- Heip, C., Vincx, M., Vranken, G. (1985). The ecology of marine nematodes. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 23: 399-489.
- D'Herde, C.J., VAN DEN Brande, J. (1964). Distribution of *Xiphinema* and *Longidorus* spp. in strawberry fields in Belgium and a method for their quantitative extraction. *Nematologica* 10, 454-458.
- Hesling, J.J. (1952). An improved method of separating eelworm cysts from debris. *J. Helminthology* 26: 69-70.
- Hooper, D.J., Cowland, J.A., Spratt, J. (1983). Nematode specimen collection. *Report Rothamsted Experimental Station for 1982, Part I*, 167.

- Huijsman, C.A. (1957). Veredeling van de aardappel op resistentie tegen *Heterodera rostochiensis* Wollenweber. *Meded. Sticht. PlVered. Wageningen No. 14*: 85 pp.
- Hussey, R.S., Barker, K.R. (1973). A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Rept.* 57: 1025-1028.
- s'Jacob, J.J., VAN Bezooijen, J. (1984). *Manual for practical work in nematology, revised (1984) edition*. Department of Nematology, Agricultural University, Wageningen.
- Jacobs, L. (1987). *Inleiding tot de biologische kwaliteitsbeoordeling van onderwaterbodems*. DBW-RIZA, Lelystad.
- Kleijburg, P. (1960). Soil sample examination as a base for advisory work about stem eelworms. *Nematologica* 5: 22-27.
- Kort, J. (1960). A technique for the extraction of *Heterodera* cysts from wet soil and for the estimation of their egg and larval content. *Versl. Meded. PlZiektenk. Dienst Wageningen No. 233*: 6 pp.
- McSorley, R. (1987). Extraction of nematodes and sampling methods. In: *Principles and Practice of Nematode Control in Crops* (R.H. Brown, B.R. Kerry, eds.), pp. 13-41. Academic Press, Australia.
- McSorley, R., Parrado, J.L. (1981). Effect of sieve size on nematode extraction efficiency. *Nematropica* 11: 165-174.
- McSorley, R., Parrado, J.L. (1982). Estimating relative error in nematode numbers from single soil samples composed of multiple cores. *J. Nematology* 14: 522-529.
- McSorley, R., Parrado, J.L., Dankers, W.H. (1984). A quanti-tative comparison of some methods for the extraction of nematodes from roots. *Nematropica* 14: 72-84.
- Nelson, F.K., Albert, P.S., Riddle, D.L. (1983). Fine structure of the *Ceanorhabditis elegans* excretory system. *J. Ultrastruct. Res.* 82: 156-171.



- Netscher, C. (1971). A rapid technique for mass-killing of nematodes. *Nematologica* 16 (yr 1970): 603.
- Netscher, C., Seinhorst, J.W. (1969). Propionic acid better than acetic acid for killing nematodes. *Nematologica* 15: 286.
- Oostenbrink, M. (1950). Het aardappelaaltje (*H. rostochiensis* Wollenweber), een gevaarlijke parasiet voor de eenzijdige aardappelcultuur. *Versl. Meded. PlZiektenk. Dienst Wageningen No. 115*. 230 pp.
- Oostenbrink, M. (1954). Een doelmatige methode voor het toetsen van aaltjesbestrijdingsmiddelen in grond met *Hoplolaimus uniformis* als proefdier. *Meded. LandbHogesch. Gent* 19: 377-408.
- Oostenbrink, M. (1960). Estimating nematode populations by some selected methods. In: *Nematology* (J.N. Sasser, W.R. Jenkins, eds.), pp. 85-102. The University of North Carolina Press, Chapel Hill.
- Oostenbrink, M. (1970). Comparison of techniques for population estimation of soil and plant nematodes. In: *Methods of study in soil ecology* (J. Phillipson, ed.), pp. 249-255. UNESCO (Proc. Paris Symp., 1967).
- DEN Ouden, H. (1954). Het bieten cysteaaltje en zijn bestrijding. I. Methoden te gebruiken bij het onderzoek naar kunstmatige en natuurlijke lokstoffen. *Meded. Inst. Suikerprod. Bergen-o.-Zoom* 24: 101-120.
- Proctor, J.F., Marks, C.F. (1975). The determination of normalizing transformations for nematode count data from soil samples and of efficient sampling schemes. *Nematologica* 20: 395-406.
- Prot, J.C., Ferris, H. (1992). Sampling approaches for extensive surveys in nematology. *J. Nematology* 24(4S): 757-764.
- Schouten, A.J., Arp, K.K.M. (1991). A comparative study on the efficiency of extraction methods for nematodes from different forest litters. *Pedobiologia* 35: 393-400.
- Seinhorst, J.W. (1955). Een eenvoudige methode voor het afscheiden van aaltjes uit grond. *Tijdschrift voor Planteziekten* 61:188-190.

- Seinhorst, J.W. (1956). The quantitative extraction of nema-todes from soil. *Nematologica* 1: 249-267.
- Seinhorst, J.W. (1959). A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. *Nematologica* 4: 67-69.
- Seinhorst, J.W. (1962). Extraction methods for nematodes inhabiting soil. In: *Progress in Soil Zoology* (P.W. Murphy, ed.), pp. 243-256. Butterworths, London.
- Seinhorst, J.W. (1964). Methods for the extraction of *Heterodera* cysts from not previously dried soil. *Nematologica* 10: 87-94.
- Seinhorst, J.W. (1966). Killing nematodes for taxonomic study with hot f.a. 4:1. *Nematologica* 12: 178.
- Seinhorst, J.W. (1973). How small is a small drop of water? *Nematologica* 19: 121.
- Seinhorst, J.W. (1975). Separation of *Heterodera* cysts from dry organic debris using ethanol. *Nematologica* 20: 367-369.
- Southey, J.F. (ed.) (1986). *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes*. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Reference Book 402, London.
- Stemerding, S. (1964). Een mixer-wattenfilter methode om vrijbeweeglijke endoparasitaire nematoden uit wortels te verzamelen. *Versl. Meded. Plziektenk. Dienst Wageningen No. 141 (Jaarboek 1963)*, pp. 170-175.
- Stolk, M. (1989). *Methodiek-ontwikkeling voor bemonstering en verwerking van nematodenmonsters*. Stageverslag RIVM Bilthoven.
- Townshend, J.L. (1984). Anaesthesia of three nematode species with propylene phenoxetol. *Nematologica* 29 (Yr 1983): 357-360.
- Vigliierchio, D.R., Schmitt, R.V. (1983). On the methodology of nematode extraction from field samples: Baermann funnel modifications. *J. Nematology* 15: 438-444.

Vigliierchio, D.R., Yamashita, T.T. (1983). On the methodology of nematode extraction from field samples: density flotation techniques. *J. Nematology* 15: 444-449.

