

A black and white micrograph showing a dense field of plant tissue cells. Several small, circular, clear structures, likely nematodes, are scattered throughout the field. The background is a complex, granular texture of plant cells.

**BIJDRAGE TOT DE METHODIEK VAN HET EXTRAHEREN
VAN NEMATODEN UIT PLANTAARDIG WEEFSEL**

W.A. COOLEN

DISSERTATIE

1971

PROMOTOR: Prof. Dr. Ir. A. GILLARD

D453

RIJKSUNIVERSITEIT TE GENT
FACULTEIT VAN DE LANDBOUWWETENSCHAPPEN

BIJDRAGE TOT DE METHODIEK
VAN HET EXTRAHEREN
VAN NEMATODEN
UIT PLANTAARDIG WEEFSEL

W.A. COOLEN

Landbouwkundig ingenieur
Werkleider aan het Rijksstation voor Nematologie en Entomologie

PROMOTOR:
Prof. Dr. Ir. A. GILLARD

Dissertatie tot het bekomen van de graad van
Doctor in de Landbouwkundige Wetenschappen

op gezag van

Rector Ir. D. VANDEPITTE

Gewoon hoogleraar in de faculteit van de toegepaste wetenschappen

**GENT Rijksuniversiteit
Faculteit Landbouwwetenschappen
Centrale Bibliotheek**

BIJGEVOEGDE STELLINGEN

1. De verspreiding van het thermophile aaltje *Pratylenchus vulnus* ALLEN & JENSEN, 1951 is niet alleen in de kasroenteelt, maar ook in de struikrozenteelt en in de boomteelt veel belangrijker dan algemeen aangenomen wordt.
2. Het herhaald jaarlijks toepassen van het mengsel dichloorpropaan-dichloorpropeen tegen een zware dosis, heeft geen nadelige invloed op de groei en de knolopbrengst van *Begonia tuberhybrida*.
3. Het gebruik van kunstsubstraten bij de studie van de waardplant-parasiet-relaties, opent een nieuw perspectief in het nematologisch onderzoek.

WOORD VOORAF

Bij het beëindigen van dit proefschrift, beschouw ik het als een aangename plicht de volgende personen in één, groot dankwoord te betrekken :

Directeur Ir. C.J. D'HERDE, die met zijn enthousiasme, zijn nuchter oordeel en zijn rijke ondervinding dit werk dagelijks geïnspireerd en gestimuleerd heeft,

Professor Dr. Ir. A. GILLARD, die het promotorschap aanvaardde en die van de aanvang af en van dichtbij, met zijn scherp- en zachtzinnige opbouwende kritiek, mede de lijn van het onderzoek bepaalde,

Dr. Ir. M. OOSTENBRINK, Lector in de Nematologie aan de Landbouwhogeschool te Wageningen, mijn oud-professor, aan wie gevraagd werd dit werk te beoordelen en die dit op een doordringende wijze deed,

Professor Dr. Ir. G. BOESMAN, die het werk geïnteresseerd van uit het standpunt van een botanicus benaderde en verrijkte,

De heer Ir. F. LIEVENS, Directeur-generaal van het *Bestuur voor Landbouwkundig Onderzoek* en de heer Ir. A. VAN SLIJCKEN, Directeur van het *Rijkscentrum voor Landbouwkundig Onderzoek, Gent*, voor de daadwerkelijke steun welke ze verleenden door het creëren van een Werkgroep welke de noodzakelijke medewerkers aanbracht om dit en het andere nematologische onderzoek op het Station mogelijk te maken,

De heren Ir. J. GOORIS, t. ing. G. HENDRICKX en A. VOET, wier rijke verbeeldingskracht en vindingrijkheid dit werk veel ten goede zijn gekomen,

Ir. J. HEURSEL van het *Rijksstation voor Sierplantenteelt* en Prof. Dr. Ir. A. ROTTI en Ir. R. MOERMANS van het *Bureau voor Biometrie, sectie Gent*, voor de statistische begeleiding van het onderzoek,

Mijn collega's van het **Station**, Ir. R. DE CLERCQ, en Dr. Ir. O. VAN LAERE voor de vele interessante discussies,

Alle huidige en gewezen medewerkers van het *Rijksstation voor Nematologie en Entomologie* en van de *Werkgroep voor de studie van de dierlijke parasieten in de sierplantenteelt en van hun bestrijding*, welke elk op hun specifiek domein hun steen bijdroegen en waarvan ik de namen graag citeer :

J. VAN HOOREN, M. GHYS-VANDEPUTTE, C. SLEURS, A. PAUWELS, E. DE RUDDER, G. DE SUTTER, G. MORTIER, A. BOONE, D. DAEM, I. VANDERHAEGEN-DE PAUW, H. BRUSSELMANS en C. DE GROOT.

En tenslotte mejuffrouw D. KEERSTOCK en de heren M. GILLIS, R. VAN IMMERSEEL, A. VOET, A. DEREË en F. DE KEULENAER, welke de presentatie verzorgden en wier aandeel achteraan in de colofon vermeld wordt.

INHOUD

	blz.
WOORD VOORAF	
INHOUD	1
LIJST DER TABELLEN	3
LIJST DER FIGUREN	5
INLEIDING	7
HOOFDSTUK I. VOORSTELLING VAN DE METHODE	10
HOOFDSTUK II. VRIJMAKEN VAN DE NEMATODEN UIT HET WORTELWEEFSEL	20
2.1. PRINCIPE	20
2.2. VERHOUDING HOEVEELHEID WATER - HOEVEELHEID WORTELS	22
2.3. COMBINATIE DRAAISNELHEID - DRAAIDUUR	23
2.3.1. Onderzoekschema	23
2.3.1.1. Wortelsoorten	23
2.3.1.2. Groepen van nematoden	23
2.3.1.3. Ontwikkelingsstadia der nematoden	23
2.3.1.4. Mix-combinaties	24
2.3.1.5. Voorbereiding	24
2.3.1.6. Statistische verwerking	24
2.3.2. Resultaten en bespreking	25
2.3.2.1. Gezwollen stadia	25
2.3.2.2. Eitjes en J ₂ -stadia van <i>Meloidogyne</i>	30
2.3.2.3. Vrij beweeglijke endoparasiterende nematoden	36
2.3.3. Besluit	39
HOOFDSTUK III. SCHEIDEN VAN DE NEMATODEN UIT HET MIXTUM	40
3.1. REDUCTIE VAN HET MENGSEL	40
3.1.1. <i>Meloidogyne</i>	40
3.1.2. Andere endoparasiterende nematoden	43
3.2. CENTRIFUGEREN	43
3.2.1. Principe	43
3.2.2. Factoren welke het rendement beïnvloeden	44

3.2.2.1. Relatieve centrifugaalkracht	44
3.2.2.2. Draaiduur	44
3.2.2.3. Gebruikte scheidingsvloeistof	45
3.2.2.3.1. Invloed op het rendement	45
3.2.2.3.2. Invloed op de kwaliteit	47
3.2.2.3.3. Besluit	50
3.2.3. Rol van het kaolien	51
3.2.4. Bepalen van het rendement	52
3.2.4.1. <i>Meloidogyne</i>	52
3.2.4.1.1. Eitjes en J ₂ -stadia	52
3.2.4.1.2. Gezwollen stadia	55
3.2.4.1.3. Interpretatie	56
3.2.4.2. Andere endoparasiterende nematoden	57
3.3. SCHEIDEN VAN DE NEMATODEN UIT DE SUIKEROPLOSSING	58
3.3.1. Gezwollen stadia	58
3.3.2. Eitjes en J ₂ -stadia van <i>Meloidogyne</i>	58
3.4. TELLEN VAN DE NEMATODENSUSPENSIES	62
3.5. BESCHRIJVING VAN HET MATERIEEL	63
HOOFDSTUK IV. <i>NUT VAN DE METHODE</i>	67
4.1. VOORDELEN VAN DE METHODE	67
4.1.1. Eenvoud	67
4.1.2. Snelheid	67
4.1.3. Betrouwbaarheid	70
4.1.3.1. <i>Meloidogyne</i>	72
4.1.3.2. Vrij beweeglijke endoparasiterende nematoden	73
4.1.3.3. Besluit	75
4.2. TOEPASSINGEN VAN DE METHODE	76
4.2.1. Studie van de nematoden op zichzelf	76
4.2.2. Studie van de ontwikkelingscyclus van de nematoden	76
4.2.3. Resistentie-onderzoek	79
4.2.4. Fytopsanitaire voorlichting en inspectie	84
<i>SAMENVATTING</i>	87
<i>BIJLAGEN</i>	90
<i>LITERATUUR</i>	97

LIJST DER TABELLEN

blz.

1. Verloop van de gemiddelde aantallen gezwollen juveniele stadia (J_3 - J_4) van *Meloidogyne naasi*, voor *tarwewortels*, bekomen bij verschillende combinaties van draaisnelheid en draaiduur van de mixer 26
2. Verloop van de gemiddelde aantallen wijfjes van *Meloidogyne naasi*, voor *tarwewortels*, bekomen bij verschillende combinaties van draaisnelheid en draaiduur van de mixer 26
3. Verloop van de gemiddelde aantallen wijfjes van *Meloidogyne hapla*, voor *rozewortels*, bekomen bij verschillende combinaties van draaisnelheid en draaiduur van de mixer 27
4. Verloop van de gemiddelde aantallen eitjes en J_2 -stadia van *Meloidogyne naasi*, voor *tarwewortels*, bekomen bij verschillende combinaties van draaisnelheid en draaiduur van de mixer 31
5. Verloop van de gemiddelde aantallen eitjes en J_2 -stadia van *Meloidogyne hapla*, voor *rozewortels*, bekomen bij verschillende combinaties van draaisnelheid en draaiduur van de mixer 35
6. Verloop van de gemiddelde aantallen eitjes en beweeglijke stadia van *Pratylenchus penetrans*, voor *Acer-wortels*, bekomen bij verschillende combinaties van draaisnelheid en draaiduur van de mixer 38
7. Vergelijking van de gemiddelde aantallen eitjes en J_2 -stadia van *Meloidogyne* bekomen door centrifugatie met respectievelijk een suiker- en een NaCl-oplossing als scheidingsvloeistof, bij 3 verschillende dichtheden 46

8. Vergelijking van de gemiddelde aantallen eitjes en beweeglijke stadia van *Pratylenchus*, bekomen door centrifugatie met respectievelijk een suiker-, een NaCl- en een ZnSo₄-oplossing als scheidingsvloeistof, bij 3 verschillende dichtheden 46
9. Vergelijking van de kwaliteit der nematoden, bekomen door centrifugeren bij het gebruik van een suiker-, een NaCl- en een ZnSo₄-oplossing 49
10. Norm- en procestijden voor de extractie van endoparasiterende nematoden uit plantaardig weefsel 70
11. Vergelijking tussen de gemiddelde aantallen eitjes en J₂-stadia van *Meloidogyne*, bekomen met de mixer-centrifugemethode en deze verkregen met 3 andere courant gebruikte extractie-technieken 73
12. Vergelijking tussen de gemiddelde aantallen beweeglijke stadia van vrij beweeglijke endoparasiterende nematoden bekomen met de mixer-centrifugemethode en deze verkregen met 3 andere gebruikte extractie-technieken 74
13. Vergelijking van de ontwikkeling van *Heterodera rostochiensis*, biotype A, in een vatbare (BINTJE) en in een resistente (SCALDIA) aardappelvariëteit 77
14. Onderzoek naar de invloed van systemische nematiciden op de ontwikkeling van *Meloidogyne naasi* 78
15. Onderzoek van 11 rozenonderstammen op hun resistentie tegen *Meloidogyne hapla* 80
16. Onderzoek van 13 rozenonderstammen op hun resistentie tegen *Pratylenchus penetrans* 82

LIJST DER FIGUREN

	blz.
1. Schematische voorstelling van de methode voor de extractie van endoparasiterende nematoden uit plantaardig weefsel	13
2. Algemeen beeld van de laboratoriumuitrusting	14
3. Wijfjes van <i>Meloidogyne naasi</i> afgezonderd uit tarwewortels	16
4. Eitjes van <i>Meloidogyne naasi</i> afgezonderd uit tarwewortels	16
5. Gezwollen juveniele stadia van <i>Heterodera rostochiensis</i> , afgezonderd uit aardappelwortels	17
6. Jonge wijfjes van <i>Heterodera avenae</i> afgezonderd uit haverwortels	17
7. Verloop van de gemiddelde aantallen gezwollen juveniele stadia (J_3 - J_4) van <i>Meloidogyne naasi</i> , voor tarwewortels, bekomen bij verschillende combinaties van draaisnelheid en draaiduur van de mixer	28
8. Verloop van de gemiddelde aantallen wijfjes van <i>Meloidogyne naasi</i> , voor tarwewortels, bekomen bij verschillende combinaties van draaisnelheid en draaiduur van de mixer	28
9. Verloop van de gemiddelde aantallen wijfjes van <i>Meloidogyne hapla</i> , voor rozewortels, bekomen bij verschillende combinaties van draaisnelheid en draaiduur van de mixer	32
10. Verloop van de gemiddelde aantallen eitjes en J_2 -stadia van <i>Meloidogyne naasi</i> , voor tarwewortels, bekomen bij verschillende combinaties van draaisnelheid en draaiduur van de mixer	32

- | | |
|---|----|
| 11. Verloop van de gemiddelde aantallen eitjes en J ₂ -stadia van <i>Meloidogyne hapla</i> , voor rozewortels, bekomen bij verschillende combinaties van draaisnelheid en draaiduur van de mixer | 37 |
| 12. Verloop van de gemiddelde aantallen eitjes en beweeglijke stadia van <i>Pratylenchus penetrans</i> , voor <i>Acer-wortels</i> , bekomen bij verschillende combinaties van draaisnelheid en draaiduur van de mixer | 37 |
| 13. Schematische voorstelling van de homogenisatiekruik | 42 |
| 14. Eitjes en beweeglijke stadia van <i>Pratylenchus penetrans</i> , afgezonderd uit rozewortels | 48 |
| 15. Apparatuur voor het afzonderen van de eitjes en de beweeglijke stadia uit de suikeroplossing | 59 |
| 16. Apparatuur voor het tellen van nematodensuspensies | 64 |
| 17. Eitjes en beweeglijke stadia van <i>Ditylenchus dipsaci</i> , afgezonderd uit voederbietenknollen | 81 |
| 18. Worteltjes van <i>Rosa dumetorum</i> THUILL. ' <i>Laxa</i> ', aangetast door <i>Meloidogyne hapla</i> | 81 |
| 19. Langsdoorsnede van wortels van <i>Monstera deliciosa</i> LIEBM. ' <i>Borsigiana</i> ', aangetast door <i>Meloidogyne arenaria</i> | 83 |
| 20. Galletjes op rozewortels, veroorzaakt door <i>Xiphinema diversicaudatum</i> | 83 |

INLEIDING

Oriënterende onderzoeken deden vermoeden dat tussen de verschillende roze-onderstammensoorten een gradatie in vatbaarheid bestaat voor aantasting door *Meloidogyne hapla*.

Gezien het grote belang voor de telers te kunnen beschikken over resistente onderstammen werd een systematisch onderzoek naar de vatbaarheid van 11 verschillende onderstammen opgezet.

Hierbij stelde zich het probleem van een voldoende verfijnde methode te vinden voor de kwantitatieve uitdrukking van de populatiedichtheid van die parasiet in de wortels.

De mogelijkheden die hiertoe bestonden kunnen, in het algemeen, als volgt geschetst worden :

Indexeermethodes

Hierbij worden de wortels ingedeeld in categorieën naargelang de sterkte van de wortelbegalling. Voorbeelden van dergelijke indices zijn : de *Root-gall Index* (MILES & TURNER, 1928) en de *Root-knot Index* (SMITH & TAYLOR, 1947).

Andere auteurs namen als maat van aantasting de waargenomen aantallen eipropjes, zoals bv. de *Infection Index* van KUSHMAN & MACHMER (1947).

Tenslotte zijn er indices waar de reactie van de plant (begalling) en deze van de parasiet (aantallen rijpe wijfjes en hun afgelegde eitjes) gecombineerd worden (SASSER, 1954; GILLARD, 1961).

Een selectie van de essentieel weinig van elkaar verschillende variaties op bovenvermelde principes werd gegeven door CAIRNS in 1960. Sindsdien werd in de omvangrijke literatuur weinig substantieels op dit gebied bijgebracht.

Het nadeel van dergelijke appreciaties is dat ze alle subjectief zijn. Daarenboven zijn ze tijdrovend en vermoeiend, en voor de wortels van bepaalde plantesoorten zelfs onmogelijk, doordat zelfs bij een sterke besmetting geen gallen of eiklompjes op de wortels te bespeuren zijn.

Extractiemethodes

Deze kunnen tot twee groepen herleid worden :

Incubatie

Het principe bestaat erin dat de nematoden in een vochtig, zuurstofrijk gehouden milieu door eigen activiteit het plantaardig weefsel verlaten.

Deze methoden zijn alle als modificaties van de trechter van BAERMANN (1917) te beschouwen (YOUNG, 1954; MOUNTAIN & PATRICK, 1959; SEINHORST, 1950; OOSTENBRINK, 1960; CHAPMAN, 1957). De mixer-wattenfiltermethode van STEMERDING (1964) combineert de incubatie met een voorafgaandelijke kneuzing der wortels.

Toetsen we deze technieken op hun bruikbaarheid voor de extractie van *Meloidogyne* dan blijkt dat het resultaat volledig afhangt van het ontwikkelingsstadium waarin de parasiet zich in de wortels bevindt. Alleen de juvenielen van het tweede stadium welke zich in het wortelweefsel bevinden of tijdens de incubatie uit het ei geslopen zijn, kunnen gelokt worden.

Maceratie

Met behulp van een mixer worden de nematoden uit het plantaardig weefsel geëxtraheerd (TAYLOR & LOEGERING, 1953; FENWICK, 1963; DROPKIN et al., 1960). Deze methoden hebben het voordeel dat, mits het in acht nemen van een aangepaste verblijfsduur in de mixer, ook de gezwollen stadia en de eitjes van *Meloidogyne* kunnen vrijgemaakt worden. Wordt echter, zoals dit bij de geciteerde auteurs het geval is, in het daaropvolgende zuiveringsproces van het mengsel van de nematoden en de wortelresten een zeef ingeschakeld, dan gaat een belangrijk gedeelte van de inhoud verloren.

CAVENESE & JENSSEN (1955) hielden met dit nadeel rekening en ontwierpen een methode waar uiteindelijk geen zeven bij te pas kwamen. Ze modificeerden daartoe de centrifugedrijftechniek van FAUST et al. (1938).

Een mengsel van grond of gemacereerd plantaardig materiaal en water werd een eerste maal gecentrifugeerd om het water te verwijderen. Het resuspenderen van het sediment in een zware suikeroplossing deed na een tweede centrifugatiebeurt de nematoden bovendrijven. Onmiddellijk daarop werd deze oplossing uitgegoten in een relatief groot volume water. Na een voldoende wachttijd werd aangenomen dat alle nematoden bezonken waren en werd het overtollige water gedecanteerd.

Een combinatie van het mixer-principe en de hierboven beschreven centrifugedrijfmethode beantwoordde het best aan ons doel.

Door het bepalen van de optimale maceratie-duur voor elk ontwikkelingsstadium van *Meloidogyne* voor uiteenlopende worteltypes, en door het aanbrengen van belangrijke modificaties aan de centrifugedrijfmethode kwam een nauwkeurige, reproduceerbare extractiemethode tot stand. Van deze modificaties werd een summier overzicht gegeven op het *XXI Internationaal Symposium over Fytofarmacie en Fytiatrie* te Gent in 1969 (COOLEN, GOORIS & D' HERDE).

Bij verder onderzoek bleek dat deze methode ook geschikt was voor de extractie van de gezwollen juveniele stadia van *Heterodera* uit wortels, en van beweeglijke endoparasiterende nematoden uit wortels en andere plantaardige weefsels, wat meteen de algemeenheid van de titel van het proefschrift motiveert.

HOOFDSTUK I

VOORSTELLING VAN DE METHODE

Alvorens in te gaan op de redenering die geleid heeft tot het ontwerpen en het uitwerken van de methode, wordt het procédé op een summiere wijze voorgesteld, geïllustreerd met een schematische voorstelling (fig. 1, blz. 13) en met een beeld van de laboratoriumopstelling (fig. 2, blz. 14).

Vooreerst wordt de gebruikte terminologie in verband met de nematoden, welke in dit overzicht en tevens in het ganse werk voorkomt, toegelicht. Tevens wordt een afspraak gemaakt nopens de nomenclatuur van nematoden en planten.

Terminologie

De verschillende ontwikkelingsstadia der nematoden werden als volgt samengevat :

Gezwellen stadia

Deze groep omvat :

- alle gezwellen juveniele en adulte stadia van het sedentaire endoparasiterende geslacht *Meloidogyne*. In de volgende hoofdstukken wordt verder nog onderscheid gemaakt tussen :
 - juveniele vormen van het 3e en het 4e stadium (J_3 - J_4)
 - jonge en eileggende wijfjes
- alle gezwellen juveniele stadia en jonge wijfjes van het sedentaire semi-endoparasiterende geslacht *Heterodera*.

Eitjes en beweeglijke stadia

Hierin zijn begrepen :

- de eitjes en de juvenielen van het 2e stadium (J_2) van *Meloidogyne*

- de eitjes en alle juveniele en adulte stadia van de vrij beweeglijke endoparasiterende nematoden, zoals vertegenwoordigers van de geslachten *Pratylenchus*, *Radopholus*, *Ditylenchus*.

Nomenclatuur

We laten hierna de wetenschappelijke benamingen volgen van de genera en species welke in het overzicht of in het ganse werk geciteerd worden. Voor de nematologische nomenclatuur werd gesteund op TARJAN (1960) en GRASSE (1965) of op de originele beschrijvingen, terwijl voor de botanische nomenclatuur BOOM (1968 a en b) gevolgd werd. In de loop van de besprekingen worden, om praktische redenen, de auteurs weggelaten, en soms wordt zelfs de naam van het genus op conventionele wijze afgekort.

Nematoden

Meloidogyne GOELDI, 1887

- *Meloidogyne arenaria* (NEAL, 1889) CHITWOOD, 1949
- *Meloidogyne hapla* CHITWOOD, 1949
- *Meloidogyne incognita* (KOFOID & WHITE, 1919) CHITWOOD, 1949
- *Meloidogyne naasi* FRANKLIN, 1965
- *Meloidogyne deconincki* ELMILIGY, 1968

Heterodera SCHMIDT, 1871

- *Heterodera rostochiensis* WOLLENWEBER, 1923
- *Heterodera avenae* WOLLENWEBER, 1924

Pratylenchus FILIPJEV, 1934

- *Pratylenchus penetrans* (COBB, 1917) FILIPJEV & SCHUURMANS STEKHOVEN, 1941

Radopholus THORNE, 1949

- *Radopholus similis* (COBB, 1893) THORNE, 1949

Nacobbus THORNE & ALLEN, 1944

- *Nacobbus serendipiticus* FRANKLIN, 1959

Ditylenchus FILIPJEV, 1934

- *Ditylenchus dipsaci* (KUEHN, 1857) FILIPJEV, 1936

Xiphinema COBB, 1913

- *Xiphinema diversicaudatum* (MICOLETZKY, 1927) THORNE, 1939

Planten

Begonia L.

- *Begonia tuberhybrida* VOSS

Acer L.

- *Acer pseudoplatanus* L.

Calathea G. MEYER

- *Calathea makoyana* MORR.

Monstera ADANS.

- *Monstera deliciosa* LIEBM. 'Borsigiana'

Rosa L.

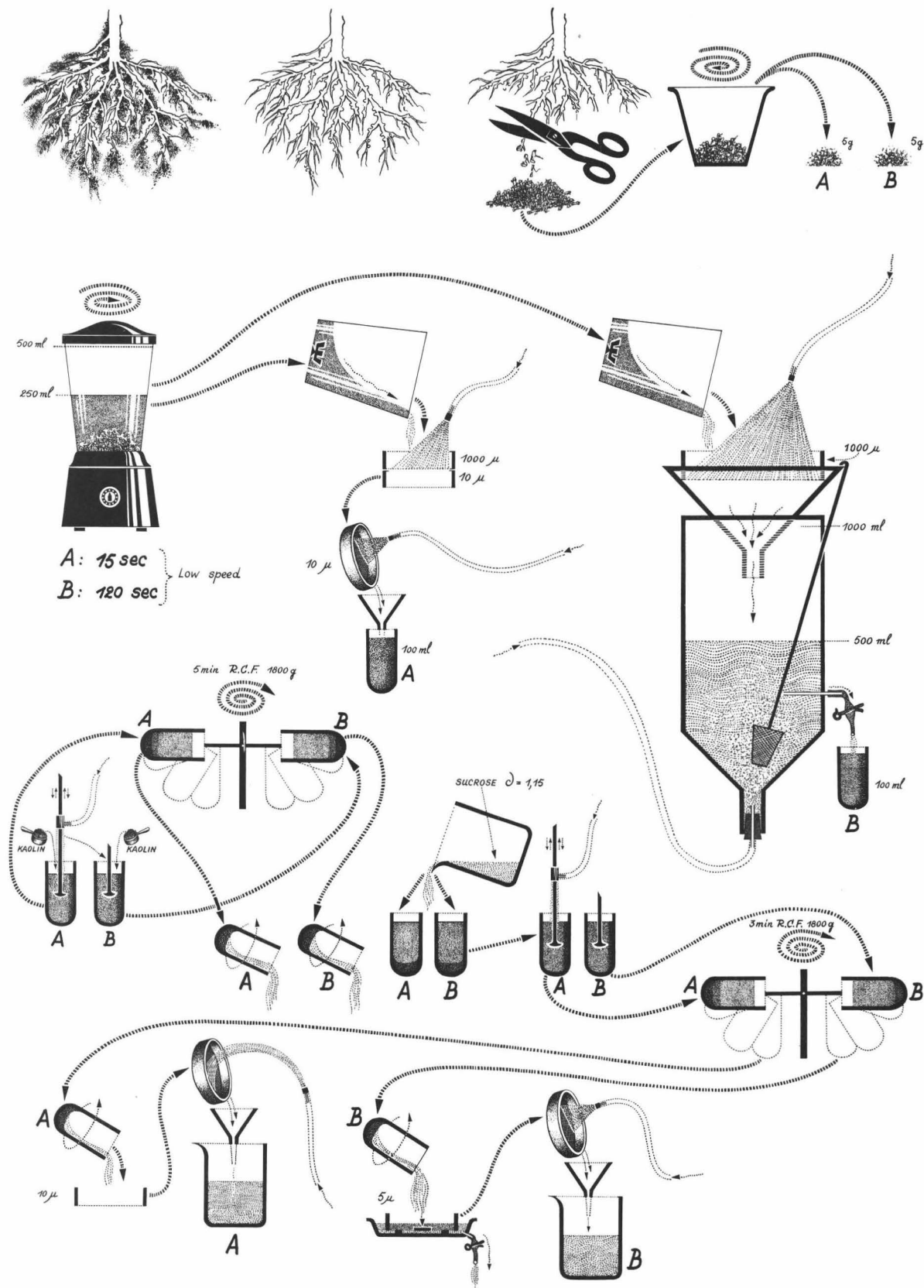
- De wetenschappelijke namen van de rozesoorten werden onverkort in de tekst opgenomen (tabellen 15 en 16, blz 80 en 82).

Voorstelling van de methode

1.1. Vorbereiding van het wortelmonster

Het wortelmateriaal wordt goed gewassen, in stukjes van ongeveer een halve centimeter geknipt, gehomogeniseerd door grondig omroeren in een groot volume water, verzameld op een zeef en van het overtollige water bevrijd.

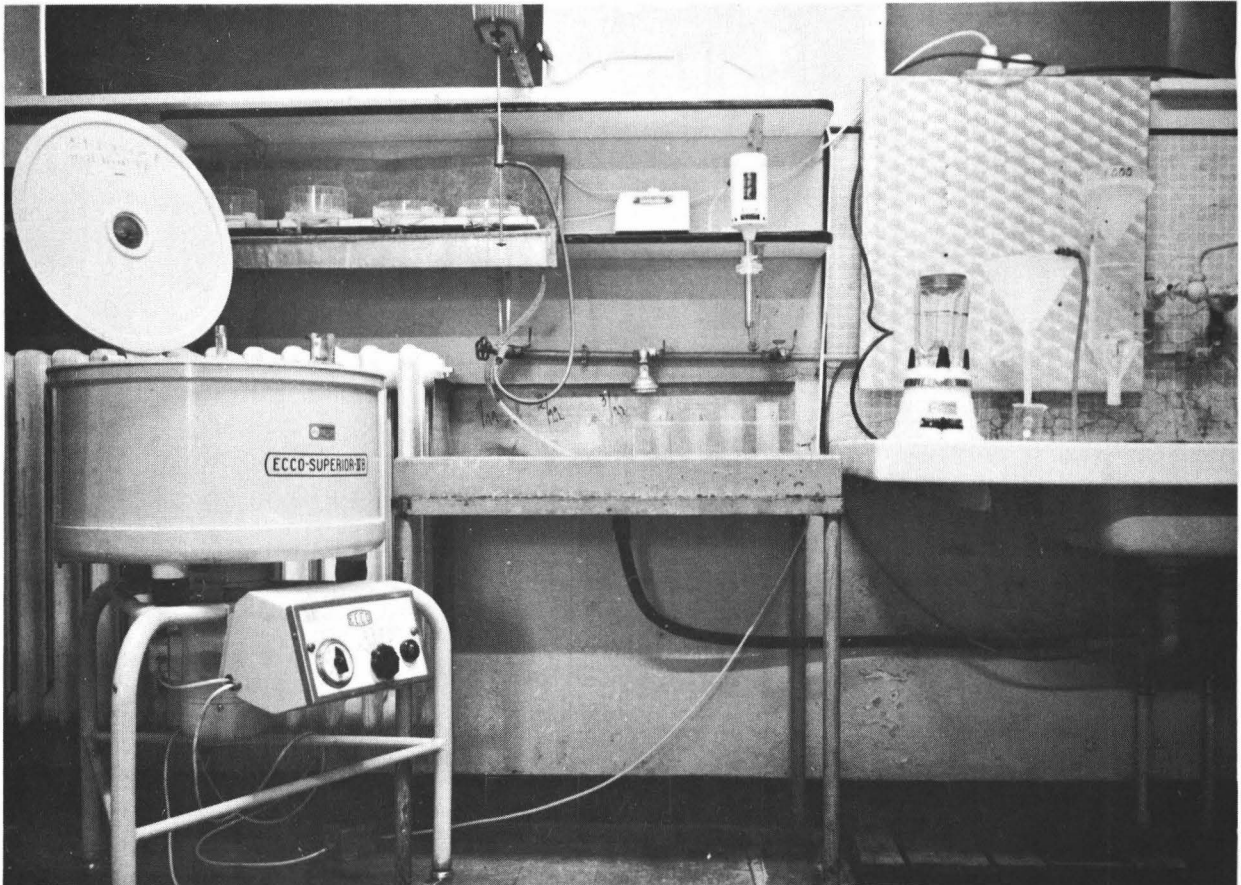
Gaat het om een onderzoek op de aanwezigheid van *Meloidogyne* dan wordt twee maal 5 gram uitgepikt. Het ene monster is bestemd voor het onderzoek op de *gezwollen stadia* (A) en het andere voor dit op de eitjes en de J_2 -stadia (B).



Figuur 1

Schematische voorstelling van de methode voor de extractie van endoparasiterende nematoden uit plantaardig weefsel

- A : opgezwellen stadia
- B : eitjes en beweeglijke stadia



Figuur 2

Algemeen beeld van de laboratoriumuitrusting

Wil men een besmetting hetzij met *Heterodera* hetzij met *vrij beweeglijke endoparasiterende nematoden* (*Pratylenchus*, *Radopholus*) opsporen, dan volstaat het onderscheidenlijk de weg A of B te volgen tot op het einde van het extractieproces.

1.2. Vrijmaken van de nematoden uit de weefsels

Het vrijmaken van de nematoden uit de weefsels gebeurt met behulp van een mixer WARING BLENDOR, voorzien van twee draaisnelheden. De mixerbokaal, met een inhoud van een halve liter, wordt voor de helft gevuld met water. De draaiduur voor de *gezwollen stadia* (A) en voor de *eitjes en de beweeglijke stadia* (B) bedraagt respectievelijk 15 en 120 seconden, bij de lage draaisnelheid van de mixer.

1.3. Scheiden van de nematoden uit het mixtum

1.3.1. Reduceren van het mengsel

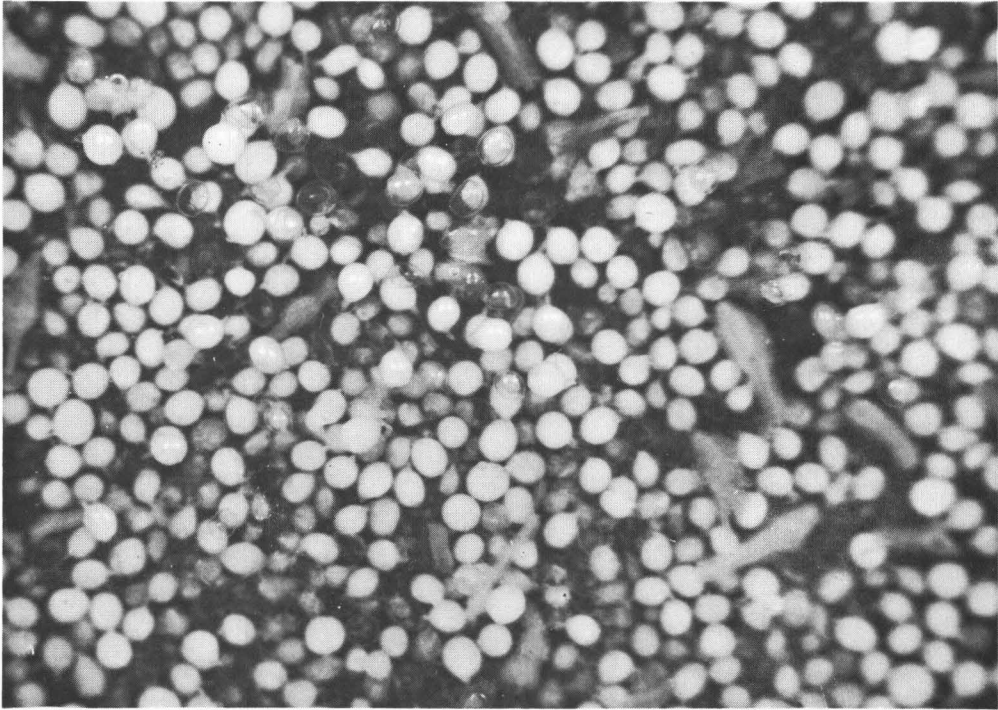
Gezwollen stadia (A)

Het mixtum wordt gegoten op een 1 000 μ -zeef geplaatst op een 10 μ -zeef. Het residu op de bovenste zeef wordt grondig gewassen met een krachtige, fijne, waaiervormige waterstraal geleverd door een nevelspuit met laag debiet. Daarna wordt de inhoud van de 1 000 μ -zeef verwijderd en deze van de 10 μ -zeef overgespoeld in een centrifugebuis van 100 ml.

Eitjes en beweeglijke stadia (B)

De suspensie wordt uitgegoten op een 1 000 μ -zeef geplaatst op een homogenisatiekruik en doorgespoeld met de nevelspuit tot de kruik voor 1/2 liter gevuld is.

Het mengsel wordt gedurende een paar minuten gehomogeniseerd bij middel van toegevoerde perslucht, en dan wordt van het borrelende mengsel 100 ml afgetapt in een centrifugebuis.



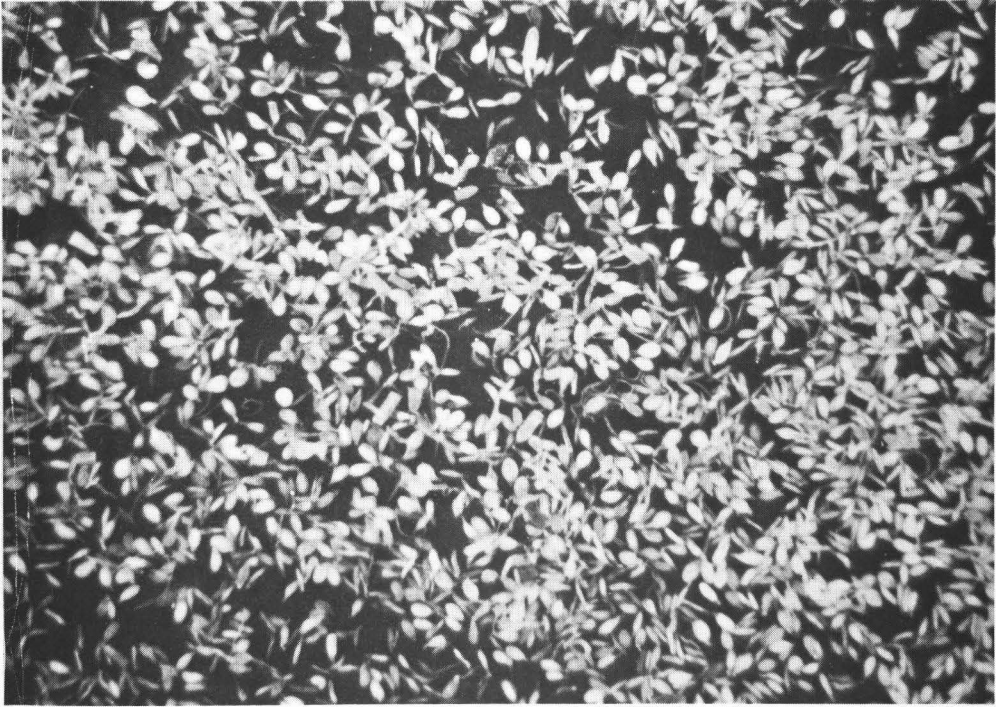
Figuur 3

Wijfjes van *Meloidogyne naasi*, afgezonderd uit tarwewortels
Besmettingsgraad : 2 300 per 5 gram wortels



Figuur 4

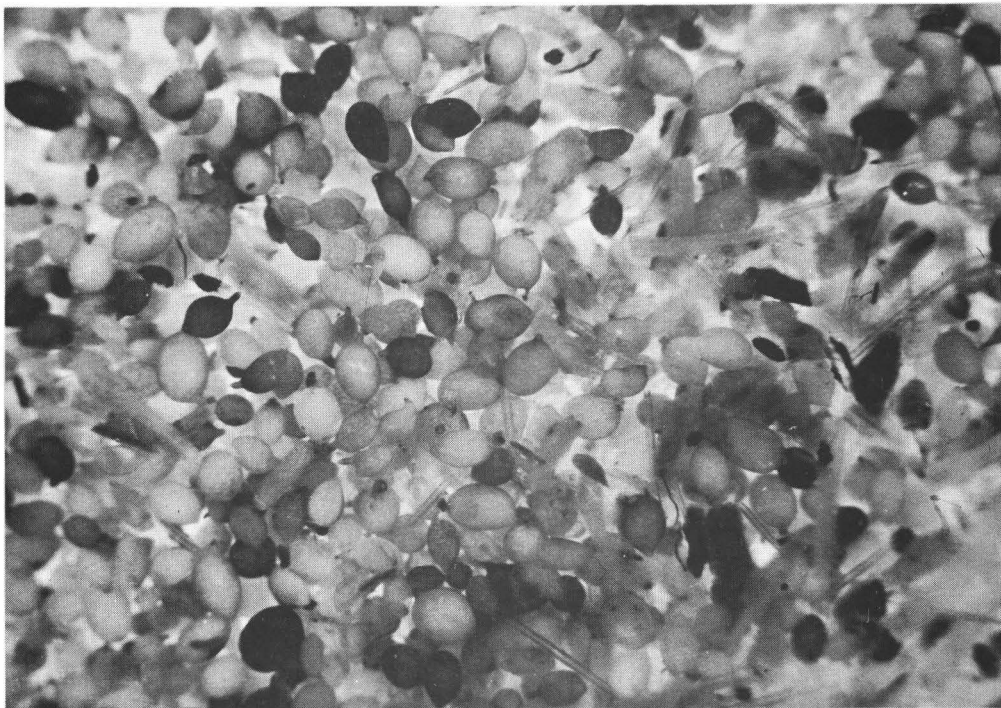
Eitjes van *Meloidogyne naasi*, afgezonderd uit tarwewortels
Besmettingsgraad : 675 000 per 5 gram wortels



Figuur 5

Gezwellen juveniele stadia van *Heterodera rostochiensis*, afgezonderd uit aardappelwortels

Besmettingsgraad : 5 100 per 5 gram wortels



Figuur 6

Jonge wijfjes van *Heterodera avenae*, afgezonderd uit haverwortels

Besmettingsgraad : 340 per 5 gram wortels

1.3.2. Centrifugeren van het mengsel

1.3.2.1. Toevoegen van kaolien

Aan de buizen met de *gezwollen stadia* (A) en met de *eitjes en de beweeglijke stadia* (B) wordt 1 ml kaolien toegevoegd en innig met de suspensie vermengd door middel van een trilroerder welke na iedere handeling grondig gereinigd wordt.

1.3.2.2. Centrifugeren

Eerste centrifugatie-fase

Het mengsel in water wordt gedurende 5 minuten gecentrifugeerd met een relatieve centrifugaalkracht (R.C.K.) van 1 800 g's. Daarna wordt het bovenstaande water afgegoten.

Tweede centrifugatie-fase

Na het vermengen van het sediment met een suikeroplossing ($\delta = 1,15$) door middel van de trilroerder gedurende minstens 30 seconden, wordt 3 minuten gecentrifugeerd bij eenzelfde R.C.K.-waarde.

1.3.2.3. Afzonderen van de nematoden uit de suikeroplossing

Gezwollen stadia (A)

De buis wordt uitgegoten over een zeef met een maaswijdte van 10 μ . De vangst wordt met de nevelspuit gebracht in 100 ml water.

Eitjes en beweeglijke stadia (B)

De suikeroplossing wordt uitgegoten op een 5 μ -zeefje dat geplaatst is in een schaalte dat voorafgaandelijk gevuld is met dezelfde vloeistof tot de mazen van de zeef even bedekt zijn.

Na even wachten wordt het schaalte zijdelings onderaan zachtjes geledigd. De eitjes en de beweeglijke stadia op de zeef worden met de nevelspuit gewassen in 100 ml water.

De figuren 3 en 4, blz. 16, geven respectievelijk een idee van de kwantiteit en de kwaliteit van de vrijgemaakte wijfjes en eitjes van *Meloidogyne naasi* uit tarwewortels. De figuren 5 en 6, blz. 17, doen hetzelfde voor de gezwollen juveniele stadia van *Heterodera rostochiensis* en jonge wijfjes van *Heterodera avenae*, geëxtraheerd respectievelijk uit aardappel- en haverwortels.

Tenslotte wordt in fig. 14, blz. 48, en in fig. 17, blz. 81, een detail gegeven van suspensies van geëxtraheerde vrij bewegelijke endoparasiterende nematoden en hun eitjes, in casu *Pratylenchus penetrans* en *Ditylenchus dipsaci*.

HOOFDSTUK II

VRIJMAKEN VAN DE NEMATODEN UIT HET WORTELWEEFSEL

2.1. PRINCIPE

Het vrijmaken van de nematoden uit het wortelweefsel gebeurt door het fijnhakken van wortelstukjes met behulp van een mixer. Deze bewerking wordt in de verdere tekst samengevat in het woord "mixen". Ofschoon mixen letterlijk alleen "mengen" betekent, is het in de sfeer van het nematologisch onderzoek ook in de betekenis van fijnmaken goed ingeburgerd. We nemen dezelfde vrijheid in verband met de afleidingen van dit woord, zoals mixduur, mixproces, enz., waar evenmin aan de oorspronkelijke betekenis gedacht wordt.

Voorafgaandelijk werden twee mixertypes, met uiteenlopende werkingsprincipes, met elkaar vergeleken :

- Een zogenaamde *kolloïdmolen*, ULTRA TURAX, type TP 18/2, gebruikt o.a. voor het desagregeren en dispergeren van plantaardige en dierlijke weefsels.

Hij bestaat uit 3 delen :

- de *rotor*, d.i. een ronde massieve metalen staaf, waarop onderaan 2 vierkante balkjes evenwijdig met de as, diametraal tegenover elkaar geplaatst zijn. De afmetingen van zo'n balkje bedragen 10 en 3 mm.

- de *stator*, d.i. een metalen huls met een diameter van 18 mm, waarin de rotor nauwaansluitend past. De stator is onderaan, over een hoogte van 10 mm, voorzien van 10 kepen van 2 mm breed.

- de *motor*, met een vermogen van 75 Watt bij een spanning van 220 Volt en met een toerental van 20 000 omwentelingen per minuut zonder belasting.

Het voor de hand liggende voordeel van een dergelijk toestel was dat het mixproces in de centrifugebuis van 100 ml kon verlopen, zodat de overgang naar de centrifuge rechtstreeks kon gebeuren. Het grote, onoverkomelijke bezwaar was evenwel dat de kwaliteit van de dieren nadelig beïnvloed werd, zelfs bij korte draaiduren of lagere draaisnelheid (x). Dit was vooral belangrijk voor de gezwollen stadia, en ook voor de vrij beweeglijke endoparasieten, zoals *Pratylenchus*, waar een groot gedeelte der aaltjes gebroken waren of onherkenbaar gemaakt. Om die reden werd van het gebruik van de kolloïdmolen afgezien.

- Het tweede getoetste toestel was een *laboratorium-mixer*, type WARING BLENDOR, bestaande uit een statief met ingebouwde motor en een afneembare bokaal. De motor heeft een vermogen van 800 Watt bij een spanning van 220 Volt en 2 toeren-tallen, nl. 12 600 en 20 500 omwentelingen per minuut bij nullast. De glazen bokaal, met een inhoud van 500 ml, is op de bodem voorzien van een viervleugelige snijdende schroef. Hij heeft een dwarsprofiel in de vorm van een klavertje van vier, te wijten aan de inspringende lijsten in de wand, waardoor de inhoud voortdurend een krachtige stuwning naar de draaiende messen ondergaat.

Aan het laatste mixertype werd de voorkeur gegeven omdat, bij de gewenste verhouding tussen de hoeveelheid water en de hoeveelheid wortels in de bokaal en bij de optimale combinatie van draaisnelheid en draaiduur, voor elke getoetste nemato-desoort en hun respectieve ontwikkelingsstadia, zeer goede resultaten bekomen worden, zowel op het kwantitatieve als op het kwalitatieve vlak. De studie van de opgesomde factoren maakt het voorwerp van onderhavig hoofdstuk uit.

(x) gerealiseerd door het verlagen van de spanning door het tussenschakelen van een regelbare autotransformator.

2.2. VERHOUDING HOEVEELHEID WATER - HOEVEELHEID WORTELS

De hoeveelheden water en wortels werden als volgt bepaald :

- *Hoeveelheid water*

De bovengrens van de hoeveelheid water in de beker wordt bepaald door de hoeveelheid welke nodig is om voor het daaropvolgend homogenisatieproces van de suspensie het residu op de 1 000 μ -zeef grondig na te wassen. Deze bedraagt 250 ml zodat de hoeveelheid in de beker hoogstens 250 ml mag bedragen om het benodigde totaal van 500 ml te bereiken.

De ondergrens **is** deze hoeveelheid waarbij de wanden en het deksel van de beker voortdurend door de wervelende vloeistof bestreken worden zodat geen enkel deeltje van de suspensie blijvend of onregelmatig aan het contact met de messen onttrokken wordt. Dit blijkt het geval te zijn vanaf 150 ml, zodat uiteindelijk 250 ml het best aan beide voorwaarden voldoet.

- *Hoeveelheid wortels*

Het wortelstaal komt als volgt tot stand : de totale hoeveelheid wortels welke voor extractie in aanmerking komt (in het geval van houtige wortelgestellen zijn dit alleen de fijnere worteltjes) wordt na zorgvuldig wassen geknipt in stukjes van een halve centimeter. Het geheel wordt grondig omgeroerd in een relatief groot volume water en terug verzameld op een zeef. Aldus wordt de hoogst mogelijke homogenisatiegraad bereikt. Na het verwijderen van het overtollige water worden uit de koek plukjes wortels genomen tot 5 gram bekomen wordt.

2.3.COMBINATIE DRAAISNELHEID - DRAAIDUUR

2.3.1.Onderzoekschema

Bij het onderzoek naar de optimale combinatie van draaisnelheid en draaiduur werden een paar uiteenlopende groepen van nematoden betrokken met de ontwikkelingsstadia waarin ze zich kunnen bevinden. Tevens werd rekening gehouden met de aard van het wortelgestel.

2.3.1.1.Wortelsoorten

Voor wat de wortelsoort betreft, werd voor *Meloidogyne* onderscheid gemaakt tussen harde en zachte wortels, met als type respectievelijk roze-en tarwewortels. Voor *Pratylenchus* werden wortels getoetst van *Acer pseudoplatanus*, in een stadium waarin ze noch als uitgesproken hard of zacht te beschouwen waren.

2.3.1.2.Groepen van nematoden

De getoetste nematodengroepen waren :

- sedentaire endoparasieten, met als type *Meloidogyne*
- vrij beweeglijke endoparasieten met als type *Pratylenchus*.

2.3.1.3.Ontwikkelingsstadia der nematoden

De volgende ontwikkelingsstadia konden in het onderzoek betrokken worden :

- *Gezwollen stadia*, zoals :
 - J₃-en J₄-stadia van *Meloidogyne* in jonge, uiteraard zachte wortels (*M. naasi* in tarwewortels)
 - Jonge en eileggende wijfjes van *Meloidogyne* in zachte (*M. naasi* in tarwe) en in harde wortels (*M. hapla* in rozen).

- *Eitjes en beweeglijke stadia*, zoals :
 - eitjes en J_2 -stadia van *Meloidogyne* in zachte (*M. naasi* in tarwewortels) en in harde wortels (*M. hapla* in rozewortels)
 - eitjes en alle juveniele en adulte stadia van *Pratylenchus*.

2.3.1.4. Mixcombinaties

Voor het onderzoek naar de invloed van draaisnelheid en draaiduur op de efficiency van het mixproces, werden de volgende combinaties getoetst :

- voor de *gezwollen stadia* werden de twee draaisnelheden (in de verdere tekst "traag" en "snel" genoemd) met zes draaiduren, nl. 7, 15, 30, 60, 120 en 240 seconden gecombineerd
- voor de *eitjes en beweeglijke stadia* werd deze serie van tijden in de buurt van het verwachte optimum aangevuld met de tijden van 90 en 180 seconden.

2.3.1.5. Voorbereiding

Voor elk onderzoek werd ongeveer 1 kilogram aangetaste wortels verzameld. Dit materiaal werd grondig gewassen, in stukjes van circa een halve centimeter geknipt, innig vermengd in een groot volume water en terug opgevangen op een zeef. Na het droogzwieren in een gaasdoek, werd het benodigde aantal porties van 5 gram afgenomen.

2.3.1.6. Statistische verwerking

Per ontwikkelingsstadium en wortelsoort, werden, voor iedere combinatie van draaisnelheid en draaiduur, de aantallen nematoden, bekomen uit acht herhalingen, genoteerd en onderworpen aan een variantie-analyse volgens een factorieel schema 2 x 6 of 2 x 8, naargelang het om gezwollen stadia of om eitjes en beweeglijke sta-

dia gaat. De toetsing gebeurt op het niveau $\alpha=0,05$, zoals dit trouwens ook het geval is bij de andere statistische analyses welke in dit werk voorkomen.

Omwille van de leesbaarheid van de tekst worden alleen de conclusies van de statistische analyses en de interpretatie ervan **gegeven**, terwijl de tabellen van de variantie-analyses in bijlage toegevoegd zijn.

2.3.2. Resultaten en bespreking

2.3.2.1. Gezwollen stadia

Uit de analyse van de resultaten voor de gezwollen juveniele stadia in zachte wortels (tabel 1, blz. 26), en voor de wijfjes in zachte wortels (tabel 2, blz. 26) en in harde wortels (tabel 3, blz. 27), blijken er in de drie gevallen significante verschillen te zijn tussen de draaiduren en de draaitijden en een significante interactie "snelheid" x "duur" (bijlagen 1, 2, en 3, blz. 90 en 91).

Het verder onderzoek van de faktor "snelheid" bij elke draaiduur gebeurt op basis van het kleinste significant verschil. Waar de verschillen tussen "traag" en "snel" significant zijn, is dit in de tabellen aangegeven door een asterisk.

Voor de analyse van de faktor "duur" bij elke draaisnelheid wordt verwezen naar de figuren 7 en 8, blz. 28, en fig. 9, blz. 32, welke voor elke snelheid het verloop van de gemiddelde aantallen nematoden met stijgende draaiduur visualiseren.

In het geval van *zachte wortels*, kan, zowel voor de gezwollen juveniele stadia (fig. 7) als voor de wijfjes (fig. 8), de trend bij *lage snelheid* als volgt geschetst en geïnterpreteerd worden. Bij een korte draaiduur, nl. 7 seconden, is reeds een groot gedeelte van de maximaal verkrijgbare inhoud bekomen. Verhoging van de draai-

Tabel 1. Verloop van de gemiddelde aantallen gezwollen juveniele stadia (J_3 - J_4) van *Meloidogyne naasi*, voor tarwewortels, bekomen bij verschillende combinaties van draaisnelheid en draaiduur van de mixer

-gemiddelde aantallen per 5 gram wortels

Draaiduur (sec)	Traag	Snel	Vershil
7	1 587	1 525	+ 62
15	1 837	1 462	+ 375 ^x
30	2 187	1 762	+ 425 ^x
60	1 462	1 000	+ 462 ^x
120	1 137	462	+ 675 ^x
240	675	312	+ 363 ^x
Gemiddeld	1 481	1 087	+ 393

Tabel 2. Verloop van de gemiddelde aantallen wijfjes van *Meloidogyne naasi*, voor tarwewortels, bekomen bij verschillende combinaties van draaisnelheid en draaiduur van de mixer

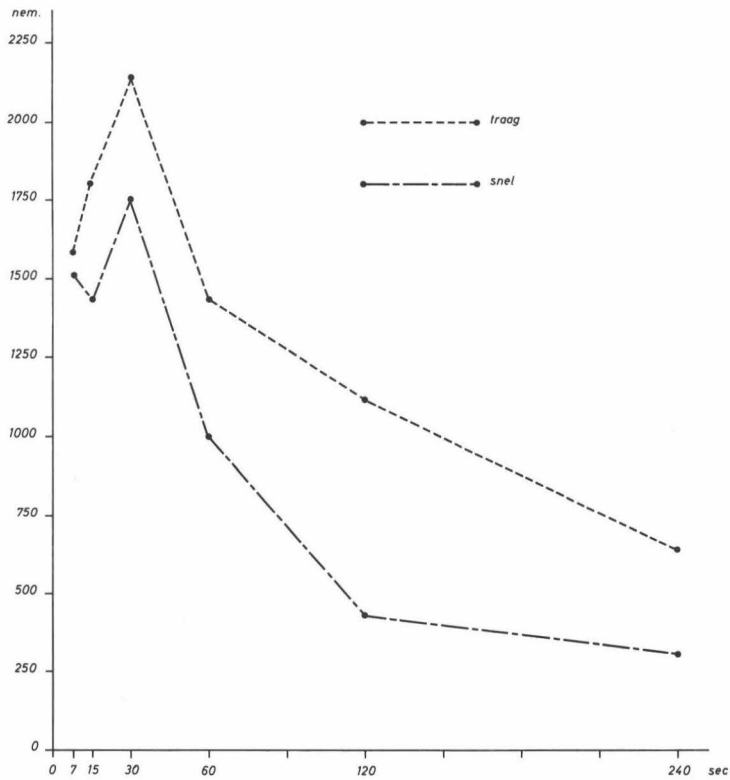
- gemiddelde aantallen per 5 gram wortels

Draaiduur (sec)	Traag	Snel	Vershil
7	951	1 020	- 69
15	1 021	1 046	- 24
30	1 145	1 073	+ 72
60	1 115	848	+ 267 ^x
120	850	490	+ 360 ^x
240	463	396	+ 67
Gemiddeld	924	812	+ 112

Tabel 3. Verloop van de gemiddelde aantallen wijfjes van Meloidogyne hapla, voor rozewortels, bekomen bij verschillende combinaties van draaisnelheid en draaiduur van de mixer

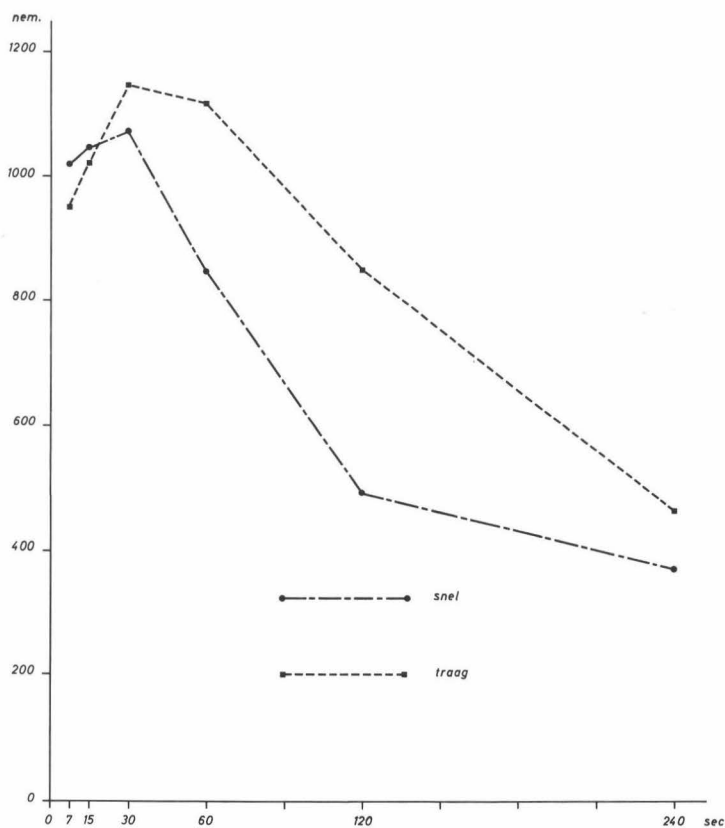
- gemiddelde aantallen per 5 gram wortels

Draaiduur (sec)	Traag	Snel	Vershil
7	108	136	- 28 ^x
15	181	136	+ 45 ^x
30	155	97	+ 58 ^x
60	56	21	+ 35 ^x
120	45	22	+ 23 ^x
240	6	7	- 1
Gemiddeld	92	70	+ 22



Figuur 7

Verloop van de gemiddelde aantallen gezwollen juveniele stadia (J_3 - J_4) van *Meloidogyne naasi*, voor tarwewortels, bekomen bij verschillende combinaties van draaisnelheid en draaiduur van de mixer



Figuur 8

Verloop van de gemiddelde aantallen wijfjes van *Meloidogyne naasi*, voor tarwewortels, bekomen bij verschillende combinaties van draaisnelheid en draaiduur van de mixer

duur tot 30 seconden doet de vangst stijgen naar een optimum. Op dat ogenblik is het zachte wortelweefsel volledig tot moes geslagen en is de extractie beëindigd. Van dan af grijpt nog alleen beschadiging of destructie van de vrije nematoden met de stijgende draaiduur plaats.

Een zelfde tendens is waar te nemen bij *hoge snelheid*. Hier is het groter vernietigend effect van de hogere snelheid op de vrije stadia over gans de lijn weer te vinden, behalve bij de zeer korte draaiduren, waar de vangst hoger ligt (fig. 8) of nauwelijks lager (fig. 7) dan bij lage snelheid. De verklaring ligt in het sneller vrijmaken van de nematoden, terwijl de vernietigingskans van de vrije individuen in deze korte tijd nauwelijks groter is dan bij de lage snelheid.

Het verloop van de aantallen wijfjes voor *harde wortels*, (fig. 9, blz. 32) wordt volledig bepaald door de aard van het wortelgestel, doordat de harde brokstukken een vermorzelende werking uitoefenen op de vrije nematoden in de suspensie. In het geval van de *lage snelheid* zijn bij 7 seconden eveneens een groot aantal nematoden vrijgemaakt terwijl bij 15 seconden reeds het optimum bereikt is. Op dat ogenblik is de extractie evenwel niet beëindigd en zijn het vooral de oppervlakkig zittende wijfjes die uit het wortelweefsel geslagen zijn. Het resultaat van een verder vrijmaken van de dieper zittende individuen wordt echter volledig verdoezeld door de sterke vernietiging van de vrije stadia met de stijgende draaiduur, doordat de nematoden als het ware gevat worden tussen de "hamer" van de messen en het "aanbeeld" van de harde wortelresten. Bij 240 seconden is de vernietiging vrijwel compleet.

Bij 7 seconden is het aantal vrijgemaakte wijfjes hoger bij *hoge snelheid* dan bij lage, maar van dan af is de vernietigende werking van de hogere snelheid nog sterker dan van de lage.

Als praktisch besluit kunnen we stellen dat het hoogste aantal nematoden bekomen wordt bij 15 tot 30 seconden traag mixen, naargelang de aard van het wortelgestel.

Opmerking : -Bij deze optimale combinaties worden ook de mannetjes van *Meloidogyne* vrijgemaakt en achteraf op de 10 μ -zeef weerhouden.

- Uit steekproeven, uitgevoerd op jonge wortels aangetast door *Heterodera*, zoals aardappel-, tomate-en haverwortels, blijkt dat de optimale extractie van de gezwollen juveniele stadia eveneens bij traag mixen bekomen wordt en de optimale draaiduur in dezelfde buurt gelegen is als deze voor de extractie van de gezwollen stadia van *Meloidogyne* uit zachte wortels. Aldus gelden voorgaande beschouwingen ook voor *Heterodera*.

2.3.2.2. Eitjes en J₂-stadia van *Meloidogyne*

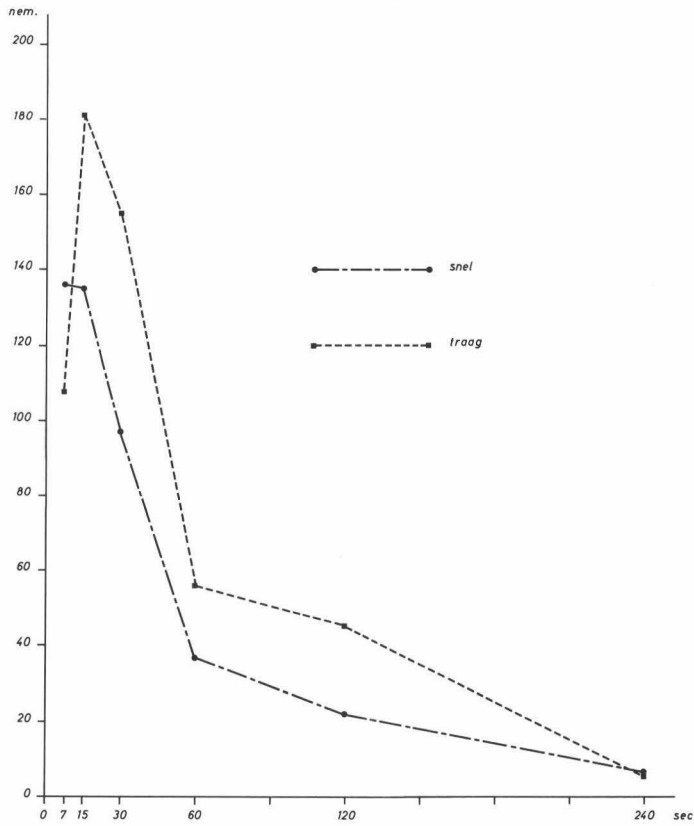
Zachte wortels

Bij het onderzoek van de zachte wortels werden de eitjes en de J₂-stadia afzonderlijk geteld (tabel 4, blz. 31). Uit de statistische analyse blijkt dat er zowel voor de eitjes, de J₂-stadia als voor de som van de eitjes en de J₂-stadia significante verschillen bestaan tussen de draaiduren, maar dat er, gemiddeld over de draaiduren, geen significant **verschil** is tussen "traag" en "snel". Daar er geen significante interactie "snelheid" x "duur" aan te tonen is, mag bij elke draaiduur het gemiddelde van "traag" en "snel" beschouwd worden (Bijlage 4, blz. 92). De trend van deze gemiddelden met stijgende draaiduur is voor eitjes, J₂-stadia en voor eitjes + J₂-stadia weergegeven in figuur 10, blz. 32.

Tabel 4. Verloop van de gemiddelde aantallen eitjes en J_2 -stadia van *Meloidogyne naasi*, voor tarwewortels, bekomen bij verschillende combinaties van draaisnelheid en draaiduur

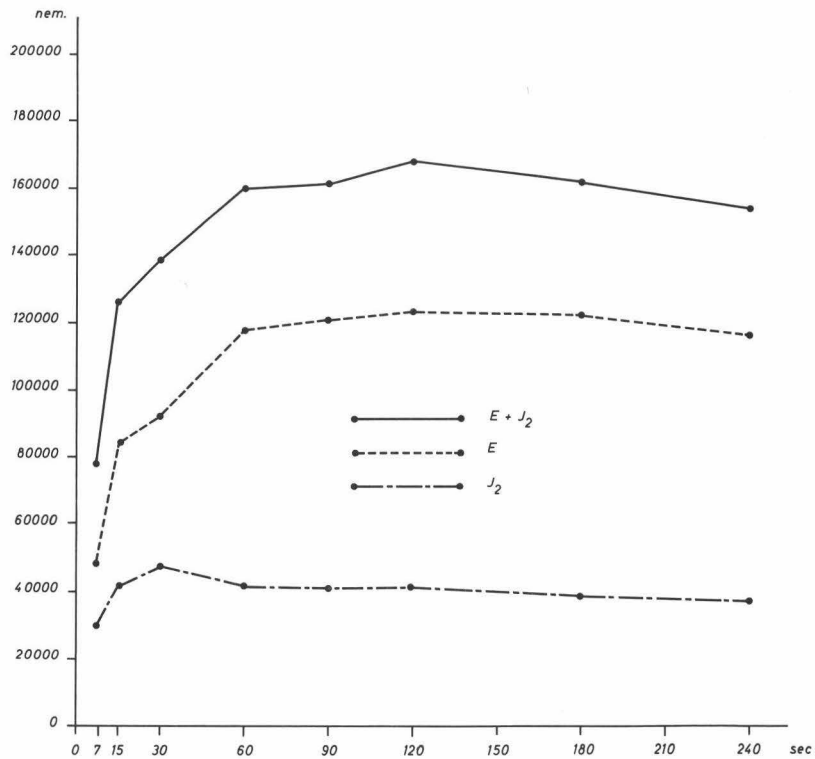
- gemiddelde aantallen per 5 gram wortels

Draaiduur (sec)	Eitjes			J_2 -stadia			Eitjes + J_2 -stadia		
	Traag	Snel	Gemidd.	Traag	Snel	Gemidd.	Traag	Snel	Gemidd.
7	44 625	50 625	47 625	29 250	31 125	30 187	73 875	81 750	77 812
15	81 750	86 250	84 000	39 000	45 000	42 000	120 750	131 250	126 000
30	94 500	91 250	92 875	44 625	46 125	45 375	139 125	137 375	138 250
60	117 750	117 750	117 750	41 625	42 375	42 000	159 375	160 125	159 750
90	122 625	113 500	120 562	41 250	40 875	41 062	163 875	159 375	161 625
120	128 250	122 500	125 375	42 000	40 875	41 437	170 250	163 375	166 812
180	125 250	118 750	122 000	40 500	39 000	39 750	165 750	157 750	161 750
240	117 375	115 000	116 187	36 750	38 625	37 687	154 125	153 625	153 875
Gemidd.	104 015	102 573	103 297	39 375	40 500	39 937	143 390	143 078	143 234



Figuur 9

Verloop van de gemiddelde aantallen wjffjes van *Meloidogyne hapla*, voor rozewortels, bekomen bij verschillende combinaties van draaisnelheid en draaiduur van de mixer



Figuur 10

Verloop van de gemiddelde aantallen eitjes en J₂-stadia van *Meloidogyne naasi*, voor tarzewortels, bekomen bij verschillende combinaties van draaisnelheid en draaiduur van de mixer

Het verloop van de extractie bij stijgende draaiduur kan, aan de hand van de curve van de gemiddelden, als volgt uitgelegd worden. Reeds na een korte draaiduur, nl. 30 seconden, mag aangenomen worden dat de nematoden grotendeels uit het wortelweefsel vrijgemaakt zijn. Het aantal J_2 -stadia op dat ogenblik is afkomstig van individuen welke zich vrij in de weefsels bevonden of welke uit de rijpe eieren geslagen werden. Dit aantal gaat zich niet noemenswaardig meer wijzigen met stijgende draaiduur, doordat de extractie vrijwel beëindigd is en de zich vrij in suspensie bevindende kleine, ranke diertjes weinig of niet vernietigd worden. De *eitjes* komen bij lage draaiduren reeds voornamelijk voor als losse eenheden maar gedeeltelijk ook als eiklompjes of brokstukken ervan. Daar in het laatste geval het aantal eitjes niet te schatten is werden ze tijdens het tellen niet meegerekend. Het verder stijgen van de vangst aan telbare eitjes met stijgende draaiduur is dus in feite hoofdzakelijk te wijten aan het verder klieven van de eipropjes. Bij 120 seconden zijn alle eitjes los in suspensie en van dan af komt een lichte vernietiging aan het licht door een geleidelijke daling van de aantallen.

Houden we rekening met de gemiddelde aantallen bekomen bij "traag" en "snel" afzonderlijk (tabel 4), dan zien we bij de *eitjes* dat bij korte draaiduren "snel" meer geeft dan "traag" en dat vanaf een bepaald ogenblik het omgekeerde zich voordoet, zonder dat er evenwel een significante interactie aan te tonen is. Dit is te verklaren doordat bij het begin van de extractie, door de sneller ronddraaiende mesjes, meer eitjes losgeklopt worden. Bij voortschrijdende draaiduur wordt het evenwicht hersteld en vervolgens komt het vernietigend effect bij de hoge snelheid iets duidelijker tot uiting.

Bij de J_2 -stadia geeft "snel" in het begin ook meer dan "traag" om dezelfde reden. Bij langere draaitijden neemt "traag" evenwel niet de bovenhand doordat het vernietigingseffect van de hoge snelheid bij dit soort van diertjes te verwaarlozen is.

Het verloop van de som van *eitjes en J_2 -stadia* wordt volledig gedomineerd door dit der eitjes, omwille van het egale verloop van de aantallen J_2 -stadia, welke daarenboven slechts gemiddeld ongeveer 25 % van het totaal uitmaakten. Het is dus hoofdzakelijk voor dezelfde interpretatie vatbaar.

Harde wortels

Voor harde wortels werden de aantallen eitjes en de J_2 -stadia niet apart opgenomen. De resultaten in tabel 5, blz. 35, slaan dan ook op de som van de aantallen van beide stadia.

De statistische analyse leert dat hier ook significante verschillen bestaan tussen de draaiduren maar, gemiddeld gezien, niet tussen de draaisnelheden, terwijl eveneens geen significante interactie "snelheid" x "duur" aantoonbaar is. (Bijlage 5, blz. 93). De tendens van de gemiddelden van "traag" en "snel" met stijgende draaiduren is grafisch voorgesteld in fig. 11, blz. 37. Zij kan volledig geïnterpreteerd worden zoals deze voor de som van eitjes + J_2 -stadia bij zachte wortels. Ook hier ligt het optimum bij 120 sec traag mixen.

Besluit

Bij de eitjes en de J_2 -stadia van *Meloidogyne* wordt het optimum niet beïnvloed door de wortelsoort, doordat deze ontwikkelingsstadia eens in suspensie, veel minder vatbaar zijn voor vernietiging.

Tabel 5. Verloop van de gemiddelde aantallen eitjes en J_2 -stadia van Meloidogyne hapla, voor rozewortels, bekomen bij verschillende combinaties van draaisnelheid en draaiduur

- gemiddelde aantallen per 5 gram wortels

Draaiduur (sec)	Traag	Snel	Gemiddeld
7	7 250	8 500	7 875
15	9 750	11 000	10 375
30	16 625	15 575	16 000
60	17 250	16 250	16 750
90	17 375	16 875	17 125
120	19 000	17 875	18 437
180	17 375	16 250	16 812
240	16 000	14 875	15 437
Gemiddeld	15 078	14 650	14 864

2.3.2.3. Vrij beweeglijke endoparasiterende nematoden

Bij het onderzoek van de extractie van *Pratylenchus* uit *Acer*-wortels werden de eitjes en de beweeglijke stadia gescheiden geteld (tabel 6, blz. 38).

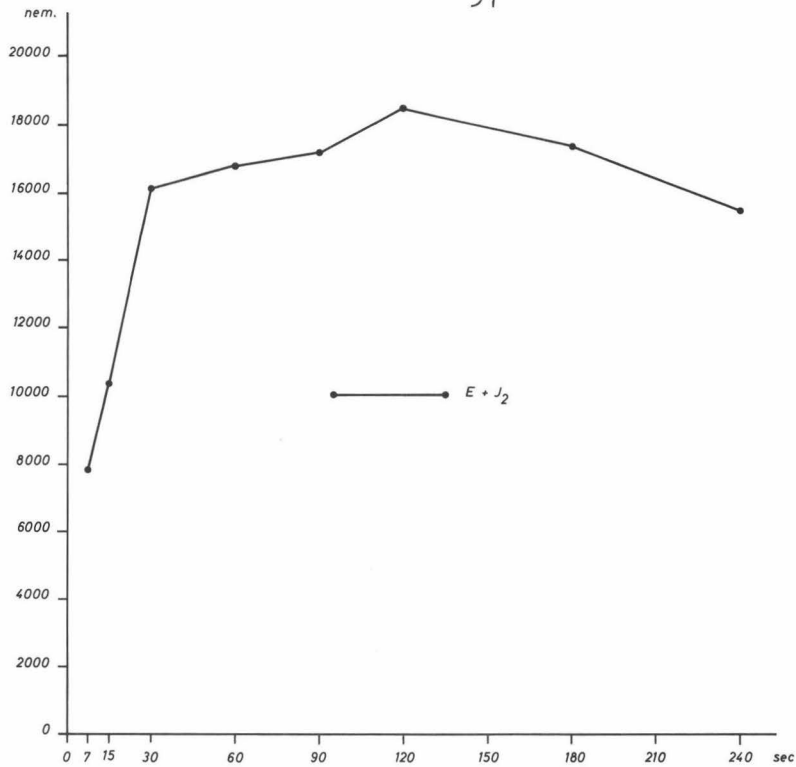
Voor de *eitjes* zijn er significante verschillen tussen de draaiduren en tussen de snelheden en geen significante interactie "snelheid" x "duur". Voor de *beweeglijke stadia* zijn er eveneens significante verschillen tussen de draaiduren, is er ook een significant verschil tussen de snelheden, maar tevens een significante interactie "snelheid" x "duur" (Bijlage 6, blz. 93).

In figuur 12, blz. 37, is het verloop van de gemiddelde aantallen eitjes en beweeglijke stadia met de draaiduur, bij hoge en lage snelheid, geschetst.

Dat bij korte draaiduren de aantallen, zowel eitjes als beweeglijke stadia, hoger liggen bij *hoge snelheid* dan bij *lage*, wordt verklaard doordat de intensiteit van de desintegratie van het schorsweefsel bij deze snelheid groter is. Daardoor valt het in kleinere brokstukjes uiteen en komen meer nematoden vrij.

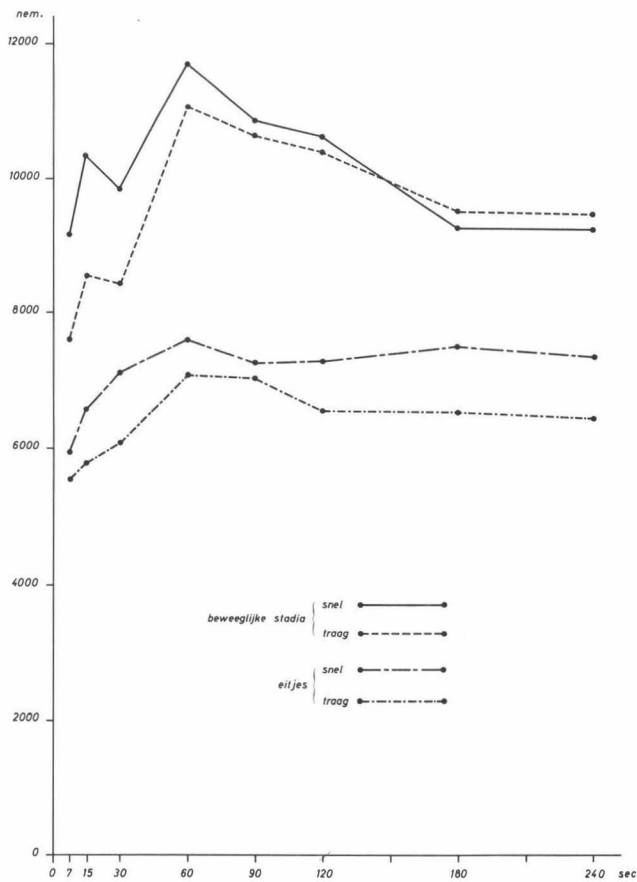
Bij de *lage snelheid* bevinden zich in de suspensie stukjes schorsweefsel welke nog nematoden bevatten maar te klein zijn om bij stijgende mixduren nog fijner gemaakt te worden, zodat hun inhoud nog moeilijk vrij te maken is. De optimale extractie is bereikt bij 60 seconden zowel voor eitjes als voor beweeglijke stadia en bij beide snelheden.

Bij de *eitjes* verlopen de aantallen vanaf het optimum zeer egaal met stijgende draaiduur doordat ze, omwille van hun geringe afmetingen, zelfs bij hoge snelheid weinig vernietigd worden. Bij de *beweeglijke stadia* is het verval met de tijd sterker en wordt ook het verschil tussen snel en traag kleiner om vanaf 180 sec zelfs licht



Figuur 11

Verloop van de gemiddelde aantallen eitjes en J_2 -stadia van *Meloidogyne hapla*, voor roze wortels, bekomen bij verschillende combinaties van draaisnelheid en draaiduur van de mixer



Figuur 12

Verloop van de gemiddelde aantallen eitjes en beweeglijke stadia van *Pratylenchus penetrans*, voor Acer-wortels, bekomen bij verschillende combinaties van draaisnelheid en draaiduur van de mixer

Tabel 6. Verloop van de gemiddelde aantallen eitjes en beweeglijke stadia van *Pratylenchus penetrans*, voor Acer-wortels, bekomen bij verschillende combinaties van draaisnelheid en draaiduur van de mixer

- gemiddelde aantallen per 5 gram wortels

Draaiduur (sec)	Eitjes			Beweeglijke stadia		
	Traag	Snel	Verschil	Traag	Snel	Verschil
7	5 562	5 950	- 388	7 637	9 187	- 1 550 ^x
15	5 787	6 600	- 813	8 562	10 337	- 1 775 ^x
30	6 087	7 150	- 1 063	8 425	9 875	- 1 450 ^x
60	7 100	7 612	- 512	11 062	11 725	- 663
90	7 050	7 275	- 225	10 625	10 850	- 225
120	6 575	7 300	- 725	10 387	10 612	- 225
180	6 537	7 512	- 975	9 500	9 250	+ 250
240	6 437	7 350	- 913	9 462	9 237	+ 225
Gemidd.	6 392	7 093	- 701	9 457	10 134	- 677

om te slaan. Dit is te wijten aan de vernietiging, vooral van de grotere beweeglijke stadia, bij lange draaiduur tegen hoge snelheid.

Opmerking : Voor andere vrij beweeglijke endoparasiterende nematoden, zoals *Ditylenchus dipsaci* en *Aphelenchoides* spp. werd de gecombineerde invloed van draaisnelheid en draaiduur niet geanalyseerd. We namen aan dat deze parasieten veel gemakkelijker dan bv. *Pratylenchus* uit de weefsels kunnen gelokt worden met de bestaande incubatietechnieken zodat de noodzaak van de uitbreiding van de methode voor deze nematoden minder gevoeld werd.

Het mixen van weefsel van voederbietknollen aangetast door *Ditylenchus dipsaci*, gaf nochtans goede resultaten zoals aangetoond wordt in Hoofdstuk IV, zowel wat de aantallen (tabel 12, blz.74) als de kwaliteit der dieren betreft. (fig. 17, blz. 81).

2.3.3. Besluit

Uit de voorgaande beschouwingen blijkt dat in het geval van de *gezwollen stadia* de optimale extractie gebeurt bij 15 à 30 sec traag mixen.

Bij de *eitjes en de beweeglijke stadia* moet onderscheid gemaakt worden tussen deze van *Meloidogyne* en deze van de vrij beweeglijke endoparasieten. In het eerste geval blijkt de optimale combinatie, zowel voor harde als voor zachte wortels, 120 sec traag mixen te zijn, en in het tweede geval 60 sec snel mixen.

Om praktische redenen en omwille van de eenvoud van het recept, stellen we in het geval van de *gezwollen stadia* een combinatie van 15 seconden traag mixen voor, en in het geval van de *eitjes en de vrij beweeglijke stadia* 120 sec traag mixen. Op deze wijze wordt, in het algemeen, het optimum bereikt of dicht benaderd.

HOOFDSTUK III

SCHEIDEN VAN DE NEMATODEN UIT HET MIXTUM

De scheiding van de nematoden uit het mixtum gebeurt door centrifugeren. Daar bij het gebruikte centrifuge-type de inhoud van de buizen slechts 100 ml is, dient het volume van het mengsel gereduceerd te worden.

3.1. REDUCTIE VAN HET MENGSEL

3.1.1. Meloidogyne

Om het overtollige water uit de suspensie te kunnen verwijderen met behulp van zeven, dient de maaswijdte ervan zodanig te zijn dat alle nematoden op het netwerk weerhouden worden. Proefondervindelijk werd vastgesteld dat juveniele stadia van zodra ze iets gezwollen zijn niet meer door een 10 μ -zeef gaan en ook niet tussen de mazen gekneld blijven. Dit geldt uiteraard ook voor de verder gezwollen stadia, met inbegrip van de vrije mannetjes, en voor de eitjes. Giet men echter een suspensie met J_2 -stadia op een dergelijke zeef of zelfs op een 5 μ -zeef, dan glipt een gedeelte door de mazen of klemt erin vast. Zo wordt in paragraaf 3.3., blz. 58, aangetoond dat op een 5 μ -zeef slechts 54 % van de inhoud van een suspensie van J_2 -stadia teruggewonnen wordt. Dit wordt verklaard doordat een groot gedeelte van de langgerekte, elastische nematoden met de doorstromende vloeistof doorheen de mazen meegesleurd worden of erin geklemd blijven, ofschoon hun lichaamsdiameter ongeveer drie maal deze maaswijdte overtreft. Dit effect dat reeds verkregen werd bij het gieten van een zuivere J_2 -suspensie over een stilstaande zeef, wordt hier nog verhevigd omwille van de sterke vibratie welke de zeef moet ondergaan om een vlotte filtratie van de vuile suspensie mo-

gelijk te maken, zodat het verlies niet alleen groter maar ook onregelmatiger zal zijn.

Om die reden moet de reductie van het mixtum voor de eitjes en J_2 -stadia op een andere wijze gebeuren dan voor de gezwollen stadia. Het enige gemeenschappelijke aan beide procédés is de voorafgaandelijke passage van het mixtum over een 1 000 μ -zeef.

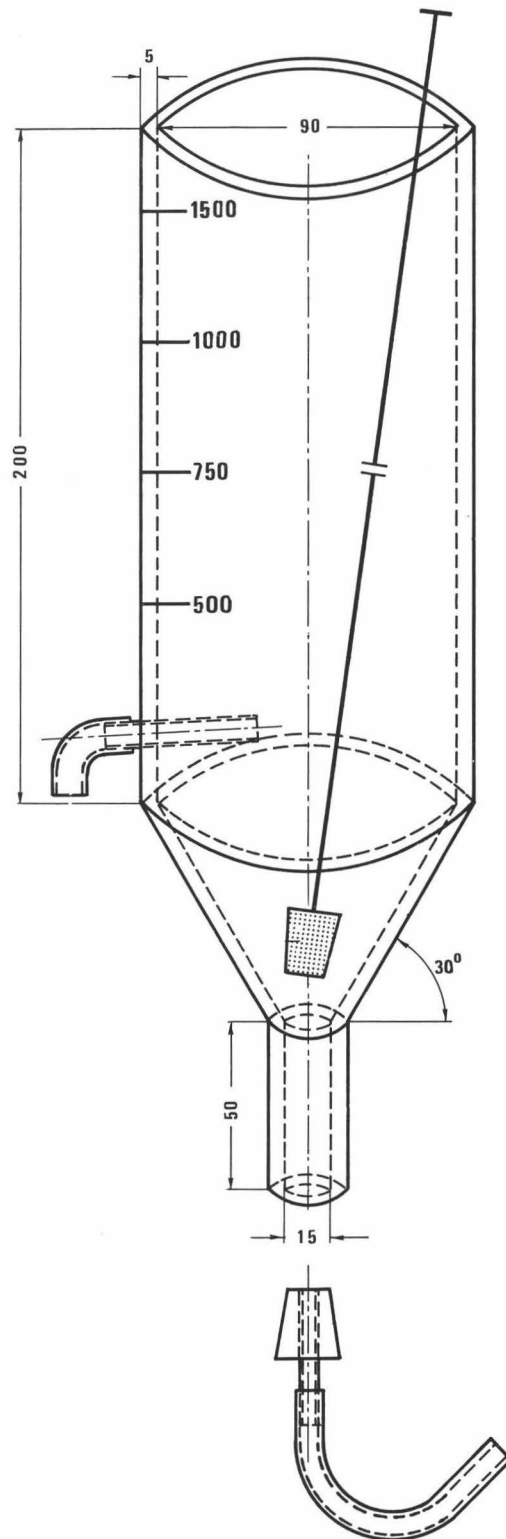
De maaswijdte van deze laatste zeef is zodanig gekozen dat grove wortelresten, welke vooral uit bastvezels en brokstukken van naakte centrale cilindres bestaan, geëlimineerd worden, waardoor de ballast in de centrifugebuis tot een minimum herleid wordt. Anderzijds kunnen alle ontwikkelingsstadia van de nematoden, ook de wijfjes, door het netwerk gewassen worden.

Onderzoek op eitjes en J_2 -stadia

De suspensie wordt uitgegoten over de 1 000 μ -zeef welke geplaatst is boven een homogenisatiekruik (fig. 13, blz. 42). Daarna wordt het residu op de zeef grondig gewassen met een fijne, krachtige waterstraal geleverd door een neveldop (type BRAY, 000), met een zeer laag debiet, nl. ongeveer 0,5 liter per minuut, tot de suspensie in de kruik aangelengd is tot 500 ml. Proefondervindelijk werd vastgesteld dat op deze wijze geen vrije nematoden op de 1 000 μ -zeef tussen de worteldelen achterblijven. Door middel van langs onder aangevoerde perslucht, met een druk van 0,1 kg/cm², geleverd door een aquariumpompje, wordt de suspensie gehomogeniseerd. Na een paar minuten wordt van het borrelend mengsel 100 ml afgetapt in de centrifugebuis. Deze buis bevat aldus 1/5 van de inhoud aan nematoden van het monster.

De graad van homogenisatie werd als volgt bepaald :

De kruik werd gevuld met 500 ml water en hieraan werden 500 voorgeweekte *Heterodera rostochiensis*-cysten toegevoegd. Na het homogeniseren werd een centrifugebuis afgetapt en uitgegoten op een zeefje. Na telling van de cysten op de zeef



Figuur 13

Schematische voorstelling van de homogenisatiekruik

werden ze zorgvuldig in de kruik teruggespoeld met 100 ml water. Een dergelijke handeling werd nog negen maal herhaald, zodat tien waarnemingen bekomen werden waarvan het gemiddelde 98 cysten per buis bedroeg. De ontleding van deze gegevens volgens de χ^2 -toets gaf volgend resultaat :

χ^2 berekend : 2,90

χ^2 theoretisch : 2,70

Dat betekent dat er slechts 25 kansen op 1 000 zijn dat de kruik niet volledig homogeniseert. Hieruit kan tot een goede homogenisatie besloten worden.

Onderzoek op gezwollen stadia

De suspensie wordt uitgegoten op een 1 000 μ -zeef geplaatst op een 10 μ -zeef, terwijl het wassen van de bovenste zeef eveneens met de nevelspuit gebeurt. De gezwollen stadia op de onderste zeef worden overgespoeld in de centrifugebuis.

3.1.2. Andere endoparasiterende nematoden

Voor het onderzoek op de aanwezigheid van de gezwollen juveniele stadia van *Heterodera* wordt te werk gegaan zoals voor de gezwollen stadia van *Meloidogyne*.

De reductie van het mengsel van eitjes en beweeglijke stadia van vrij beweeglijke endoparasiterende nematoden zoals *Pratylenchus*, *Radopholus* en *Ditylenchus* gebeurt evenwel over de homogenisatiekruik, omwille van het feit dat bepaalde juveniele stadia nog kleiner kunnen zijn dan de J_2 -stadia van *Meloidogyne*.

3.2. CENTRIFUGEREN

3.2.1. Principe

Het scheiden van de nematoden en de wortelresten gebeurt principieel in twee fasen :

Eerste fase : Het centrifugeren van de suspensie waarna alle deeltjes met een soortelijk gewicht kleiner dan de eenheid samen met het water geëlimineerd worden.

Tweede fase : Het opnieuw centrifugeren van het sediment na resuspendatie in een vloeistof met een dichtheid welke hoger is dan deze van de nematoden en lager dan die van het vuil. De deeltjes met een kleinere dichtheid dan deze van de vloeistof, waaronder de nematoden, bewegen zich naar het oppervlak terwijl de deeltjes met een dichtheid groter dan deze van de vloeistof bezinken. De snelheid waarmee dit gebeurt hangt af van de intensiteit van de centrifugaalkracht, het verschil in dichtheid van de deeltjes en van de suspenderende vloeistof, de viscositeit van de vloeistof, en de grootte en vorm van de deeltjes.

De dichtheid van de nematoden bedraagt gemiddeld 1,084 (1,082 - 1,086) (ANDRASSY, 1956)

3.2.2. Factoren welke het rendement beïnvloeden

Onder *rendement van de centrifuge* verstaan we de procentuele verhouding tussen de aantallen afgezonderde nematoden uit de suspensie en de werkelijke inhoud ervan.

Het wordt in principe door de volgende factoren bepaald :

3.2.2.1. Relatieve centrifugaalkracht

Deze waarde bedraagt voor beide centrifugatiebeurten 1 800 g's en wordt bekomen bij de maximale omwentelingsnelheid, nl. 3 000 o.p.m., van een centrifuge met een straal van 18 cm. De gebruikte centrifuge is een ECCO-SUPERIOR IV B met acht uitzwaaiende buishouders.

3.2.2.2. Draaiduur

In de eerste beurt konden na vijf minuten geen nematoden in het bovenstaande water aangetoond worden, ook niet de kleine eitjes of het kleinste juveniele stadium van *Pratylenchus*.

De tweede beurt wordt slechts drie minuten aangehouden om de contactduur van de nematoden met de zwaardere vloeistof tot een minimum te beperken. Na deze tijd is alle vuil voldoende neergeslagen.

In beide tijden is de aanlooptijd om geleidelijk het hoogste toerental te bereiken begrepen.

3.2.2.3. Gebruikte scheidingsvloeistof

Voor het afscheiden van nematoden en hun eieren uit grond werden in de literatuur verschillende zware oplossingen vermeld, zoals suikeroplossingen, NaCl-, MgSo₄- en ZnSo₄-oplossingen (FENWICK, 1940; CAVENESS & JENSSEN, 1955; MINDERMAN 1956; WEBER & WILLIAMS, 1968; FLEGG & McNAMARA, 1968; DUNN, 1969; LANCASTER, 1970).

De invloed van de combinatie van aard en dichtheid van de oplossing op het rendement van de centrifuge en op de kwaliteit van de nematoden, in het geval van *Meloidogyne* en *Pratylenchus*, wordt hiernaavolgend in eigen onderzoek besproken.

3.2.2.3.1. Invloed op het rendement

Meloidogyne

Een drietal verschillende dichtheden van een suiker- en een zoutoplossing werden onderling vergeleken. Hiertoe werd vertrokken van een grondig gehomogeniseerde fijn geknipte massa besmette rozewortels, waarbij per object vier maal 5 gram gemixt en gecentrifugeerd werd. De bekomen aantallen eitjes + J₂-stadia zijn een maat van het rendement (Tabel 7, blz. 45).

Uit de variantie-analyse, uitgevoerd volgens een factorieel schema 2 x 3, blijkt dat er , zowel voor de eitjes als voor de J₂-stadia, geen significante verschillen in rendement tussen de vloeistoffen, maar wel tussen de dichtheden bestaan (Bijlage 7, blz. 94). De DUNCAN-toets, toegepast op de gemiddelden over de beide oplossingen, toont aan dat er een significant verschil is tussen het rendement bij de dichtheid 1,12 enerzijds, en deze bij de dichtheden 1,15 en 1,18 anderzijds, welke onderling niet verschillen.

Tabel 7. Vergelijking van de aantallen eitjes en J_2 -stadia van *Meloidogyne*, bekomen door centrifugatie met respectievelijk een suiker- en een NaCl-oplossing als scheidingsvloeistof, bij 3 verschillende dichtheden

- aantallen uitgedrukt per 5 gram wortels

	Eitjes			J_2 -stadia		
	NaCl	Suiker	Gemidd.	NaCl	Suiker	Gemidd.
1,12	17 300	17 790	17 545	4 500	4 640	4 570
1,15	21 650	21 300	21 475	5 380	5 200	5 290
1,18	21 300	21 740	21 520	5 690	5 250	5 470
Gemidd.	20 083	20 276	20 180	5 190	5 030	5 110

Tabel 8. Vergelijking van de aantallen eitjes en beweeglijke stadia van *Pratylenchus*, bekomen door centrifugatie met respectievelijk een suiker-, een NaCl- en een ZnSo₄-oplossing als scheidingsvloeistof, bij 3 verschillende dichtheden

- aantallen uitgedrukt per 5 gram wortels

Ontwikkelings- stadium	Aard	Scheidingsoplossing			
		Dichtheid			Gemidd.
		1,12	1,15	1,18	
Eitjes	ZnSo ₄	11 975	11 138	11 663	11 592
	Suiker	11 075	13 312	13 587	12 658
	NaCl	5 562	7 675	8 063	7 100
	Gemidd.	9 537	<u>10 708</u>	<u>11 104</u>	10 450
Beweeg- lijke stadia	ZnSo ₄	15 550	18 113	19 150	17 604
	Suiker	16 113	18 100	18 038	17 417
	NaCl	9 250	11 113	9 325	9 896
	Gemidd.	13 637	<u>15 775</u>	<u>15 504</u>	14 972

Pratylenchus

Hier werd in de vergelijking een derde vloeistof ingeschakeld, nl. een zinksulfaatoplossing, die bij elke dichtheid een lagere osmotische waarde heeft dan de andere oplossingen. De proef werd uitgevoerd zoals in het voorgaande geval, maar deze keer met 8 herhalingen per object.

De resultaten zijn weergegeven in tabel 8, blz.46 . De variantie-analyse , met als factorieel schema 3 x 3, toont aan dat er, voor alle ontwikkelingsstadia, significante verschillen bestaan tussen de vloeistoffen en tussen de dichtheden (Bijlage 8, blz.95).

De DUNCAN-toets, toegepast op de randgemiddelden, leert dat, gemiddeld over de vloeistoffen, het rendement bij de dichtheid 1,12 significant verschilt van deze bij de dichtheden 1,15 en 1,18 welke onderling niet verschillen. Omgekeerd blijkt dat, gemiddeld over de dichtheden , het rendement van de NaCl-oplossing significant verschilt van deze van de ZnSo₄- en de suikeroplossingen, welke dit onderling niet doen.

3.2.2.3.2. Invloed op de kwaliteit

De kwaliteit van de gerecupereerde nematoden werd zo objectief mogelijk beoordeeld door vijf leden van het nematologisch laboratorium van het *Rijksstation voor Nematologie en Entomologie*. De volgende normen werden aangelegd, steunende op het uitzicht en de beweeglijkheid der dieren, enige tijd na de extractie :

- zeer goed : overwegend nematoden waarbij alle binoculairkenmerken van het genus duidelijk te onderscheiden zijn, en welke normaal bewegen.
- goed : een gedeelte der dieren hebben een minder fris uitzicht en bewegen niet.



Figuur 14

Eitjes en beweeglijke stadia van *Pratylenchus penetrans*, af-
gezonderd uit rozewortels

Besmettingsgraad : 7 000 eitjes en 9 400 beweeglijke stadia
per 5 gram wortels

Tabel 9. Vergelijking van de kwaliteit van de nematoden bekomen door centrifugeren bij het gebruik van een suiker-, een NaCl- en een ZnSo₄-oplossing

Aard en dichtheid	Benaderende os- motische waarde (gmol/l) (x)	<i>Meloidogyne</i>	<i>Pratylenchus</i>
Suiker			
δ: 1,12	0,7	zeer goed	zeer goed
δ: 1,15	1,0	zeer goed	goed tot zeer goed
δ: 1,18	1,3	zeer goed	goed tot zeer goed
NaCl			
δ: 1,12	3,1	zeer goed	minder goed
δ: 1,15	4,0	goed	minder goed
δ: 1,18	4,7	goed	minder goed
ZnSo ₄			
δ: 1,12	0,4	zeer goed	zeer goed
δ: 1,15	0,5	zeer goed	goed tot zeer goed
δ: 1,18	0,6	zeer goed	goed tot zeer goed

(x) Osmotische waarde (osmosity) : de molaire concentratie van NaCl met hetzelfde vriespunt of dezelfde osmotische druk als de oplossing

- minder goed : het merendeel der nematoden zijn donker en liggen in blijvende starre positie.

De bevindingen zijn neergelegd in tabel 9, blz. 49, terwijl fig. 14, blz. 48, een idee geeft van de kwaliteit van *Pratylenchus penetrans*, bij het gebruik van een suikeroplossing met $\delta = 1,15$.

3.2.2.3.3. Besluit

In het algemeen kunnen de volgende conclusies getrokken worden :

- Voor elke vloeistof liggen de rendementen welke bij de dichtheden 1,15 en 1,18 niet van elkaar verschillen, hoger dan dit bij de dichtheid 1,12, wat deze laatste voor toepassing uitsluit.
- Het gebruik van keukenzout beïnvloedt nadelig het rendement en de kwaliteit in het geval van *Pratylenchus*. Dit is te verklaren door de veel hogere osmotische waarde van de keukenzout-oplossing, waardoor een gedeelte van de nematoden, zowel eitjes als beweeglijke stadia, tijdens hun verblijf in die oplossing te sterk te lijden hebben, ofwel derwijze veranderen dat ze niet meer kunnen gerecupereerd of herkend worden. Opmerkelijk is wel dat *Meloidogyne* veel minder aan dit verschijnsel onderhevig is dan *Pratylenchus*.
- Kwalitatief, noch kwantitatief is er verschil tussen de vangsten bij de suikeroplossingen en de zinksulfaatoplossingen. Het voordeel van zinksulfaatoplossingen dat ze niet kleven of beschimmelen, wat het rein houden van het materieel vergemakkelijkt, weegt niet op tegen de volgende nadelen, bij de gebruikte doses van dit produkt :
 - het is duurder dan suiker voor het bekomen van een zelfde dichtheid.
 - het werkt corroderend.

- in gevallen waarin het gebruikte water licht basisch reageert, kan het de suspensie vertroebelen, doordat zich een kolloïdale neerslag van $Zn(OH)_2$ vormt.
- de regelmatige omgang met dit produkt is niet volledig veilig voor de mens.

Om die redenen wordt suiker boven $ZnSO_4$ verkozen. Ofschoon kwantitatief noch kwalitatief een verschil bestaat tussen de dichtheden 1,18 en 1,15 wordt aan deze laatste de voorkeur gegeven, omwille van de wat lagere osmotische waarde, maar vooral omdat het verschil tussen de dichtheid van het vuil en van de oplossing groter wordt, wat de bezinkingssnelheid van het vuil verhoogt.

3.2.3. Rol van het kaolien

Bij het afgieten van het bovenstaande water na de eerste centrifugatie is gebleken dat minstens de bovenlaag van het niet solide sediment oproert en gedeeltelijk meegesleurd wordt, wat steeds een belangrijk en onregelmatig verlies aan nematoden meebrengt. Dit euvel wordt verholpen door, vóór het centrifugeren, een hoeveelheid kaolien innig te vermengen met de suspensie in de buis, door middel van een trilroerder (VIBRO MISCHER, laboratoriummodel E1 met een verticale vibratie, trilfrequentie 50 t/min, amplitude 0-3 mm) (x). Het trilplaatje, met een diameter van 20 mm, wordt met de kegelvormige openingen naar onder geplaatst, waardoor een krachtige neerwaartse menging teweeggebracht wordt. Na iedere bewerking wordt het roerplaatje en het roerstaafje met afvloeiend water automatisch gereinigd.

Kaolien is een kleimineraal met een soortelijk gewicht van 2,6 en bestaat uit deeltjes van 2 à 3 μ groot. Daar deze deeltjes bovendien plaatvormig zijn, hebben ze een zeer

(x) In 1966 suggereerde DE GRISSE in "Nematology News" nr. 10, het toevoegen van wat cement aan gronden arm aan organisch materiaal en aan klei. In 1969 vermeldt hij het gebruik van kleipoeder voor het bedekken van het sediment in het geval van duinzandgronden (DE GRISSE a en b)

groot zweefvermogen in water, waardoor ze, niettegenstaande hun grotere dichtheid, trager bezinken dan het vuil en de nematoden. Het kaolien zal zich aldus als een taai vel op het losse sediment uitsmeren en het verzegelen bij het afgieten. Bij het resuspenderen van het sediment in de suikeroplossing met de trilroerder moet het zegel grondig verbroken worden en alle brokstukken volledig fijn gemaakt. Dit is, algemeen gezien, vanaf 30 seconden het geval. De hoeveelheid toegevoegde kaolien bedraagt 1 milliliter. Dit volume welke relatief groot is tegenover de geringe wortelmassa's, vooral in het geval van de eitjes + J_2 -stadia, werd veiligheidshalve zo gekozen om zeker te zijn dat het residu, welke over de ganse holle bodem van de centrifugebuis kan uitgesmeerd liggen, steeds bedekt is.

Een bijkomend voordeel van kaolien is dat het ook tijdens de tweede centrifugatiebeurt neergeslagen wordt. Aldus wordt belet dat een gedeelte van het bezonken vuil bij het afgieten van de suikeroplossing samen met de nematoden op de zeef terecht komt en uiteindelijk het waswater, waarin de nematoden zich bevinden, verontreinigt. De hoeveelheid kaolien wordt evenwel niet volledig neergeslagen, doordat enerzijds de suikeroplossing een grotere dichtheid en een hogere viscositeit heeft dan water, en anderzijds de draai-duur korter is dan bij de eerste centrifugatiebeurt. Het zwevende kaolien wordt tenslotte via de zeef kwijtgespeeld. Het is evident dat er zich ook nog nematoden tussen het vuil onder en in de kaolienlaag bevinden. Hoe groot dit verlies is, wordt in de volgende paragraaf bepaald.

3.2.4. Bepalen van het rendement

3.2.4.1. Meloidogyne

3.2.4.1.1. Eitjes en J_2 -stadia

Het rendement van de centrifuge voor eitjes en J_2 -stadia werd als volgt bepaald :

Uit twee moedersuspensies, met respectievelijk een gekende inhoud aan eitjes (1940 ± 62 per 10 ml) en aan J_2 -stadia (1130 ± 35 per 10 ml) werd, voor *harde en zachte wortels*, telkens 8 maal 10 ml uitgepipetteerd, gemengd met residu van 5 gram gemixt onbesmet wortelmateriaal en gecentrifugeerd. Het resuspenderen van het sediment in suikeroplossing met de trilroerder werd 30 seconden aangehouden.

Voor elke herhaling werd de vangst uitgedrukt in procent van de gemiddelde toegevoegde hoeveelheid. Het gemiddelde van deze acht procenten, maakt het *gemiddeld rendement* uit.

Deze gemiddelde rendementen met hun variatiecoëfficiënt (v.c.) zijn hiernavolgend weergegeven :

	Eitjes		J_2 -stadia	
	%	v.c.	%	v.c.
Kaolien + zachte wortels	82	4	80	5
Kaolien + harde wortels	80	4	81	5

Teneinde de invloed na te gaan van het kaolien op het rendement werd dezelfde proef uitgevoerd met zuiver kaolien (1 ml), zonder bijmenging van wortelresidu, eveneens in 8 herhalingen. De resultaten worden op volgende bladzijde weergegeven.

	Eitjes		J ₂ -stadia	
	%	v.c.	%	v.c.
na 30 sec trillen	30	29	65	10
na 60 sec trillen	53	25	78	9
na 120 sec trillen	64	9	90	3
na 10 sec mixen met kolloïdmolen	80	2	92	3

Wanneer we het gedrag van de *eitjes* nagaan, dan blijkt dat bij de gewone handelwijze, nl. 30 seconden resuspenderen in suikeroplossing met de trilroeder, slechts 30 % van het toegevoegde aantal gerecupereerd wordt.

De hypothese wordt vooropgesteld dat de eitjes, tijdens de centrifugatie in water, zich hoofdzakelijk verzamelen in en onder het laagje kaolien dat zich het eerst als een taaie korst op de holle bodem vastgezet heeft.

Tijdens het trillen wordt de bovenste laag kaolien, welke een lossere structuur vertoont, weliswaar gedispergeerd, maar in die korte tijdsspanne kan de moeilijk te bereiken holte van de bodem niet volledig geschraapt worden, terwijl de losgemaakte brokstukken niet alle volledig verpulverd worden, zodat een gedeelte van de eitjes gevat blijven in kaolienklontjes en -schilfers welke tijdens de suikercentrifugatie bezinken.

Deze veronderstelling wordt gesteund door het feit dat een langere triltijd (respectievelijk 60 en 120 seconden) een hoger rendement geeft, doordat de bodem beter kan bewerkt worden en de vrije brokjes beter uit elkaar kunnen geslagen worden.

Het beste resultaat wordt bereikt door de inzet van de kolloïdmolen, beschreven op blz. 20, gedurende 10 seconden. Een bijkomend argument is de gunstige evolutie van de variatie-coëfficiënt met de stijgende trilduur.

Bij de J_2 -stadia komt dat verschijnsel in mindere mate voor, doordat ze, omwille van hun groter zweefvermogen, gelijkmatiger over gans de kaolienlaag verdeeld zitten, en slechts een kleiner gedeelte ervan in het onderste laagje terecht komt.

Dit fenomeen is het geringst, zowel voor eitjes als voor de J_2 -stadia, in het geval van een *mengsel van kaolien met wortelresidu*, doordat zich hier, tijdens de centrifugatie, op de bodem een los bed vormt van wortelstukjes welke vóór de eitjes en de J_2 -stadia neergeslagen zijn. Niet alleen is een korte trilduur van 30 seconden voldoende om de bodem schoon te vegen maar daarenboven wordt de compactheid van de kaolienlaag verminderd doordat ze vermengd is met stukjes organisch materiaal.

3.2.4.1.2. Gezwollen stadia

Voor de gezwollen stadia gebeurde de bepaling van het rendement als volgt :

Acht homogene porties van 5 gram fijngeknijpte besmette wortels werden gemixt bij de optimale combinatie van draaisnelheid en draaiduur. Na de centrifugatie in water werd het sediment van elk monster zoveel keer na elkaar in de suikeroplossing gecentrifugeerd tot geen nematoden meer konden worden afgescheiden. Dit bleek het geval te zijn vanaf de vierde centrifugatie. Bij het uitwassen van het sediment op de gepaste zeef konden geen gezwollen stadia meer aangetoond worden. Voor elke herhaling wordt de som van de drievangsten beschouwd als de totale inhoud aan vrije gezwollen stadia en het rendement is de vangst van de eerste beurt uitgedrukt in procent van die som. Het gemiddelde rendement voor de 8 herhalingen is weergegeven in de volgende lijst, waarin ook de rendementen van de eitjes en de J_2 -stadia hernomen werden.

Ontwikkelings- stadium	Harde wortels	Zachte wortels	Gemid- deld
	%	%	%
Eitjes	80	82	81
J ₂ -stadia	81	80	80
Gezwollen juveniele stadia	87	87	87
Volwassen wijfjes	96	96	96
Gemiddeld	86	86	86

3.2.4.1.3. Interpretatie

Vooraleer de individuele gegevens voor de eitjes, de J₂-stadia en de gezwollen stadia statistisch te verwerken, werden ze alle omgezet in boog $\sin\sqrt{\text{procent}}$ -waarden, daar procenten niet normaal verdeeld zijn.

Uit de variantie-analyse volgens een factorieel schema 2 x 4, blijkt dat er geen significante verschillen in rendement zijn tussen beide worteltypes, maar wel tussen de ontwikkelingsstadia onderling (Bijlage 9, blz.96). De gemiddelden, genomen over beide wortelsoorten, welke volgens de DUNCAN-toets niet significant van elkaar verschillen, zijn in het lijstje verbonden door een streep.

Invloed van het ontwikkelingsstadium

Het gemiddeld rendement, dat voor eitjes en J₂-stadia ongeveer 80 % bedraagt, stijgt naarmate de dieren een grotere omvang aannemen. Het rendement aan eitjes en J₂-stadia is kleiner dan dat van de gezwollen stadia omdat ze, omwille van hun geringere afmetingen, tijdens het centrifugeren in suiker langer in suspensie blijven

en gemakkelijker kunnen meegesleurd worden met de dichte neerwaarts gerichte stroom van kaoliendeeltjes en vuil. De grotere lichamen, en vooral de rondere, stijgen sneller en geraken daarenboven minder gevat in het kaolien en de verontreinigingen.

Invloed van de wortelsoort

Dat er geen significant verschil blijkt te zijn tussen de rendementen aan *eitjes* en J_2 -stadia voor harde en zachte wortels, kan zijn verklaring vinden in het feit dat het volume vuil welke uiteindelijk in de centrifugebuis terecht komt relatief klein is t.o.v. het constante volume kaolien dat er aan toegevoegd wordt, waardoor een eventuele invloed van de wortelsoort niet aan het licht komt.

Ofschoon in het geval van de *gezwollen stadia*, de hoeveelheid vuil beduidend groter is dan voor de eitjes en de J_2 -stadia, kunnen de grotere en vooral de rondere lichamen zich gemakkelijker uit de ballast bevrijden, doordat ze, omwille van hun formaat, sneller stijgen, beter weerstand bieden aan de druk van het kaolien en minder meegesleurd worden door het residu, of het nu van harde of van zachte wortels afkomstig is.

3.2.4.2. Andere endoparasiterende nematoden

Voor de andere endoparasiterende nematoden, zoals *Heterodera* en *Pratylenchus* werd ook het rendement bepaald zoals bij *Meloidogyne*. In het geval van de gezwollen juveniele stadia van *Heterodera* gebeurde dit door recentrifugatie van het sediment afkomstig van aardappelwortels, en in het geval van eitjes en beweeglijke stadia van *Pratylenchus*, door toevoeging van gekende aantallen aan wortelresidu afkomstig van gemixte *Acer*-wortels.

Nematoden	%
<i>Heterodera</i> , gezwollen juveniele stadia	87
<i>Pratylenchus</i> , eitjes	70
<i>Pratylenchus</i> , beweeglijke stadia	82

Zoals te verwachten was, ligt het rendement voor de gezwollen stadia van *Heterodera* volledig in de lijn van dit bekomen bij *Meloidogyne*. Dit is eveneens het geval voor de beweeglijke stadia van *Pratylenchus*, doordat ze, gemiddeld gezien, in grootte en vorm overeenstemmen met de J_2 -stadia van *Meloidogyne*.

Het rendement aan eitjes ligt echter lager bij *Pratylenchus* dan bij *Meloidogyne*. Dit kan verklaard worden door het feit dat de *Pratylenchus*-eitjes veel kleiner zijn dan de *Meloidogyne*-eitjes. Dit heeft immers tot gevolg dat tijdens de centrifugatie in suikeroplossing de vrije *Pratylenchus*-eitjes, omwille van hun grootte, trager zullen stijgen in de suikeroplossing en gemakkelijker kunnen meegesleurd worden met de dichte regen van kaolien en vuil.

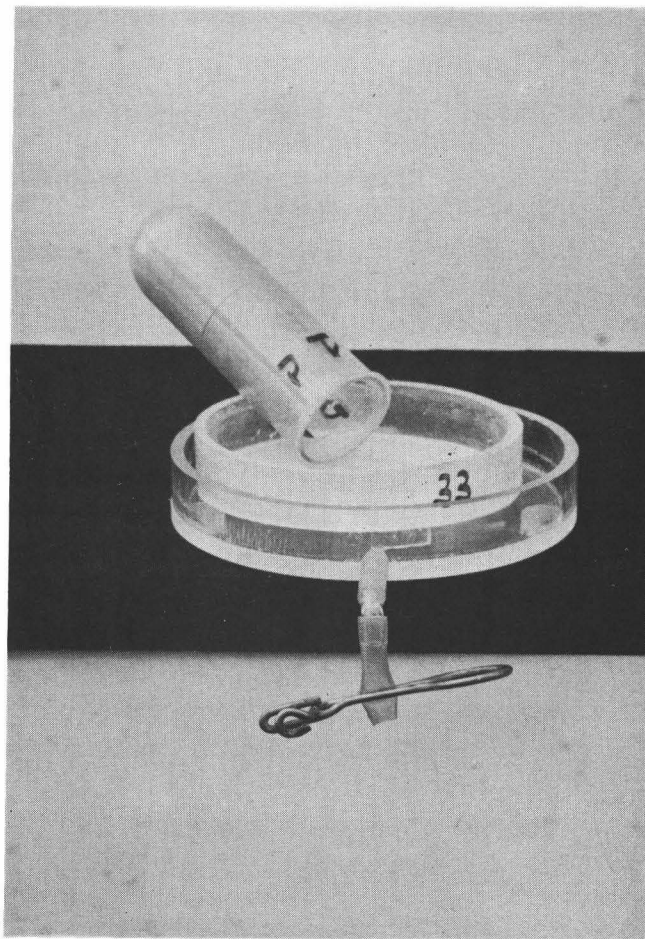
3.3. SCHEIDEN VAN DE NEMATODEN UIT DE SUIKEROPLOSSING

3.3.1. Gezwollen stadia

Het scheiden van de gezwollen stadia uit de suikeroplossing gebeurt over een zeef met een maaswijdte van 10 μ . De vangst op de zeef wordt met een nevelspuit in 100 ml water gewassen.

3.3.2. Eitjes en J_2 -stadia van *Meloidogyne*

Zelfs bij het omzichtig scherpen van een suspensie van eitjes en J_2 -stadia op om het even welke zeef, zelfs de fijnste, nl. de 5 μ -zeef, gaat een belangrijke fraktie van de inhoud aan J_2 -stadia teloor. Dit verlies is te wijten aan het feit dat een gedeelte van de J_2 -stadia, hetzij met de doorstromende vloeistof door de mazen meegesleurd worden, hetzij er in vastgeklemd raken, waardoor ze in het laatste geval een mogelijke bron van contaminatie uitmaken bij het opnieuw gebruiken van de zeef voor een volgend monsteronderzoek.



Figuur 15

Apparatuur voor het afzonderen van de eitjes en de beweeglijke stadia uit de suikeroplossing

Bij de eieren is omwille van hun grotere diameter een dergelijk verlies uitgesloten.

Teneinde het verlies aan J_2 -stadia te verhelpen wordt als volgt te werk gegaan. Een 5 μ -zeefje wordt geplaatst in een perspex schaalje dat in de zijwand tegen de bodem voorzien is van een rubberpijpje afgesloten met een knijper. Het schaalje wordt gevuld met suikeroplossing van dezelfde dichtheid tot de mazen van de zeef een paar millimeter bedekt zijn. Dan wordt de centrifugebuis met een draaiende polsbeweging uitgegoten op het 5 μ -zeefje en na even wachten wordt de knijper verwijderd zodat het schaalje, dat op een licht hellend vlak geplaatst is, zachtjes en gelijkmatig leegloopt. Het voordeel van deze handelwijze is dat bij het uitgieten de suspensie zich zeer gelijkmatig over het zeefoppervlak verspreidt doordat ze als het ware gebufferd wordt door de vloeistof in de schaal.

De J_2 -stadia worden niet meegesleurd door de mazen, maar verzamelen zich in horizontale positie aan het oppervlak van de vloeistof. Bij het lozen dalen de J_2 -stadia langzaam en plaatsen zich in dezelfde stand op het netwerk, zodat geen verlies optreedt. Het ongestoord verlopen van het ganse proces wordt nog in de hand gewerkt door het lijmen van een dun vlak plastieken plaatje in het midden van de zeefbodem, ter vervanging van het klassieke horlogeglas dat bij het uitnemen en het afsputten onnodige turbulentie in de vloeistof teweeg brengt. De opstelling van het zeefje in het schaalje wordt weergegeven in fig. 15, blz. 59.

Het residu op het zeefje wordt tenslotte met de nevelspuit in een volume van 100 ml water gewassen.

De beschreven handelwijze werd als volgt geargumenteed : Uit een liter aangerijkte suspensie van J_2 -stadia in water, werd na grondig homogeniseren met een trilroerder, 28 maal 10 ml uitgepipetteerd. Vierentwintig dergelijke volumes werden aangelengd met de suikeroplossing tot 100 ml en gecen-

trifugeerd. Van elk van de vier overige werd de inhoud bepaald en het gemiddelde hiervan werd beschouwd als zijnde de gemiddelde inhoud van elke centrifugebuis, nl. $1\ 254 \pm 52$.

Na het centrifugeren werden de buizen op de volgende wijzen, in 8 herhalingen, over de 5 μ -zeef uitgegoten :

A : uitgieten over de 5 μ -zeef (*zeef vrij*)

B : uitgieten over de 5 μ -zeef geplaatst in het schaalpje gevuld met water (*zeef onder water*)

C : idem als B, maar het schaalpje gedeeltelijk gevuld met suikeroplossing met dezelfde dichtheid (*zeef onder suikeroplossing*).

Voor elke herhaling werd het *rendement* bepaald, d.i. het aantal nematoden dat op de 5 μ -zeef gerecupereerd werd, uitgedrukt in procent van de gemiddelde inhoud van de startpopulatie. Volgende gemiddelde rendementen werden bekomen :

	%	v.c.
<i>Zeef vrij</i>	54	18
<i>Zeef onder water</i>	71	8
<i>Zeef onder suikeroplossing</i>	94	5

Na een boog $\sqrt{\text{procent}}$ - transformatie van de procenten werden ze aan een variantie-analyse onderworpen (Bijlage 10, blz 96).

Na toepassing van de DUNCAN-toets op de gemiddelde rendementen bleek dat ze alle 3 van elkaar significant verschillen.

Rekening houdend met de variatiecoëfficiënt welke voor de methode waarbij het zeefje in de suikeroplossing ondergedompeld wordt het kleinst is, kan besloten worden dat deze niet alleen het hoogste rendement aan J_2 -stadia oplevert maar ook de grootste reproduceerbaarheid biedt.

Opmerking : De eitjes van de vrij beweeglijke endoparasiterende nematoden kunnen, omwille van hun afmetingen, evenmin door de 5 μ -zeef als deze van *Meloidogyne*. Voor de beweeglijke stadia, ook de kleinste, geldt voorgaande redenering.

3.4. TELLEN VAN DE NEMATODENSUSPENSIES

De 100 ml suspensie van nematoden in water wordt grondig gehomogeniseerd door middel van een trilroerder. Het gebruik van dit toestel heeft het voordeel op het systeem van homogeniseren met toegevoerde perslucht, dat het de bodem van het glazen bekertje volledig vrijmaakt van eitjes van *Meloidogyne*, welke na enkele uren rust van de suspensie aan het glas kunnen kleven.

Uit de gehomogeniseerde suspensie wordt tweemaal 10 ml uitgepipetteerd en geteld in telglasjes beschreven in paragraaf 3.5. Het gemiddelde van beide tellingen geeft na omrekening voor eitjes en beweeglijke stadia de inhoud van 1 gram wortel. Voor de gezwollen stadia, welke gewoonlijk in veel lagere aantallen voorkomen, geeft deze berekening de inhoud van 5 gram, zijnde het totale monster. Verwacht men een lage besmetting dan kan in beide gevallen het residu van het zeefje handig met een zacht fijn waterstraaltje afgespoeld worden in 10 à 20 ml water, en kan de totale inhoud bepaald worden.

De suspensies van de eitjes en beweeglijke stadia zijn steeds zuiver en vrij van storende verontreinigingen. De suspensies van de wijfjes van *Meloidogyne* bevatten tevens de eitjes en ook een gedeelte van de J_2 -stadia die bij het reduceren van het mixtum op het 10 μ -zeefje achtergebleven waren. Deze bijmenging vormt echter geen storend element bij de telling. Trouwens, kent men het ontwikkelingsstadium van *Meloidogyne* in het te onderzoeken wortelmateriaal, dan kan een zeefje met zulke maaswijdte gekozen worden, dat de gezwollen stadia weerhouden en de eitjes en J_2 -stadia doorgelaten worden.

3.5. BESCHRIJVING VAN HET MATERIEEL

De homogenisatiekruik

Deze kruik met een inhoud van ongeveer 1,5 liter is vervaardigd uit transparante perspex (methylnmetacrylaat). Ze bestaat uit 2 delen : een cilindervormig lichaam met een aftappijpje voorzien van een stukje rubberslang met sluitklem, en een trechtervormig gedeelte met een hals. De afmetingen van de kruik zijn weergegeven in fig. 13, blz. 42 . Deze verschillende delen worden aan elkaar gekleefd met een polymeriserende vloeistof (Acrifix 92-vloeibaar). Deze kleurloze vloeistof verhardt binnen de 3 à 6 uur onder inwerking van het zonlicht of van een ultraviolette straling geleverd door T.L.-lampen.

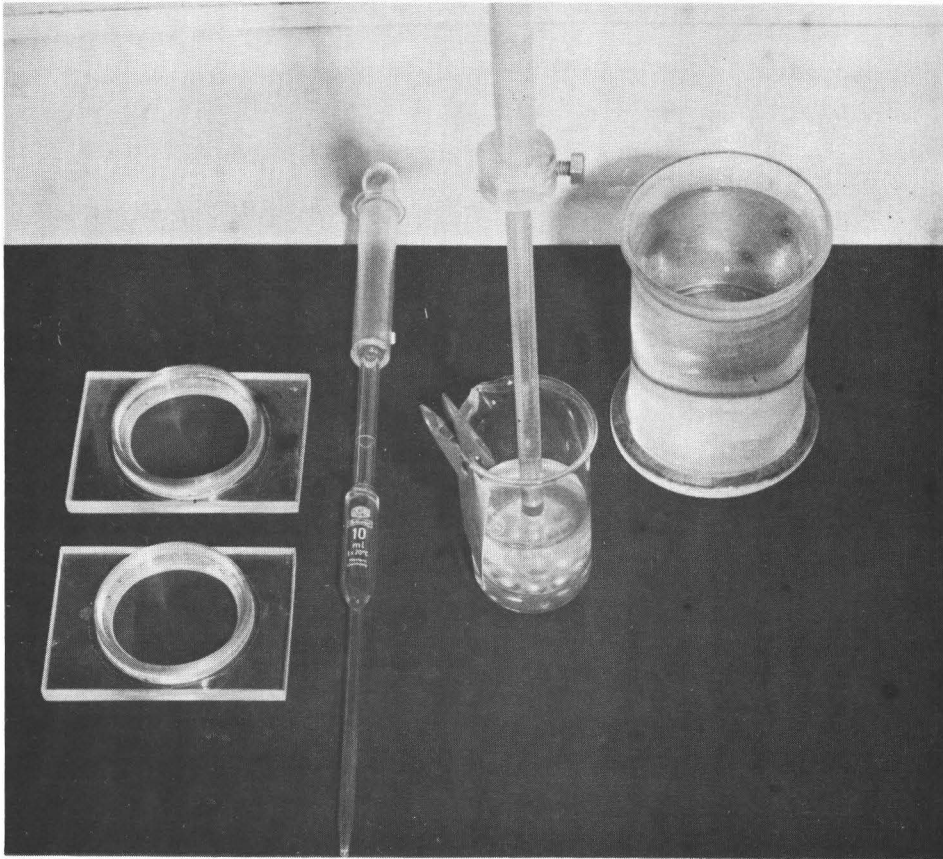
De hals kan binnen de kruik afgesloten worden met een gummistop die op een metalen staafje is vastgemaakt. De perslucht wordt onderaan langs de hals aangevoerd via een buisje dat in een gummistop is aangebracht.

De 10 μ - en de 1 000 μ -zeven

Deze zeven bestaan uit een zeefbodem gevat tussen twee ringen. De bovenste en de onderste ring zijn respectievelijk 4 en 1,5 cm hoog. Ze worden op deze hoogten afgezaagd van een perspex-buis met een binnendiameter van 11 cm. Het zeefdoek zelf is geweven uit nylondraad en is onder de naam "MONODUR" in de handel verkrijgbaar.

Het vervaardigen der zeven gebeurt als volgt :

Een stuk gaasdoek wordt aangespannen op een zuivere glasplaat, terwijl op een ander stuk glas een scheut chloroform gegoten wordt, waarin de bovenste ring ongeveer een minuut draaiend gewreven wordt tot het randoppervlak week en kleverig wordt. Vervolgens wordt de ring onmiddellijk op het gaasdoek geplaatst en er op aangedrukt met een gewicht van 5 à 10 kg. Na ongeveer 15 minuten is het kleefoppervlak voldoende verhard en kan het overvloedige gaasdoek weggesneden worden. Op dezelfde wijze wordt de onderste ring behandeld en onder hetzelfde gewicht tegen het



Figuur 16

Apparatuur voor het tellen van nematodensuspensies

zeefweefsel aangedrukt. In de onderste ring worden een vier-tal schuingerichte gaatjes geboord om bij het stromen van een vloeistof door op elkaar geplaatste zeven tegendruk te vermijden. Voor het vervaardigen van zeven met **grotere** maas-wijde, zoals de 1 000 μ -zeef, is het weken van de randen in chloroform onvoldoende en dienen ze voorafgaandelijk in-gesmeerd te worden met een brijige oplossing van perspex in chloroform.

Het 5 μ -zeefje

Dit zeefje bestaat uit een perspex-ring van 20 mm hoog en met een diameter van 11 cm, gekleefd op een zeefbodem van 5 μ , zoals in voorgaande paragraaf beschreven. De ring is onderaan voorzien van 3 steunpootjes van 7 mm hoog. In het midden van het zeefoppervlak is een vlak dun perspex-plaatje met een diameter van 30 mm gekleefd waar de suikeroplos-sing op uitgegoten wordt. Het perspex-schaaltje waarin het zeefje geplaatst wordt heeft een binnendiameter van 14 cm en is zijdelings onderaan geperforeerd en voorzien van een kort stukje gummislang.

Het telglaasje

Het telglaasje, volledig uitgevoerd in perspex, bestaat uit drie delen :

- een vlakke plaat van 90 op 110 mm, en 6 mm dik.
- een ring van 12 mm hoog met een buiten- en een binnendia-meter van respectievelijk 70 en 56 mm. De binnenkant is co-nisch afgewerkt (\pm 25 graden) en zeer helder gepolijst. De onderkant van de ring is lichtjes schuin naar binnen toelo-pend (\pm 2 graden) afgewerkt.
- een vlakke plaat, met dezelfde afmetingen als de eerste, met in het midden een ronde uitsparing met een diameter van 70 mm.

Deze drie elementen worden als volgt samengevoegd : de ring wordt in het midden van de volle plaat aangebracht en lichtjes aangedrukt. Rond de buitenkant van de ring verdeelt men een tiental druppeltjes chloroform welke een eerste vasthechting geven. Na een kwartiertje drogen, wordt de definitieve hechting met ACRIFIX verzekerd. Daarna brengt men de plaat met de uitsparing aan. Tenslotte worden, met een zeer fijn geslepen insektenspeld, evenwijdige lijntjes binnen de cirkel getrokken.

Opmerking : Omwille van het feit dat tijdens het bewerken van de perspex-onderdelen inwendige spanningen in het materiaal kunnen optreden, welke ontstaan kunnen geven aan barsten of haarscheurtjes, worden de afgewerkte onderdelen alvorens gelijmd te worden, in een oven opgewarmd tot 85 à 90° C gedurende 3 uren en daarna geleidelijk afgekoeld.

Fig. 16, blz. 64, geeft een beeld van de apparatuur voor het analyseren van nematodensuspensies.

HOOFDSTUK IV

NUT VAN DE METHODE

De voordelen en de toepassingsmogelijkheden van de methode worden in dit hoofdstuk besproken.

4.1. VOORDELEN VAN DE METHODE

De voordelen van de methode zijn : eenvoud, snelheid en betrouwbaarheid.

4.1.1. Eenvoud

Ze is eenvoudig, en uit te voeren met eenvoudige en goedkope middelen, wanneer men een centrifuge, een mixer en een trilroerder tot de basisapparatuur van een nematologisch laboratorium rekent. De overige uitrusting, zoals de homogenisatiekruik, de zeven en de nevelspuit zijn alle gemakkelijk te vervaardigen uit materialen welke gestandardiseerd in de handel te verkrijgen zijn. De apparatuur is gemakkelijk te reinigen, mede door de doorzichtigheid of de mat-witte kleur van de materialen.

4.1.2. Snelheid

Ze is snel, de gemiddelde tijd om een wortelmonster te onderzoeken, vanaf het mixen tot het in zuiver water brengen van de nematoden, bedraagt hoogstens 10 minuten, wanneer dit uitgevoerd wordt in een serie-onderzoek van acht monsters. Wil men, in het geval van *Meloidogyne*, zowel op de eitjes en J₂-stadia als op de gezwollen stadia onderzoeken, dan neemt dit minder dan 20 minuten in beslag. Deze gegevens werden ontleend aan een *tijdstudie*, waarbij het ganse extractieproces onderverdeeld werd in 8 bewerkingen, terwijl elke bewerking een aantal handelingen of elementen omvat. De tijd welke met een bewerking overeenstemt is de

normtijd, d.i., in het algemeen, de tijd die een vakbekwaam persoon nodig heeft om een bepaalde bewerking volgens een bepaalde, welomschreven werkmethode onder welomschreven omstandigheden te verrichten, indien gewerkt wordt met een normale inspanning (DALLINGA & SONNEMA, 1962).

De normtijden worden weergegeven in de samenvattende tabel 10, blz.70, waar elke bewerking door haar bijzonderste handeling bondig getypeerd wordt.

Het aantal monsters welke in één arbeidsgang behandeld wordt bedraagt 8, zijnde de capaciteit van de centrifuge. De tijdstudie werd uitgevoerd voor het onderzoek op de eitjes en de beweeglijke stadia van *Meloidogyne* en van de vrij beweeglijke endoparasiterende nematoden (*Pratylenchus*, *Radopholus*, *Ditylenchus*) enerzijds, en voor het onderzoek op de gezwollen stadia van *Meloidogyne* en *Heterodera* anderzijds.

De 8 bewerkingen groeperen de volgende handelingen :

Mixen

Het mixen van elk wortelmonster, het telkens overgieten van de inhoud van de mixerbokaal in een plastieken beker en het nawassen van de bokaal.

Reduceren van het mixtum

- het gieten en wassen van het mixtum in de homogenisatiekruik, het homogeniseren en het aftappen in het centrifugebuisje in het geval van eitjes en beweeglijke stadia van *Meloidogyne* en van de vrij beweeglijke endoparasiterende nematoden.

- het gieten en wassen van het mengsel over een stel van een 1 000 μ en een 10 μ -zeef, en het wassen van het residu van de 10 μ -zeef in de centrifugebuis, in het geval van de gezwollen stadia.

Mengen met kaolien

Het inbrengen van kaolien in het centrifugebuisje, het homogeniseren met de trilroerder en het plaatsen van de buisjes in de centrifuge.

*Centrifugeren in water**Resuspenderen*

Het afgieten van het bovenstaande water uit de centrifugebuisjes, het bijvullen met suikeroplossing, het resuspenderen van het sediment met de trilroerder, en het terugplaatsen van de buisjes in de centrifuge.

*Centrifugeren in de suikeroplossing**Zeven van de suikeroplossing*

Het afgieten van de bovenstaande suikeroplossing op een 10 μ -zeef in het geval van de gezwollen stadia, en op het 5 μ -zeefje op de beschreven manier in de andere gevallen. Het spoelen van de nematoden van de zeven in 100 ml water.

Afloop

Het grondig nawassen van de zeven, centrifugebuisjes, enz., en het opbergen ervan.

Opmerking : Tijdens de perioden waar de persoon werkloos is, zoals tijdens het centrifugeren, kunnen allerlei kleine werkjes verricht worden, zoals het halen en etiketteren van bekertjes, het opstellen van de 5 μ -zeefjes enz., zonder dat de totale procestijd beïnvloed wordt.

Tabel 10. Norm- en procestijden voor de extractie van endoparasiterende nematoden uit plantaardig weefsel

	Normtijden (minuten)	
	Eitjes en beweeglijke stadia	Gezwollen stadia
Mixen	24	10
Reduceren van het mixtum	20	20
Mengen met kaolien	4	4
Centrifugeren in water	8	8
Resuspenderen	5	5
Centrifugeren in de suikeroplossing	6	6
Zeven van de suikeroplossing	5	5
Afloop	10	10
Totale procestijd voor 8 monsters	82	68
Gemiddelde procestijd per monster	10	8

4.1.3. Betrouwbaarheid

Ze is betrouwbaar, doordat ze nauwkeurige en reproduceerbare resultaten geeft. De redenen hiervoor zijn :

- alle stadia, ook de immobiele, worden geëxtraheerd, zodat elke nematode op ieder ogenblik van zijn ontwikkeling kwantitatief kan aangetoond worden.
- ze geeft voor elk stadium een hoog en daarenboven een gekend rendement, zodat de werkelijke inhoud dicht kan benaderd worden.
- ze is in elke fase gestandaardiseerd en levert in zeer korte tijd het volledige resultaat, zodat toevallige fouten, persoonlijke en andere, grotendeels uitgesloten zijn.

Bij wijze van illustratie wordt de mixer-centrifugemethode met een drietal andere vergeleken, voor verschillende parasieten en diverse wortelsoorten. De betreffende technieken werden in ons laboratorium als volgt uitgevoerd :

De sproeivevelmethode (OOSTENBRINK, 1960)

De opstelling bestaat uit een rek waarop 3 stellen van elk 12 trechters met een bovendiameter van 11 cm kunnen geplaatst worden, met in het midden van elk stel een speciaal gekozen spuitdop (Teejet spray nozzle with cone jet tip 1/4 TX, 0.040" x 0.360") welke met zijn opwaarts gerichte spuitkegel aan elke trechter 100 tot 500 ml water per uur afgeeft. Op elke trechter wordt een 2,5 cm diepe steunzeef met een diameter van 8 cm geplaatst door middel van 3 zijdelings geplaatste beentjes, zodanig dat de zeef het oppervlak van het water in de trechter raakt. Een onderste boord, evenwijdig lopend met de trechterwand en 2 cm in het water reikend, geeft een bijkomende beveiliging tegen het meesleuren van de nematoden met het overvloeiende water. De extractietijd bedraagt 7 dagen, waarbij regelmatig de nematoden verzameld worden door het openen van de MOHR-klem onderaan het stukje rubberslang welke de steel van de trechter verlengt.

De mixer-wattenfiltermethode (STEMERDING, 1964)

Hierbij wordt 10 gram fijngeknipte wortels gedurende 5 seconden gemixt in 100 ml water in een mixer PAUL MIXI 2 000 (10 000 omwentelingen per minuut). De suspensie met de worteldelen wordt over een wattenfilter gespoeld, terwijl het filter gedurende twee dagen in een extractieschaaltje geplaatst wordt met zoveel water dat het juist wordt bevochtigd.

De luchttoevoermethode (SCOTTO LA MASSESE, ongepubliceerd)

Het betreft een adaptatie van een methode gebruikt in het *Station de Recherches sur les Nématodes*, te Antibes. Door middel van een aquariumpompje wordt perslucht ingebracht in een hoofdleiding waarop, via regelbare kraantjes, 8 gelijke gummislangetjes aangesloten zijn welke elk uitmonden in een bokaal gevuld met 250 ml water en 5 gram wortels. De extractietijd bedraagt hier 7 dagen.

Bij de vergelijking werd telkens uitgegaan van een gehomogeniseerde wortelmassa, waarbij per getoetste methode 8 maal 5 gram afgenomen werd. Alleen voor de mixer-wattenfiltermethode werd de voorgeschreven 10 gram gebruikt, maar in de tabellen werden de gehalveerde aantallen aangegeven, omwille van de vergelijkbaarheid met de andere getallen. De resultaten zijn weergegeven in de tabellen 11 en 12, blz. 73 en 74. Het symbool \bar{X} betekent het gemiddeld aantal nematoden per 5 gram wortels, terwijl de afkorting V.C. de variatiecoëfficiënt voorstelt. In de vergelijking konden niet steeds de vier methoden betrokken worden. Waar gegevens ontbreken, wordt dit aangegeven door een stip . , overeenkomstig een afspraak voorgesteld door DE BOER et al. (1968).

4.1.3.1. Meloidogyne

In tabel 11. blz. 73 worden de gemiddelde aantallen eitjes + J_2 -stadia aangegeven. Voor de sproeinevel- en de mixer-wattenfiltermethode betreft het uiteraard alleen J_2 -stadia, terwijl de aantallen bekomen met de luchttoevoer ongeveer 25 % eitjes bevatten welke vrijgekomen zijn uit uitwendig zittende eiklompjes.

Tabel 11. Vergelijking tussen de gemiddelde aantallen eitjes en J_2 -stadia van *Meloidogyne* bekomen met de mixer-centrifugemethode en deze verkregen met 3 andere courant gebruikte extractietechnieken

- gemiddelde aantallen per 5 gram wortels

Methode	Tomaat		Tomaat		Roos	
	<i>M. hapla</i>		<i>M. incognita</i>		<i>M. hapla</i>	
	\bar{X}	V.C.	\bar{X}	V.C.	\bar{X}	V.C.
Mixer-centrifuge	38 200	8	56 600	7	21 700	11
Sproeinevel	7 400	22	400	29	1 300	25
Mixer-wattenfilter	9 400	21	1 300	20	2 500	20
Luchttoevoer	16 200	15	.	.	4 500	9

4.1.3.2. Vrij beweeglijke endoparasiterende nematoden

De resultaten zijn voorgesteld in tabel 12, blz. 74. Het betreft hier een aantal gevallen waar verschillende plant-aardige weefsels bij betrokken zijn en 3 nematode-soorten, nl. *Pratylenchus penetrans*, *Radopholus similis* en *Ditylenchus dipsaci*.

De gemiddelden slaan hier alleen op het aantal beweeglijke stadia. De gemiddelde aantallen eitjes per 5 gram welke uiteraard alleen met de mixer-centrifugemethode konden verzameld worden, zijn in het staatje op bladzijde 75 opgegeven.

Tabel 12. Vergelijking tussen de gemiddelde aantallen beweeglijke stadia van vrij beweeglijke endoparasiterende nematoden bekomen met de mixer-centrifugemethode en deze verkregen met 3 andere courant gebruikte extractietechnieken

- gemiddelde aantallen nematoden per 5 gram wortels

Pratylenchus uit wortels van houtige planten

Methode	Acer- <i>Pratylenchus</i>		Rosa- <i>Pratylenchus</i>	
	\bar{X}	V.C.	\bar{X}	V.C.
Mixer-centrifuge	12 160	10	9 360	12
Sproeinevel	3 950	15	1 280	22
Mixer-wattenfilter	3 890	14	890	20
Luchttoevoer	5 520	16	700	23

Pratylenchus uit wortels van niet houtige planten

Methode	Calathea- <i>Radopholus</i>		Begonia- <i>Pratylenchus</i>	
	\bar{X}	V.C.	\bar{X}	V.C.
Mixer-centrifuge	2 960	13	20 190	10
Sproeinevel	505	17	9 060	9
Mixer-wattenfilter	465	20	.	.
Luchttoevoer	388	22	.	.

Ditylenchus uit voederbiet

Methode	\bar{X}	V.C.
Mixer-centrifuge	5 175	8
Sproeinevel	1 510	8

<i>Acer-Pratylenchus penetrans</i>	:	8 210
<i>Rosa-Pratylenchus penetrans</i>	:	7 025
<i>Calathea-Radopholus similis</i>	:	2 350
<i>Begonia-Pratylenchus penetrans</i>	:	20 090
Voederbiet- <i>Ditylenchus dipsaci</i>	:	4 770

Fig.17, blz. 81, geeft een detailbeeld van de vrijgemaakte eitjes en beweeglijke stadia van *Ditylenchus dipsaci* uit het weefsel van bieteknollen.

4.1.3.3. Besluit

Uit de vergelijking tussen de methoden, voor verschillende worteltypes en nematode-soorten, kan gesteld worden dat de mixer-centrifugemethode steeds een hoger rendement en een lagere variatiecoëfficiënt oplevert.

Wanneer men deze gegevens als maat neemt respectievelijk voor de nauwkeurigheid en de reproduceerbaarheid van een methode, dan moet tot een hogere betrouwbaarheid van de mixer-centrifugemethode besloten worden.

4.2. TOEPASSINGEN VAN DE METHODE

Hiernavolgend wordt een keuze weergegeven uit het uitgebreide gamma van toepassingsmogelijkheden welke de methode biedt. De geselecteerde voorbeelden kunnen als volgt gerubriceerd worden :

- Studie van de nematoden op zichzelf
- Studie van de ontwikkelingscyclus van de nematoden
- Resistentie-onderzoek
- Fytosanitaire voorlichting en inspectie

4.2.1. Studie van de nematoden op zichzelf

Het feit dat endoparasiterende nematoden in ieder stadium van hun ontwikkeling, op een snelle wijze, in grote aantallen in een zuivere suspensie kunnen verzameld worden, maakt dat de methode ook in zeer gespecialiseerde nematologische disciplines nuttig gebruik kan vinden. Bij wijze van voorbeeld worden een paar mogelijkheden geschetst, waar uiteraard niet verder op ingegaan wordt.

Systematisch onderzoek : o.a. bij de beschrijving van een nematode-species, waar ieder ontwikkelingsstadium met een groot aantal individuën kan betrokken worden.

Cytogenetisch onderzoek : o.a. bij het chromosomenonderzoek van *Meloidogyne* waar de gonaden van volwassen wijfjes moeten verzameld en gekleurd worden.

Biochemisch onderzoek : o.a. bij het bestuderen van eiwitten en andere bestanddelen van het nematodenlichaam.

4.2.2. Studie van de ontwikkelingscyclus van de nematoden

De methode laat toe, omwille van haar hoge nauwkeurigheid en herhaalbaarheid, na te gaan hoe de ontwikkeling van een endoparasiterende nematode beïnvloed wordt door ecologische factoren zoals temperatuur, licht, waardplanten, chemicaliën, enz. Een paar voorbeelden, ontleend aan eigen onderzoek, illustreren de bruikbaarheid van de methode op

~~methode~~ op dit gebied. Het betreft de beïnvloeding van de ontwikkeling van een parasiet, respectievelijk door een resistente waardplant en door systemische nematiciden. De resultaten, weergegeven in de tabellen 13, en 14, vervullen in het raam van dit werk alleen een ondergeschikte rol en worden niet verder besproken. Ze worden alleen met een minimum aan gegevens gesitueerd in het oorspronkelijke onderzoek.

Voorbeeld 1. Studie van de ontwikkeling van Heterodera rostochiensis in een resistente aardappelvariëteit

In een pottenproef werd nagegaan in welk stadium de ontwikkeling geremd werd van *Heterodera rostochiensis*, biotype A, in de resistente aardappelvariëteit SCALDIA. Als referentie werd ook de gevoelige variëteit BINTJE in het onderzoek ingeschakeld.

De aardappelen werden geplant op 19/5/70 en bemonsterd ongeveer 1 en 2 maand na het planten. De resultaten zijn weergegeven in tabel 13.

Tabel 13. Vergelijking van de ontwikkeling van Heterodera rostochiensis, biotype A, in een vatbare (BINTJE) en in een resistente (SCALDIA) aardappelvariëteit

Ontwikkelings- stadium	Aantallen per 5 g wortels			
	BINTJE		SCALDIA	
	23/6/70	16/7/70	23/6/70	16/7/70
J ₂	305	48	3 445	3 275
J ₃ -J ₄	1 085	45	520	380
wijfjes	330	4 130	0	7

Voorbeeld 2. Studie van de invloed van systemische nematiciden op de ontwikkelingscyclus van nematoden.

De invloed van 2 systemische nematiciden, nl. Aldicarb en D 1410 op de ontwikkelingscyclus van nematoden werd nagegaan. Het proefdier was *Meloidogyne naasi* en het toetsgewas zomertarwe. De zomertarwe werd gezaaid op 19/5/70 en terzelfdertijd werden de produkten in de volgende doses toegepast:

Aldicarb 10 % : 6 en 12 gram per m² (A₆, A₁₂)

D 1410 25 % : 2 en 4 ml per m² (D₂, D₄)

De bemonstering gebeurde op 24/6 en een maand later op 22/7/70.

De resultaten zijn neergelegd in tabel 14.

Tabel 14. Onderzoek naar de invloed van systemische nematiciden op de ontwikkeling van *Meloidogyne naasi*

- aantallen per 5 gram wortels

	Wortelbemonstering op 24/6/70				
	J ₂	J ₃ -J ₄	♀	E	E/♀
Getuige	90	250	1 920	0	0
A ₆	1 630	185	260	0	0
A ₁₂	335	30	10	0	0
D ₂	165	20	0	0	0
D ₄	120	5	0	0	0
	Wortelbemonstering op 22/7/70				
	J ₂	J ₃ -J ₄	♀	E	E/♀
Getuige	0	0	2 200	267 000	122
A ₆	0	0	370	5 850	16
A ₁₂	0	0	75	435	6
D ₂	0	0	20	51	3
D ₄	0	0	20	65	3

4.2.3. Resistentie-onderzoek

Het onderzoek van verschillende plantesoorten of verschillende variëteiten van eenzelfde plantesoort op hun vatbaarheid voor aantasting door een bepaalde parasiet, stelt hoge eisen aan de beoordeling ervan. Dit is bijzonder waar in het geval van *Meloidogyne*, zoals besproken werd in de inleiding. In tabel 15, blz. 80, geven we de resultaten van een dergelijk onderzoek van 11 roze-onderstammen op hun resistentie tegen *Meloidogyne hapla*. Evenmin als in de andere voorbeelden worden ze zelfstandig besproken. De bedoeling is alleen te demonstreren hoe niet alleen voor de eitjes en J₂-stadia een gradatie in besmetting tussen de verschillende onderstammen kan aangetoond worden, maar zelfs voor de eileggende wijfjes.

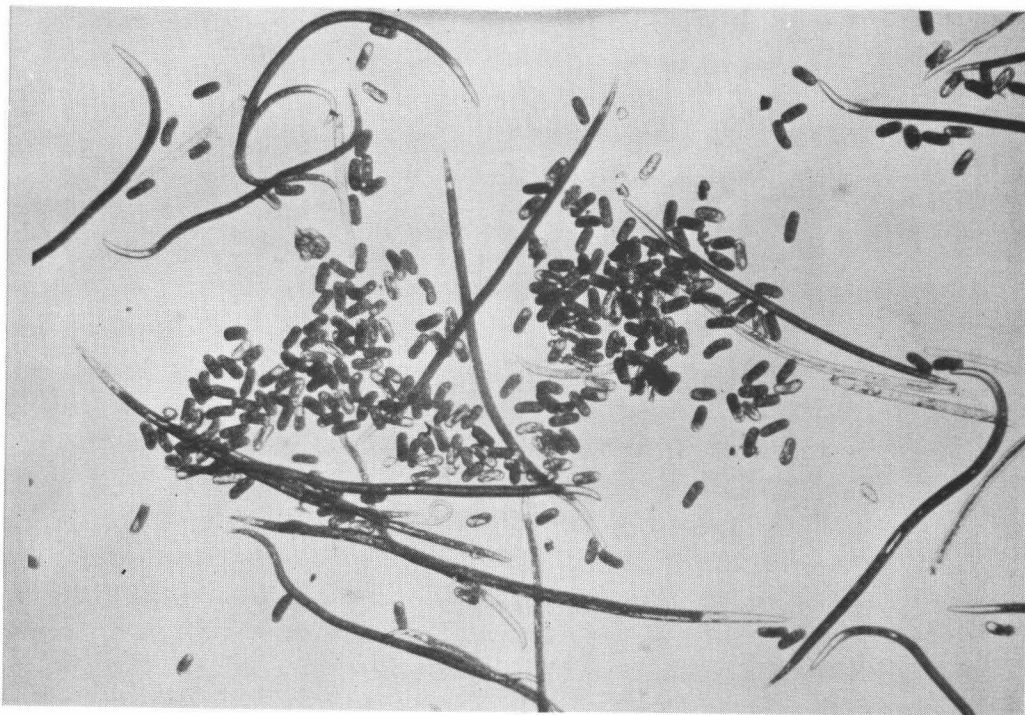
Als voorbeeld van de bruikbaarheid van de methode in het geval van *vrij beweeglijke endoparasieten*, worden de resultaten gegeven van een analoge proef, met betrekking op *Pratylenchus penetrans*. In tabel 16, blz. 82, zijn de roze-onderstammen gerangschikt in dalende volgorde van hun *totaal besmettingspotentieel*, zijnde de som van de eitjes en de beweeglijke stadia.

Tabel 15. Onderzoek van 11 roze-onderstammen op hun resistentie tegen *Meloidogyne hapla*

- Blokkenproef met 4 herhalingen
- 40 planten per experimentele eenheid

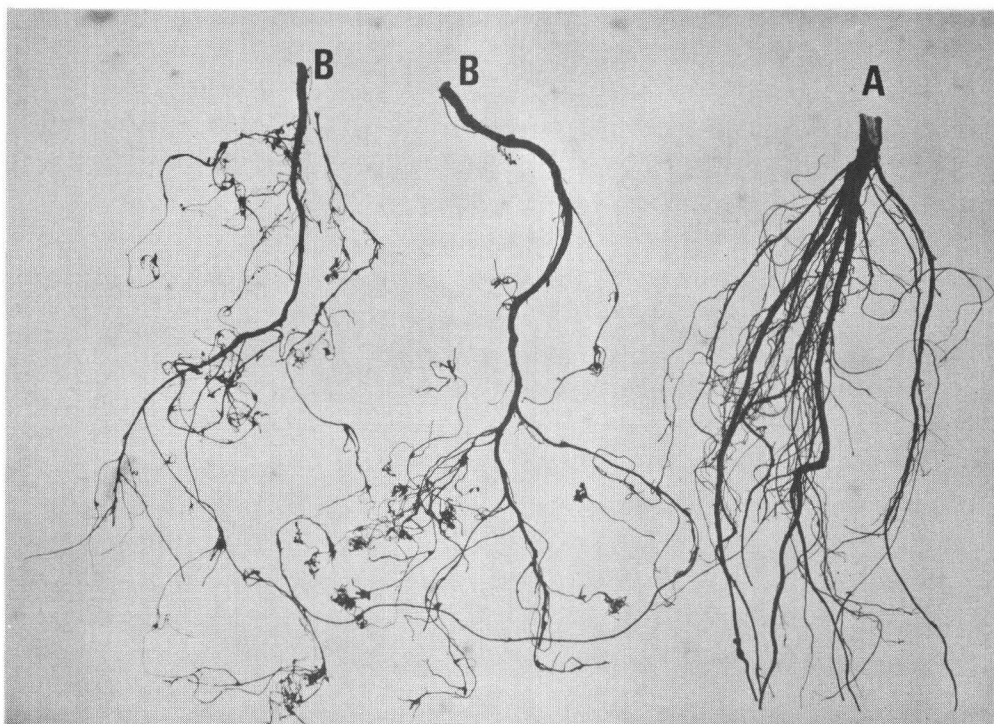
Roze-onderstammen	Gemiddelde aantallen nematoden per 5 gram wortels (x)	
	Wijfjes	Eitjes + J ₂ -stadia
<i>Rosa dumetorum</i> THUILL. 'Laxa'	166	51 156
<i>Rosa multiflora</i> THBH	142	42 925
<i>Rosa canina</i> L. 'Pollmers'	80	11 493
<i>Rosa canina</i> L.	72	7 892
<i>Rosa canina</i> L. 'Schmids Ideal'	32	5 200
<i>Rosa canina</i> L. 'Inermis'	31	4 737
<i>Rosa canina</i> L. 'Brögs Stachellose'	21	3 976
<i>Rosa rubiginosa</i> L.	18	2 411
<i>Rosa canina</i> L. 'Pfänder'	7	1 850
<i>Rosa canina</i> L. 'Succes'	5	425
<i>Rosa canina</i> L. 'Heinsohn's Rekord'	3	218

(x) De gemiddelden welke niet significant van elkaar verschillen zijn verbonden door een streep



Figuur 17

Eitjes en beweeglijke stadia van *Ditylenchus dipsaci*, afgezonderd uit voederbietenknollen
 Besmettingsgraad : 4 800 eitjes en 5 200 beweeglijke stadia per 5 gram



Figuur 18

Worteltjes van *Rosa dumetorum* THUILL. 'Laza', aangetast door *Meloidogyne hapla*

A : niet besmet

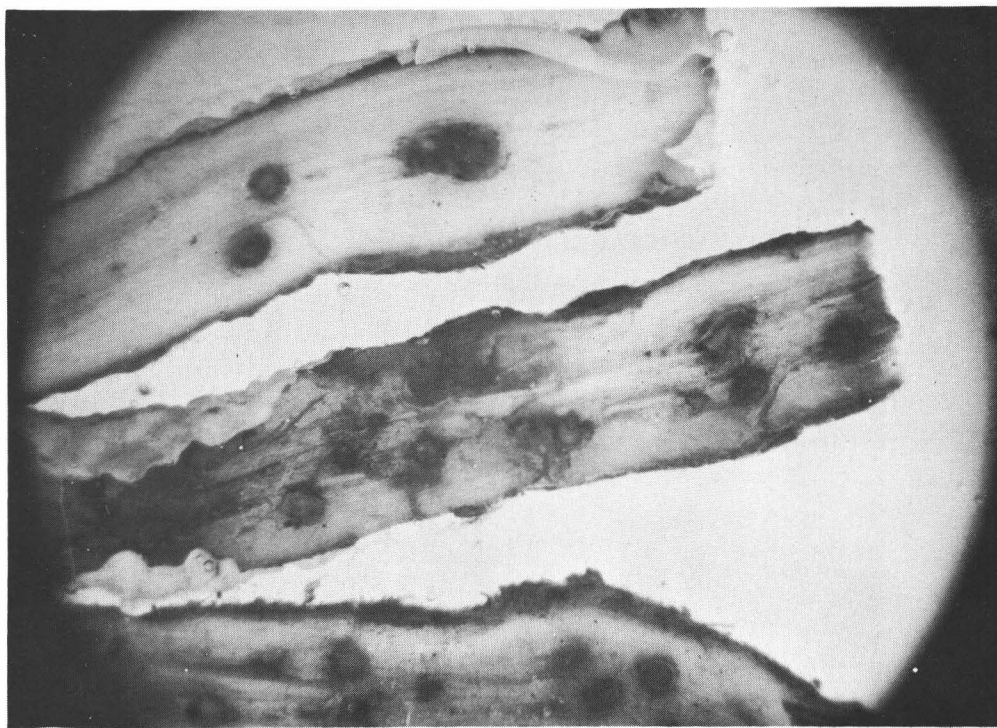
B : besmet; uit 1,1 gram werden 19 100 eitjes en J₂-stadia afgezonderd

Tabel 16. Onderzoek van 13 roze-onderstammen op hun resistentie tegen *Pratylenchus penetrans*

- Blokkenproef met 4 herhalingen
- 40 planten per experimentele eenheid

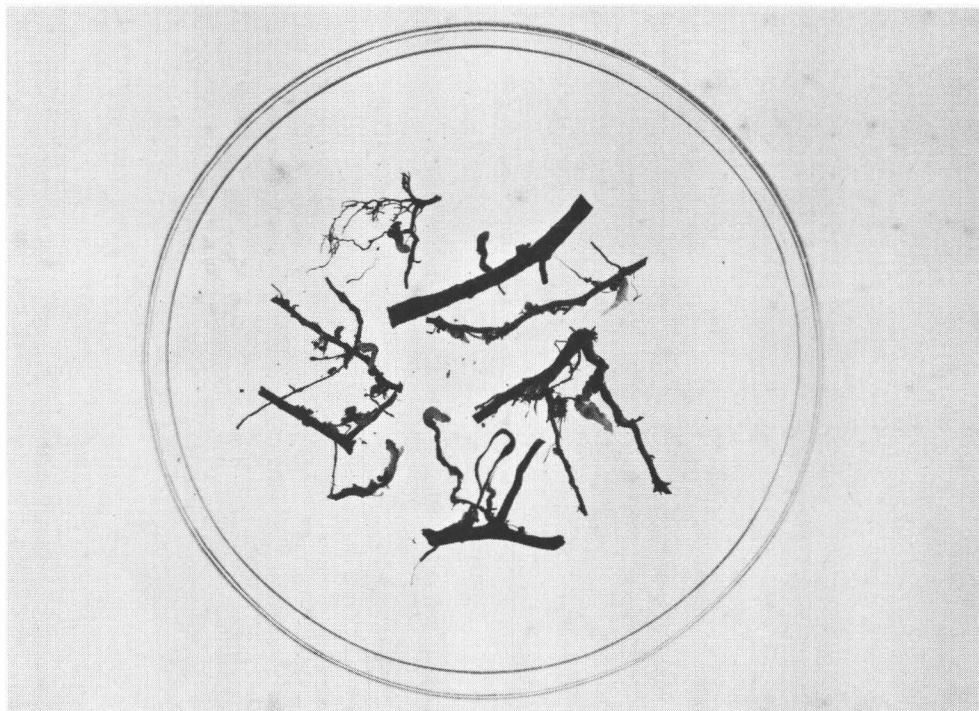
Roze-onderstammen	Gemiddelde aantallen nematoden per 5 gram wortels		
	Beweeglijke stadia	Eitjes	Eitjes + beweeglijke stadia (x)
<i>Rosa multiflora</i> THBH	7 850	7 118	14 968
<i>Rosa canina</i> L. 'Pollmers'	6 468	5 768	12 236
<i>Rosa canina</i> L. 'Brögs Stachellose'	7 831	4 268	12 099
<i>Rosa canina</i> L. 'Inermis'	6 050	4 506	10 556
<i>Rosa canina</i> L. 'Pfänder'	5 106	2 781	7 887
<i>Rosa canina</i> L. 'Heinsohn's Rekord'	5 031	2 112	7 143
<i>Rosa canina</i> L. 'Succes'	3 006	3 381	6 387
<i>Rosa canina</i> L.	3 837	2 462	6 299
<i>Rosa chinensis</i> JACQ. 'Manettii'	3 025	2 506	5 531
<i>Rosa canina</i> L. 'Schmids Ideal'	2 312	1 712	4 024
<i>Rosa dumetorum</i> THUILL. 'Laxa'	2 325	1 662	3 987
<i>Rosa rubiginosa</i> L.	2 300	1 512	3 812
<i>Rosa chinensis</i> JACQ. 'Major'	768	687	1 455

(x) De gemiddelden welke niet significant van elkaar verschillen zijn verbonden door een streep



Figuur 19

Langsdoorsnede van wortels van *Monstera deliciosa* LIEBM.
'Borsigiana', aangetast door *Meloidogyne arenaria*



Figuur 20

Galletjes op rozewortels, veroorzaakt door *Xiphinema diversicaudatum*

4.2.4. Fytosanitaire voorlichting en inspectie

De fyto-sanitaire voorlichting en de fyto-sanitaire inspectie stoelen op het *diagnostisch* onderzoek. Daar in veel gevallen een nematodenaantasting met geen typische symptomen gepaard gaat, is het dikwijls onmogelijk een juiste diagnose te stellen. Dit is het geval met aantastingen door *vrij beweeglijke endoparasiterende wortelnematoden*, zoals *Pratylenchus* en *Radopholus*.

Bij *Heterodera* is de kans klein om een besmetting te herkennen omdat hier ook, in het algemeen, zoals bij de vrij beweeglijke endoparasieten, geen typische uitwendige wortelreacties ontstaan. Alleen wanneer de wijfjes naar buiten gebarsten zijn kan de aantasting geïdentificeerd worden, ofschoon dit bij een lage besmetting of een minder efficiënte waardplant niet steeds eenvoudig is.

Zelfs in het geval van *Meloidogyne* waar, in het algemeen, galletjes of verdikkingen op de wortels een aantasting verraden of laten vermoeden, kunnen o.a. volgende moeilijkheden zich voordoen :

- Een besmetting kan aanwezig zijn zonder opvallende, of zelfs in het geheel zonder uitwendige symptomen, doordat de galletjes heel klein zijn, en vooral bij een lage besmetting over het hoofd kunnen gezien worden, zoals bij *Meloidogyne hapla* in rozen (fig. 18 blz. 81). Nog onoglijker zijn de galletjes door *Meloidogyne deconincki* te weeggebracht, eveneens op rozen. Tenslotte kunnen zelfs helemaal geen verdikkingen optreden, zoals in het geval van een aantasting van wortels van *Monstera deliciosa* 'Borsigiana' door *Meloidogyne arenaria*, waar de wijfjes compleet binnen de normaal uitziende wortels genesteld zitten (fig. 19, blz. 83).

- Omgekeerd, kunnen verschijnselen te wijten aan andere factoren verward worden met een *Meloidogyne*-besmetting en vice versa. We vermelden alleen een paar gevallen waar

nematode-soorten symptomen opwekken, welke voor een *Meloidogyne*-aantasting kunnen aangezien worden.

- Zo kan een aantasting door de ectoparasiterende wortelnematode *Xiphinema diversicaudatum*, gezwelletjes op de wortels van rozen veroorzaken welke licht kunnen verward worden met een *Meloidogyne*-besmetting (SCHINDLER, 1957) (fig. 20, blz. 83).

- Galletjes op tomatewortels veroorzaakt door *Nacobbus serendipiticus* zijn moeilijk te onderscheiden van deze veroorzaakt door *Meloidogyne hapla*. Deze parasiet werd in Europa nog maar alleen aangetroffen in Engeland (FRANKLIN, 1959) en in Nederland (de BRUYN & STEMERDING, 1968). Het is aan te nemen dat een systematische prospectie van onze kastomatenteelt ook in ons land de aanwezigheid van deze parasiet aan het licht zou brengen.

- Anderzijds kan een frappante aantasting door *Meloidogyne* een gelijktijdige aantasting door een andere nematode maskeren. Zo is het feit dat een *Calathea makoyana*-plant gelijktijdig kan aangetast worden door *Meloidogyne arenaria* en *Radopholus similis*, de oorzaak die de ontdekking van deze laatste, eerder onverwachte parasiet, in ons land vertraagd heeft.

Om de bovenvermelde redenen moet de diagnose vrijwel steeds aangevuld worden met een onderzoek op de aanwezigheid van nematoden. Ook hier blijkt het belang van de beschreven methode. Immers, omwille van haar betrouwbaarheid kan ze zelfs, ook bij lage besmettingen, parasieten aantonen welke zich alle in een immobiel stadium bevinden. De snelheid waarmee dit gebeurt laat in vele gevallen toe nog tijdig in te grijpen. Zo kunnen jonge, slechtgroeiende haverplantjes, welke besmet bevonden werden met *Heterodera avenae*, tijdig omgeploegd en vervangen worden door een onvatbaar gewas voor deze parasiet.

Blijkt uit voorgaande beschouwingen het belang van de methode in de voorlichting, dan is dat nog meer het geval in de *fyto-sanitaire inspectie*, waar de nauwkeurigheid en de snelheid van een uitspraak een primordiale rol **speelt**.

SAMENVATTING

Een onderzoek naar de verschillen in vatbaarheid voor aantasting door *Meloidogyne hapla* tussen een dozijn verschillende roze-onderstammen vereiste een voldoende verfijnde techniek om een gradatie in aantasting kwantitatief aan te tonen. De verschillende mogelijkheden welke de literatuur biedt werden op hun bruikbaarheid getoetst en uiteindelijk werden het principe van de maceratie van het plantaardig weefsel en van de centrifugedrijftechniek gekozen en met elkaar gecombineerd. Het volledig uitwerken van het mix-proces voor verschillende nematode-soorten en hun respectieve ontwikkelingsstadia en voor diverse wortelsoorten, met daarbij het aanbrengen van een aantal belangrijke modificaties aan de centrifugedrijftechniek, geven aan de beschreven methode een eigen karakter.

In hoofdstuk I werd een bondig overzicht gegeven van het procédé, geïllustreerd met een schematische voorstelling, een afbeelding van de laboratoriumuitrusting, en foto's van suspensies van diverse nematode-soorten welke een idee geven van de mogelijkheden van deze techniek op het kwantitatieve en het kwalitatieve vlak. In de volgende hoofdstukken werd de becijferde argumentatie aangegeven welke aan het algemene recept ten grondslag ligt.

In hoofdstuk II werd voor een bepaald mixertoestel en voor een welbepaalde verhouding water-wortels in de mixerbokaal de gecombineerde invloed van de draaisnelheid en de draaiduur onderzocht.

De verschillende zwellingsstadia en de eitjes en de J_2 -stadia van *Meloidogyne* werden getoetst, alsmede de eitjes en de juveniele en adulte stadia van *Pratylenchus*. Beide geslachten vertegenwoordigen respectievelijk de sedentaire wortelnematoden en de vrij beweeglijke endoparasiterende nematoden.

Daarenboven werd rekening gehouden met de hardheid van het wortelweefsel.

De conclusies luiden dat de optimale combinatie van draaisnelheid en draaiduur afhangt van de afmetingen en de vorm der ontwikkelingsstadia, van de wijze waarop ze in het wortelweefsel gelokaliseerd zijn, en in bepaalde gevallen van de hardheid van het wortelweefsel.

Uiteindelijk werden, om praktische redenen, 2 combinaties van draaisnelheid en draaiduur voorgesteld, één voor de gezwollen stadia en één voor de eitjes en de beweeglijke stadia, bij welke de optimale extractie bereikt wordt of dicht benaderd.

In hoofdstuk III dat handelt over het scheiden van de nematoden uit het mixtum, werden de verschillende aspecten van de getrapte centrifugatie besproken, zoals de grondgedachte waarop de scheiding berust, de voorafgaandelijke reductie van het mengsel en de factoren welke het rendement van de centrifuge beïnvloeden zoals : de relatieve centrifugaalkracht, de draaiduur, de scheidingsvloeistof in de tweede centrifugatiebeurt en het toegevoegde kaolien-poeder.

Tevens werd het rendement van de centrifuge voor de verschillende ontwikkelingsstadia van *Meloidogyne* en *Pratylenchus* bepaald en geïnterpreteerd.

Tenslotte werd de argumentatie aangegeven die geleid heeft tot het gebruik en de speciale opstelling van het 5 μ -zeefje voor de uiteindelijke afscheiding van de nematoden in zuiver water.

In hoofdstuk IV werden de voordelen en enkele van de toepassingsmogelijkheden van de methode vermeld.

De voordelen kunnen samengevat worden in de volgende woorden : eenvoud, snelheid en betrouwbaarheid.

Ze is *eenvoudig* en kan uitgevoerd worden met elementen welke normaal tot de basisuitrusting van een nematologisch laboratorium behoren, aangevuld met apparatuur die zelf te vervaardigen is uit materialen welke gestandaardiseerd in de handel

verkrijgbaar zijn. De wijze waarop dit gebeuren kan, werd trouwens in hoofdstuk III bondig beschreven.

Ze is *snel*, de gemiddelde tijd voor een wortelonderzoek op de aanwezigheid van gezwollen stadia of van eitjes en beweeglijke stadia bedraagt, in een routineanalyse van 8 monsters, hoogstens 10 minuten, vanaf het mixen tot het brengen van de nematoden in zuiver water.

Ze is *betrouwbaar* om redenen welke in het ganse werk uiteengezet werden. De proef op de som werd geleverd door een vergelijking met een drietal courant gebruikte extractie-technieken waaruit het veel hogere rendement en de betere reproduceerbaarheid bleek.

De toepassingsmogelijkheden van de methode in de volgende domeinen van het nematologisch onderzoek werden geschetst : systematiek, cytogenetica en biochemie; studie van de inwerking van ecologische factoren op de ontwikkelingscyclus van nematoden en resistentie-onderzoek. Beide laatste onderwerpen werden geïllustreerd met voorbeelden uit eigen lopend onderzoek.

Tenslotte is de methode ook in de fyto-sanitaire voorlichting en inspectie een nuttig instrument doordat het de diagnose op een snelle en een zekere wijze ondersteunt, zoals blijkt uit enkele geciteerde gevallen.

BIJLAGEN

In deze bijlagen worden de tabellen van de variantie-analyses gegeven waarvan de conclusies en de interpretatie in de tekst voorkomen. Waar de oorspronkelijke cijfers een voorafgaandelijke transformatie ondergingen, is dit in deze tabellen vermeld.

1. Variantie-analyse van de aantallen gezwollen juveniele stadia ($J_3 + J_4$) van *Meloidogyne naasi*, voor tarwewortels, bekomen bij verschillende combinaties van draaisnelheid en draaiduur van de mixer

Oorzaak van variatie	Vrijheidsgraden	Gemiddeld kwadraat	Berekende F-waarde
Duur	5	4 950 687	235,11 ^x
Snelheid	1	3 720 937	176,71 ^x
Duur x snelheid	5	156 687	7,44 ^x
Residuele fout	84	21 056	

2. *Variantie-analyse van de aantallen wijfjes van Meloidogyne naasi, voor tarwewortels, bekomen bij verschillende combinaties van draaisnelheid en draaiduur van de mixer*

Oorzaak van variatie	Vrijheidsgraden	Gemiddeld kwadraat	Berekende F-waarde
Duur	5	1 099 791	175,67 ^x
Snelheid	1	303 187	48,42 ^x
Duur x snelheid	5	112 012	17,89 ^x
Residuele fout	84	6 260	

3. *Variantie-analyse van de aantallen wijfjes van Meloidogyne hapla, voor rozewortels, bekomen bij verschillende combinaties van draaisnelheid en draaiduur van de mixer*

Oorzaak van variatie	Vrijheidsgraden	Gemiddeld kwadraat	Berekende F-waarde
Duur	5	61 834	438,53 ^x
Snelheid	1	11 550	81,91 ^x
Duur x snelheid	5	3 983	28,24 ^x
Residuele fout	84	141	

4. Variantie-analyse van de aantallen eitjes en J_2 -stadia van *Meloidogyne naasi*, voor tarwewortels, bekomen bij verschillende combinaties van draaisnelheid en draaiduur van de mixer

- na deling van de oorspronkelijke cijfers door 1 000

Eitjes

Oorzaak van variatie	Vrijheidsgraden	Gemiddeld kwadraat	Berekende F-waarde
Duur	7	11 636	211,56 ^x
Snelheid	1	210	3,81
Duur x snelheid	7	64	1,18
Residuele fout	112	55	

J_2 -stadia

Oorzaak van variatie	Vrijheidsgraden	Gemiddeld kwadraat	Berekende F-waarde
Duur	7	324	9,80 ^x
Snelheid	1	40	1,22 ^x
Duur x snelheid	7	22	<1
Residuele fout	112	33	

Eitjes + J_2 -stadia

Oorzaak van variatie	Vrijheidsgraden	Gemiddeld kwadraat	Berekende F-waarde
Duur	7	14 228	154,65 ^x
Snelheid	1	66	<1
Duur x snelheid	7	104	1,13
Residuele fout	112	92	

5. Variantie-analyse van de aantallen eitjes en J_2 -stadia van *Meloidogyne hapla*, voor rozewortels, bekomen bij verschillende combinaties van draaisnelheid en draaiduur van de mixer

Oorzaak van variatie	Vrijheidsgraden	Gemiddeld kwadraat	Berekende F-waarde
Duur	7	219 088 170	79,76 ^x
Snelheid	1	6 570 313	2,39
Duur x snelheid	7	4 623 884	1,68
Residuele fout	112	2 746 652	

6. Variantie-analyse van de aantallen eitjes en beweeglijke stadia van *Pratylenchus penetrans*, voor Acer-wortels, bekomen bij verschillende combinaties van draaisnelheid en draaiduur van de mixer

- Na deling van de oorspronkelijke cijfers door 100

Eitjes

Oorzaak van variatie	Vrijheidsgraden	Gemiddeld kwadraat	Berekende F-waarde
Duur	7	555	9,91 ^x
Snelheid	1	1 929	34,44 ^x
Duur x snelheid	7	40	<1
Residuele fout	112	56	

Beweeglijke stadia

Oorzaak van variatie	Vrijheidsgraden	Gemiddeld kwadraat	Berekende F-waarde
Duur	7	1 545	22,39 ^x
Snelheid	1	1 464	21,21 ^x
Duur x snelheid	7	265	3,84 ^x
Residuele fout	112	69	

7. Variantie-analyse van de aantallen eitjes en J_2 -stadia van *Meloidogyne*, bekomen door centrifugatie met respectievelijk een suiker- en een NaCl-oplossing als scheidingsvloeistof, bij 3 verschillende dichtheden

Eitjes

Oorzaak van variatie	Vrijheidsgraden	Gemiddeld kwadraat	Berekende F-waarde
Soort vloeistof	1	220 417	< 1
Dichtheid vloeistof	2	41 676 354	$19,22^x$
Soort x dichtheid	2	441 354	< 1
Residuele fout	18	2 168 542	

J_2 -stadia

Oorzaak van variatie	Vrijheidsgraden	Gemiddeld kwadraat	Berekende F-waarde
Soort vloeistof	1	100 104	< 1
Dichtheid vloeistof	2	1 679 063	$7,43^x$
Soort x dichtheid	2	114 479	< 1
Residuele fout	18	226 076	

8. Variantie-analyse van de aantallen eitjes en beweeglijke stadia van *Pratylenchus*, bekomen door centrifugatie met respectievelijk een suiker-, een NaCl- en een ZnSo₄- oplossing als scheidingsvloeistof, bij 3 verschillende dichtheden

Eitjes

Oorzaak van variatie	Vrijheidsgraden	Gemiddeld kwadraat	Berekende F-waarde
Soort vloeistof	2	208 831 667	60,01 ^x
Dichtheid vloeistof	2	15 927 917	4,58 ^x
Soort x dichtheid	4	7 590 833	2,18
Residuele fout	63	3 479 960	

Beweeglijke stadia

Oorzaak van variatie	Vrijheidsgraden	Gemiddeld kwadraat	Berekende F-waarde
Soort vloeistof	2	464 065 972	135,31 ^x
Dichtheid vloeistof	2	32 506 806	9,48 ^x
Soort x dichtheid	4	7 034 722	2,05
Residuele fout	63	3 429 524	

9. Variantie-analyse van de rendementen van de centrifuge van combinaties van 4 verschillende ontwikkelingsstadia van *Meloidogyne* en 2 uiteenlopende worteltypes

- Na $\text{bg sin} \sqrt{\text{procent}}$ - transformatie van de oorspronkelijke cijfers

Oorzaak van variatie	Vrijheidsgraden	Gemiddeld kwadraat	Berekende F-waarde
Stadium	3	744,70	79,73 ^x
Worteltype	1	1,74	<1
Stadium x worteltype	3	3,97	<1
Residuele fout	56	9,34	

10. Variantie-analyse van de rendementen van het 5 μ -zeefje bij 3 verschillende wijzen van opstellen

- Na $\text{bg sin} \sqrt{\text{procent}}$ - transformatie van de oorspronkelijke cijfers

Oorzaak van variatie	Vrijheidsgraden	Gemiddeld kwadraat	Berekende F-waarde
Objecten	2	2 154,61	55,55 ^x
Residuele fout	21	38,78	

LITERATUUR

- ANDRASSY, I. (1956). The determination of volume and weight of nematodes. *Acta Zool. (Hungarian Academy of Science)* 2(1-3) : 1-15. Vertaling uit het Duits gepubliceerd in : *Englisch Translation of Selected East European Papers in Nematology* (ZUCKERMAN, B.M., BRZESKI, M.W. & DEUBERT, K.H.) University of Massachusetts, Cranberry Experiment Station, East Wareham, Massachusetts 1967, 73-84.
- BAERMANN, G. (1917). Eine einfache Methode zur Auffindung von *Anchylostomum* -(Nematoden)- Larven in Erdproben. *Geneesk. Tijdschrift. Ned.-Ind.* 57, 131-137.
- BOOM, B.K. (1968a). *Flora van Kamer- en Kasplanten*. H. VEENMAN & Zonen N.V.-Wageningen.
- BOOM, B.K. (1968b). *Nederlandse Dendrologie*. H. VEENMAN & Zonen N.V.-Wageningen.
- CAIRNS, F.J. (1960). Methods in Nematology : A Review. Gepubliceerd in : *Nematology* (SASSER, J.N. & JENKINS, W.R.). The University of North Carolina Press, Chapel Hill, 33-84.
- CAVENESE, F.E. & JENSEN, H.J. (1955). Modification of the centrifugal-flotation technique for isolation and concentration of nematodes and their eggs from soil and plant tissue. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 22, 87-89.
- CHAPMAN, R.A. (1957). The effects of aeration and temperature on the emergence of species of *Pratylenchus* from roots. *Plant Disease Reporter* 41, 836-841.
- COOLEN, W., GOORIS, J. & D'HERDE, J. (1969). Een methode voor de kwantitatieve extractie van eitjes en larven, en van *Meloidogyne* wijfjes uit plantewortels. Mededeling gehouden op het XXI Symposium over Fytofarmacie en Fytiatrie te Gent (niet gepubliceerd).
- DALLINGA, H. & SONNEMA, M. (1962). *Arbeidsleer in de landbouw*. Nederlandse Land- en Tuinbouwbibliotheek. J.B. Wolters.-Groningen.

- DE BOER, H. et al. (1968). *Schriftelijk rapporteren*. Aula Boeken-Utrecht-Antwerpen.
- de BRUYN, N. & STEMERDING, S. (1968). *Nacobbus serendipiticus*, a plant parasitic nematode new to the Netherlands. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 74, 227-228.
- DE GRISSE, A.T. (1969 a). Vergelijking van de resultaten bekomen met de opspoelwattenfiltermethode (OWFM) en met de Suiker-centrifugedrijfmethode (SCDM) voor de extractie van plantenparasitaire nematoden uit de bodem. *Mededelingen van de Rijksfaculteit Landbouwwetenschappen te Gent* 34, 57-69.
- DE GRISSE, A.T. (1969 b). Redescription ou modifications de quelques techniques utilisées dans l'étude de nématodes phytoparasitaires. *Mededelingen van de Rijksfaculteit Landbouwwetenschappen te Gent* 34, 351-369.
- DROPKIN, V.H., WILSON, L., SMITH, Jr. & MYERS, R.F. (1960). Recovery of Nematodes from Infected Roots by Maceration. *Nematologica* 5, 285-288.
- DUNCAN, D.B. (1955). Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* 11, 1-42.
- DUNN, R.A. (1969). Extraction of cysts of *Heterodera* species from soils by centrifugation in high density solutions. *Journal of Nematology* 1, 7.
- FAUST, E.C. et al. (1938). A critical study of clinical laboratory techniques for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. *Amer. J. Trop. Med.* 18, 169.
- FENWICK, D.W. (1940). Methods for the recovery and counting of cysts of *Heterodera schachtii* from the soil. *Journal of Helminthology* 18, 155-172.
- FENWICK, D.W. (1963). Recovery of *Rhadinaphelenchus cocophilus* (COBB, 1919) GOODEY, 1960 from Coconut Tissues. *Journal of Helminthology* 37, 11-14.

- FISHER, R.A. (1925). *Statistical Methods for Research Workers*. OLIVER & BOYD Ltd-Edinburgh & London.
- FLEGG, J.J.M. & McNAMARA, D.G. (1968). A direct sugar-centrifugation method for the recovery of eggs of *Xiphinema*, *Longidorus* and *Trichodorus* from soil. *Nematologica* 14, 156.
- FRANKLIN, M.T. (1959). *Nacobbus serendipiticus* n.sp., a root galling nematode from tomatoes in England. *Nematologica* 4, 286-293.
- GILLARD, A. (1961). Onderzoekingen omtrent de biologie, de verspreiding en de bestrijding van wortelknobbelaaltjes (*Meloidogyne* spp.). *Mededelingen van de landbouwhogeschool en de opzoekingsstations van de staat te Gent* 26, 515-646.
- GRASSE, P.P. et al. (1965). *Traité de Zoologie, tome IV, fascicule 2*. Masson et cie, Paris.
- KUSHMAN, L.J. & MACHMER, J.H. (1947). The relative susceptibility of 41 sweet-potatoe varieties, introductions, and seedlings to the root-knot nematode, *Heterodera marioni* (Cornu) Goodey. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 14, 20-23.
- LANCASTER, M.B. (1970). The Recovery of Infective Larvae from Herbage Samples. *Journal of Helminthology* 44, 219-230.
- MILES, H.W. & TURNER, W.H. (1928). On the Control of the Root Knot Eelworm, *Heterodera radicum* MUELLER. *Journal of Helminthology*, 6, 59-76.
- MINDERMAN, G. (1956). New techniques for counting and isolating free living nematodes from small soil samples and from oak forest litter. *Nematologica* 1, 216-226.
- MOUNTAIN, W.B. & PATRICK, Z.A. (1959). The peach replant problem in Ontario. 7. The pathogenicity of *Pratylenchus penetrans* (COBB, 1917). FILIP. & STEK. 1941. *Can. J. Botany* 37, 459-470.

- OOSTENBRINK, M. (1960). Estimating Nematode Populations by some selected Methods. Gepubliceerd in : *Nematology* (SASSER, J.N. & JENKINS, W.R.). The University of North Carolina Press. Chapel Hill, 85-102.
- SASSER, J.N. (1954). Identification and host-parasite relationship of certain root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Bulletin A-77 (Technical) College Park, MD.*, January 1954, University of Maryland, Agric. Exp. Station, 1-13.
- SCHINDLER, A.F. (1957). Parasitism and pathogenicity of *Xiphinema diversicaudatum*, an ectoparasitic nematode. *Nematologica* 2, 25-31.
- SEINHORST, J.W. (1950). De betekenis van de toestand van de grond voor het optreden van een aantasting door het stengelaaltje *Ditylenchus dipsaci* (KUEHN) FILIPJEV. *Tijdschrift over Plantenziekten* 56, 291-349.
- SMITH, A.L. & TAYLOR, A.L. (1947). Field methods of Testing for Root-Knot Infestation. *Phytopathology* 37, 85-93.
- STEMERDING, S. (1964). Een mixer-wattenfilter methode om vrijbeweeglijke endoparasitaire nematoden uit wortels te verzamelen. *Verslagen en mededelingen van de Plantenziektenkundige Dienst (Jaarboek 1963)*, 170-175.
- TARJAN, A.C. (1960). *Check List of Plant and Soil Nematodes*. University of Florida Press, Gainesville.
- TAYLOR, A.L. & LOEGERING, W.Q. (1953). Nematodes associated with root lesions in Acaba. *Turrialba* 3, 8-13.
- WEBER, D.E. & WILLIAMS, A.S. (1968). Evaluation of the centrifugal-flotation technique for the quantitative recovery of three types of ectoparasitic nematodes. *Nematologica* 14, 18.
- YOUNG, T.W. (1954). An incubation method for collecting migratory endo-parasitic nematodes. *Plant Disease Reporter* 38, 794-795.

COLOFON

De volgende personen verzorgden :

- | | |
|--------------------------|--|
| <i>de typografie</i> | : D. KEERSTOCK |
| <i>de fotografie</i> | : M. GILLIS |
| <i>het grafisch werk</i> | : A. DEREË (Stedelijke Technische School, Gent)
A. VOET |
| <i>het clicheren</i> | : R. VAN IMMERSEEL (Rijkscentrum voor Land-
bouwkundig Onderzoek) |
| <i>het kaftontwerp</i> | : F. DE KEULENAER (Rijksstation voor Sier-
plantenteelt) |