

Optimaliseren bemonsteren en extraheren van wortelaaltjes in substraatteelten roos

J.J. Amsing, N. García en M.A. de Jongh

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.
Glastuinbouw
september 2004

© 2004 Wageningen, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden veeelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Praktijkonderzoek Plant & Omgeving.

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V. is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

Projectnummer: 41103602

Project gefinancierd door:

Productschap  Tuinbouw

Productschap Tuinbouw
Postbus 280
2700 AG Zoetermeer

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.
Business Unit Glastuinbouw
Adres : Linnaeuslaan 2a, 1431 JV Aalsmeer
Tel. : 0297-352525
Fax : 0297-352270
E-mail : infoglastuinbouw.ppo@wur.nl
Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

	pagina
SAMENVATTING.....	5
SUMMARY.....	6
1 INLEIDING	7
1.1 Probleemstelling.....	7
1.2 Doelstelling	8
2 BEMONSTEREN.....	9
2.1 Inleiding	9
2.2 Materialen en methoden	9
2.2.1 Bedrijf A: kokos	9
2.2.2 Bedrijf B: perliet.....	10
2.2.3 Bedrijf C: steenwolmatten.....	11
2.3 Resultaten en discussie	12
2.3.1 Bedrijf A.....	12
2.3.1.1 Kokosmonsters	12
2.3.1.2 Wortelmonsters	13
2.3.1.3 Drainwatermonsters.....	14
2.3.1.4 Relatie wortel- en drainwatermonsters	15
2.3.2 Bedrijf B.....	15
2.3.2.1 Wortelmonsters	15
2.3.2.2 Drainwatermonsters.....	16
2.3.2.3 Relatie wortel- en drainwatermonsters	16
2.3.3 Bedrijf C.....	16
2.3.3.1 Wortelmonsters	16
2.3.3.2 Drainwatermonsters.....	16
2.3.3.3 Relatie wortel- en drainwatermonsters	16
2.4 Algehele discussie en conclusies	17
2.5 Bemonstering: theoretische benadering.....	20
2.6 Bemonsteringsadviezen	21
3 EXTRAHEREN	23
3.1 Inleiding	23
3.2 Materialen en methoden	23
3.2.1 Vergelijking extractiemethoden (PD)	23
3.2.2 Verversen water	24
3.2.3 Mixertijd.....	24
3.2.4 Mixertoerental	25
3.3 Resultaten en discussie	25
3.3.1 Wortelknobbelaaltjes	25
3.3.1.1 Vergelijking extractiemethoden (PD)	25
3.3.1.2 Verversen water.....	28
3.3.1.3 Mixertijd	28
3.3.1.4 Toerental	30
3.3.2 Wortellesieaaltjes.....	31
3.3.2.1 Vergelijking extractiemethoden (PD)	31
3.3.2.2 Verversen water.....	32

3.3.2.3	Mixertijden	33
3.3.2.4	Toerental	34
3.4	Algehele discussie en conclusies	35
3.5	Extractie-adviezen.....	36
LITERATUUR.....		39
BIJLAGE 1	EXTRACTIEPROTOCOL KOKOS.....	41
BIJLAGE 2	EXTRACTIEPROTOCOLLEN WORTELS.....	43

Samenvatting

Inleiding

Teelten van kasrozen op substraat worden in de praktijk regelmatig bemonsterd op aaltjes. Het is echter onvoldoende bekend hoe er moet worden bemonsterd en welke waarde er aan de uitslag mag worden toegekend. Het eerste deel van het project moest antwoorden geven op deze vragen, en de onderzoekslaboratoria en telers van adviezen voorzien met betrekking tot het bemonsteren van rozen die zijn aangetast door het noordelijk wortelknobbelaaltje *Meloidogyne hapla*. Daarvoor zijn op drie praktijkbedrijven met rozen in kokos (8000 m²), perliet (4710 m²) en steenwolmatten (4800 m²) een groot aantal wortel- en drainwatermonsters genomen, terwijl op het bedrijf met kokos ook dit substraat is bemonsterd.

In het tweede deel van het project is onderzoek gedaan naar verschillen in efficiëntie van vier methoden om endoparasitaire wortelaaltjes *M. hapla* en *Pratylenchus penetrans* uit wortels te extraheren. Voor beide soorten aaltjes worden meestal dezelfde extractiemethoden gebruikt. Niet alle onderzoekslaboratoria gebruiken dezelfde methoden waardoor de resultaten moeilijk vergelijkbaar zijn. Dit deel van het project moest voor beide soorten aaltjes aangeven hoe efficiënt de volgende vier extractiemethoden zijn: knippen/wattenfilter, mixer/wattenfilter, mistkamer en centrifuge. Bij de wattenfiltermethoden is nagegaan wat de invloed is van het verversen van het water in de extractieschalen, terwijl bij de mixer/wattenfiltermethode het effect van de mixertijd en het toerental is bepaald om tot een zo efficiënt mogelijke extractie te komen.

Conclusies

• bemonsteren

- Grote variatie in aantal wortelknobbelaaltjes tussen de monsters. Variatie neemt af bij grotere monsters.
- Eén monster kan voldoende zijn om een aantasting door aaltjes op te sporen, maar geeft geen bruikbare informatie over de aantastingssituatie in de kas.
- Monsters genomen van dezelfde planten (kokos en wortels) kunnen sterk variëren in aantal aaltjes.
- Geen eenduidige relatie tussen drainwater- en wortelmonsters.

• extraheren

- Volgorde van extractie-efficiëntie uit wortels: centrifuge > mixen/wattenfilter > knippen/wattenfilter = mistkamer (*M. hapla* en *P. penetrans*).
- Het dagelijks (*M. hapla*) en elke drie dagen (*P. penetrans*) verversen van water in de extractieschalen verhoogt de extractie-efficiëntie.
- De mixertijd is bij *M. hapla* niet van invloed op de extractie-efficiëntie, wel bij *P. penetrans*.
- Extractie-efficiëntie toerental: 16.000 t/minuut > 10.700 t/minuut (*M. hapla* en *P. penetrans*).
- Extractietijden tot vijf weken: lineaire (*M. hapla*) en logaritmische (*P. penetrans*) toename van de cumulatieve aantallen aaltjes.

Adviezen

• bemonsteren

Om vast te stellen of de rozen door aaltjes zijn aangetast, wordt geadviseerd om twee monsters te nemen: een wortelmonster van 30 planten en een drainwatermonster van 100 liter (4x 45 µm-zeven). Wordt er maar één monster genomen, dan is het raadzaam de dubbele hoeveelheid planten of drainwater te bemonsteren. Levert de eerste bemonstering geen aaltjes op, dan na enkele maanden nogmaals bemonsteren.

• extraheren

Voor het vaststellen van de totale besmetting met aaltjes in wortels heeft de centrifugemethode de voorkeur omdat daarmee de uitslag snel bekend is, terwijl de knippen- en mixer/wattenfiltermethode en mistkamer extractietijden vereisen van twee (*P. penetrans*) tot vier (*M. hapla*) weken. Bij beide wattenfiltermethoden moet bovendien het water in de extractieschalen dagelijks (*M. hapla*) of om de drie dagen (*P. penetrans*) worden verversen. Voor het bepalen van verschillen tussen behandelingen zijn extractietijden van hooguit drie dagen voldoende. Dan is het verversen van het water in de extractieschalen niet persé noodzakelijk. Voor het extraheren van *M. hapla* en *P. penetrans* wordt geadviseerd de wortels gedurende maximaal vijf seconden te mixen bij een toerental van 16.000 t/minuut.

Summary

Introduction

Cultures of roses grown on soilless media in glasshouses are regularly sampled for nematodes. However, it is not fully understood how to sample a culture of roses and how to interpret the sampling results. These questions have been answered in the first part of this project. Three companies with commercial grown roses in cocopeat (8000 m²), perlite (4710 m²) and rockwool slabs (4800 m²), infested with the northern root-knot nematode *Meloidogyne hapla*, were sampled by taking root and drainage-water samples. Cocopeat was also sampled.

In the second part of this project the extraction-efficiency of four methods to collect the endoparasitic nematodes *M. hapla* and *Pratylenchus penetrans* (root-lesion nematode) from roots of roses was determined. These four methods were: cutting/cottonwoolfilter, blender/cottonwoolfilter, mistifier and centrifuge. The extraction-efficiency of both cottonwoolfiltermethods was determined in relation to the replacement of water in the extraction-dishes. The effect of the blendertime and -speed on the extraction-efficiency of the blender/cottonwoolfiltermethod was also determined.

Conclusions

- *sampling*
 - The number of nematodes may vary greatly among samples. Less variability when the sample size increases.
 - One sample may be sufficient to detect a nematode-infestation, but does not give useful information about the level of infestation.
 - The numbers of nematodes in samples taken from the same plants (roots or cocopeat) may differ widely.
 - No relation has been found between the number of nematodes in drainage-water and roots.
- *extraction*
 - Efficiency ranking of extracting nematodes from roots: centrifuge > blender/cottonwoolfilter > cutting/cottonwoolfilter = mistifier (*M. hapla* and *P. penetrans*).
 - Daily (*M. hapla*) and every three days (*P. penetrans*) replacement of water in the extraction-dish increases the extraction-efficiency of the cottonwoolfilter-methods.
 - The blendertime does influence the extraction-efficiency of *P. penetrans*, but not of *M. hapla*.
 - The extraction-efficiency of the blenderspeed: 16.000 r.p.m. > 10.700 r.p.m. (*M. hapla* and *P. penetrans*).
 - Extraction-time up to five weeks gives a linear (*M. hapla*) or logarithmic (*P. penetrans*) increase of the cumulative numbers of nematodes.

Instructions

- *sampling*

In order to detect a nematode-infestation two samples are advised to be taken: one root-sample from 30 plants and one sample of 100 liter of drainage-water (4x 45 µm-sieves). When taking only one sample it is advisable to double the sample size: 60 plants or 200 liter of drainage-water. If the first sample or samples do not contain plantparasitic nematodes then repeat the sampling some months later.
- *extraction*

For the determination of the total nematode-infestation in roots centrifugation is preferred, because then the results become available soon, whereas both cottonwoolfilter-methods and the mistifier need extraction-times of two (*P. penetrans*) to four (*M. hapla*) weeks. Moreover, the water in the extraction-dishes need to be changed daily (*M. hapla*) or every three days (*P. penetrans*). To determine differences between treatments the cottonwoolfilter-methods are good to be used, too. Extraction-times up to three days will be sufficient. Replacement of the water in the extraction-dishes is not necessary then. For both nematodes a blender-speed of 16.000 r.p.m. in combination with a blender-time of five seconds is recommended.

1 Inleiding

Het door Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V. , Business unit Glastuinbouw uitgevoerde onderzoek naar het optimaliseren van het bemonsteren en extraheren van aaltjes uit wortels, substraat en drainwater bij roos op substraat is tot stand gekomen in samenwerking met de LTO commissie Roos en gefinancierd door Productschap Tuinbouw.

1.1 Probleemstelling

Op een groot aantal bedrijven met rozen op substraat zijn wortelaaltjes aanwezig. Het gaat voornamelijk om het noordelijk wortelknobbelaaltje *Meloidogyne hapla*, maar soms worden ook wortellesieaaltjes *Pratylenchus penetrans* en *P. vulnus* aangetroffen. Het tijdig onderkennen van de aanwezigheid van wortelaaltjes is van groot belang. Door het nemen van bestrijdings- en hygiënische maatregelen kan dan erger worden voorkomen.

Bemonsteringen moeten de aan-/afwezigheid van wortelaaltjes aantonen en indien aanwezig de mate van de aantasting aangeven. Voor het bemonsteren van een kas met rozen op substraat zijn er twee mogelijkheden: wortels en drainwater. In geval van kokos is er nog een derde mogelijkheid, namelijk het bemonsteren van de kokos zelf. Er zijn aanwijzingen dat het bemonsteren van drainwater dat in een kas via een drainbuis naar een drainput wordt afgevoerd de meest ideale bemonsteringsmethode is. Op de eerste plaats omdat in een drainput de overtollige voedingsoplossing van alle planten in een kas terecht komt. Hiermee zou het drainwater een beeld moeten geven van de aantastings situatie in de hele kas. In tegenstelling hiermee worden er bij het nemen van wortel- en substraatmonsters slechts van zeer weinig planten wortels en substraat verzameld. Normaal gesproken worden er daarvoor in een kas van bijvoorbeeld 5000 m² 40 tot 60 planten bemonsterd van de in totaal ca. 40.000 aanwezige planten. Met een dergelijk wortel- en substraatmonster lijkt het onmogelijk een goed beeld van de aantasting in een kas te verkrijgen. Of het dubbele aantal planten een beter beeld geeft is de vraag, maar wel is zeker dat de kosten van het bemonsteren dan toenemen. Op de tweede plaats is het bemonsteren van drainwater gemakkelijker dan het bemonsteren van wortels omdat daarvoor geen rondgang door de hele kas hoeft te worden gemaakt en het verzamelen van drainwater een veel prettigere werkzaamheid is dan het verzamelen van wortels en substraat. Dit bespaart veel tijd waardoor de kosten van het bemonsteren omlaag kunnen. Maar voordat kan worden besloten dat het bemonsteren van wortels en substraat te vervangen is door het bemonsteren van drainwater, moet bekend zijn op welke wijze de wortels, het substraat (o.a. aantal planten) en het drainwater (o.a. hoeveel liter en maaswijdte zeven) moeten worden bemonsterd. Daarvoor moet ook bekend zijn hoe variabel de uitslagen van de bemonsteringen zijn en hoe dit kan worden verkleind.

Behalve onderzoek aan het bemonsteren zelf is het ook nodig de efficiëntie van de verschillende extractiemethoden voor wortelknobbel- en wortellesieaaltjes aan een nader onderzoek te onderwerpen. Voor het extraheren van wortelaaltjes zijn vier methoden beschikbaar, namelijk mixer/wattenfilter, knippen/wattenfilter, mistkamer en centrifuge. De onderzoekslaboratoria gebruiken met name een van beide eerste methoden, waarbij dan voor beide soorten aaltjes dezelfde methode wordt toegepast. Of dit correct is, is een punt van onderzoek. Daarbij komt dat niet elk onderzoekslaboratorium dezelfde extractiemethode gebruikt waardoor de resultaten niet goed vergelijkbaar zijn. Dit onderzoek moet aangeven welke extractiemethode het meest geschikt is voor het extraheren van wortelknobbel- en wortellesieaaltjes uit rozenwortels en onder welke voorwaarden dat dient te gebeuren. De meeste aandacht daarbij is uitgegaan naar beide wattenfiltermethoden, omdat deze thans het meest worden gebruikt.

1.2 Doelstelling

Het onderzoek moet voor de onderzoekslaboratoria aangeven hoe een kas met rozen op substraat moet worden bemonsterd en hoe de aaltjes uit de wortels moeten worden geëxtraheerd. Voor de telers moet het onderzoek laten zien wat de waarde is van de uitslag van beide soorten bemonsteringsmethoden en welke relatie er gelegd kan worden tussen wortel- en drainwaterbemonsteringen.

2 Bemonsteren

2.1 Inleiding

Om inzicht te krijgen in de wijze waarop een kas met rozen op substraat bij voorkeur moet worden bemonsterd, zijn op drie praktijkbedrijven bemonsteringen uitgevoerd. Het betrof aanplantingen op respectievelijk kokos, perliet en steenwolmatten. In geval van kokos ging het om een aanplant van december 1996, bij perliet dateerde de aanplant van januari 2002 en bij steenwolmatten van maart 2002. Op alle drie bedrijven was het gewas aangetast door het noordelijk wortelknobbelaaltje *Meloidogyne hapla*.

2.2 Materialen en methoden

2.2.1 Bedrijf A: kokos

De bemonsteringen op Bedrijf A zijn uitgevoerd in een rozengekas met onderstaande specificaties.

- Kas	: ± 8000 m ²
- Aantal bedden	: 60
- Aantal rijen/bed	: 4
- Aantal planten/m ²	: 5
- Aantal drainputten	: 1
- Cultivar	: Escimo, stentling op Natal Briar
- Plantdatum	: december 1996
- Teeltwijze	: containers (2 planten/container)
- Substraat	: kokos
- Ontsmetter	: langzaam zandfilter (drainwater)

In bovenstaand rozengekas zijn in april 2003 de volgende bemonsteringen uitgevoerd.

- Kokos	: 16 monsters à 60 containers
- Wortels	: 8 monsters à 30 planten
- Drainwater	: 12 monsters à 30 liter (over 4x 45 µm zeven met roestvrij staal zeefgaas)

• Kokosmonsters

Totaal zijn zestien kokosmonsters genomen waarbij de kokos afkomstig was uit zestig containers, verspreid door de hele kas. Bij de eerste twaalf monsters (1-12) is er voor gezorgd dat geen enkele container twee keer is bemonsterd. Uit elk van de zestig containers is één kokosprik genomen. Daarvoor is een grondboor gebruikt met een lengte van 22,5 cm en een diameter van 18 mm. Per monster leverde dit ongeveer 800 ml kokos op. Nadat uit elk van deze monsters een 100 ml-submonster was genomen, zijn de oorspronkelijke monsters paarsgewijs samengevoegd. Dit betekent dat de kokos nu niet afkomstig was uit 60 containers (60 container-monsters), maar uit 120 containers (120 container-monsters). De aldus verkregen zes paarsgewijs samengestelde monsters zijn vervolgens nogmaals per twee samengevoegd. Uiteindelijk bleven er dus drie kokosmonsters over met in elk monster kokos afkomstig uit 240 containers (240 container-monsters). Ook uit elk samengesteld monster is na menging een 100 ml-submonster genomen. Door het paarsgewijs samenvoegen kon worden nagegaan in hoeverre het aantal te bemonsteren containers van invloed is op het resultaat.

De laatste vier kokosmonsters (13-16) zijn uit dezelfde containers genomen als de monsters 9-12. Daarvoor is uit elke container een tweede kokosprik genomen. De kokos van de monsters 9 en 13 kwam dus uit

dezelfde containers. Dat geldt evenzo voor de monsters 10 en 14, 11 en 15, en 12 en 16. Dit had tot doel na te gaan of de plaats waar de kokosprik uit de container wordt genomen van invloed is op de uitslag. Zodoende wordt antwoord verkregen op de vraag hoe variabel het bemonsteren van dezelfde containers is. Het derde aspect dat is onderzocht, betreft het feit of er verschillen zijn tussen de 100 ml-submonsters, die genomen zijn uit een partij kokos. Daarmee kan worden vastgesteld hoe variabel een submonster is. Daarvoor zijn de monsters 1-4 gebruikt. Uit elk van deze monsters zijn twee 100 ml-submonsters genomen. Alle 100 ml-submonsters zijn verwerkt met behulp van de vereenvoudigde melkflessen-wattenfiltermethode (Bijlage 1) en na een extractietijd van drie dagen onderzocht op de aanwezigheid van wortelknobbelaaltjes.

- *Wortelmonsters*

Er zijn twee series van vier wortelmonsters (1-4 en 5-8) genomen. Voor de eerste serie monsters 1-4 zijn wortels verzameld van dertig verschillende planten verspreid over de hele kas. Bij elk van deze vier monsters ging het om dertig andere planten. De tweede serie monsters 5-8 is samengesteld uit wortels genomen van dezelfde planten als bij de eerste serie. Dat wil zeggen dat bij de monsters 1 en 5, 2 en 6, 3 en 7, en 4 en 8 van dezelfde dertig planten wortels zijn genomen. Zodoende kon worden nagegaan in hoeverre het uitmaakt welke wortels er van de planten worden verwijderd ofwel hoe variabel het bemonsteren van dezelfde planten is. Voor het verzamelen van wortels is de hele potkluit uit de container gehaald en zijn wortels over de hele hoogte van de kluit genomen. Voor beide serie monsters zijn de wortelkluiten op twee tegenover elkaar liggende plaatsen bemonsterd. Zijn de wortels voor de eerste serie aan de voorkant van de potkluit genomen, dan zijn ze voor de tweede serie aan de achterzijde genomen of andersom. Uit elk wortelmonster is een 15 g submonster genomen. Deze zijn verwerkt met behulp van de mixer/wattenfiltermethode (10.700 toeren/min.; mixertijd: 5 sec.) (Bijlage 2). Na een extractietijd van drie dagen zijn de aantallen wortelknobbelaaltjes bepaald.

- *Drainwatermonsters*

Rechtstreeks uit de drainbuis waarop de bemonsterde kas de overtollige voedingsoplossing in de drainput afwaterde zijn twaalf drainwatermonster à 30 liter genomen. Elk monster is over vier gestapelde zeven met een maaswijdte van 45 µm gegoten waarna de zeven zijn afgespoeld met ca. 400 ml water per zeef. Elk monster van 30 liter is zodoende teruggebracht tot ongeveer 1600 ml. Deze gereduceerde monsters zijn met behulp van de wattenfiltermethode verwerkt om de aaltjes uit de troebele suspensies te extraheren. Na een extractietijd van één dag zijn alle wortelknobbelaaltjes in de monsters geteld.

Verlengde extractietijd. In bovengenoemd gedeelte zijn de kokos- en wortelmonsters gedurende drie dagen geëxtraheerd. Maar na drie dagen zijn meestal nog niet alle aaltjes geëxtraheerd. Dat geldt zeker voor wortelmonsters. Vandaar dat een aantal monsters gedurende drie weken is geëxtraheerd. Normaal gesproken wordt door de onderzoekslaboratoria een extractietijd van maximaal drie dagen aangehouden. Voor een relatieve uitslag is dit voldoende, maar niet om vast te stellen hoeveel aaltjes er nu werkelijk in de monsters aanwezig zijn.

2.2.2 Bedrijf B: perliet

De bemonsteringen op Bedrijf B zijn uitgevoerd in een rozengewas met onderstaande specificaties.

- Kas : 4710 m² (afdeling 3)
- Aantal bedden : 16
- Aantal rijen/bed : 2
- Aantal planten/m² : ca. 8
- Aantal drainputten : 1
- Cultivar : Milva stek
- Plantdatum : januari 2002
- Teeltwijze : goten
- Substraat : perliet (1-m-lange balen)
- Ontsmetter : langzaam zandfilter (drainwater)

In bovenstaand rozengewas zijn in september 2003 de volgende bemonsteringen uitgevoerd:

- Wortels : 4 monsters à 40 planten
- Drainwater : 12 monsters, verdeeld over:
 - 4 monsters à 10 liter (jerrycan)
 - 4 monsters à 100 liter over een 10 µm zeef met polyester zeefgaas
 - 4 monsters à 100 liter over 4x 45 µm zeven met roestvrij staal zeefgaas

• *Wortelmonsters*

Voor de vier wortelmonsters à 40 planten zijn van 160 planten verspreid over de hele kas wortels verzameld. De wortels zijn op verschillende plekken uit de balen genomen, maar vooral bovenin na het opensnijden van de balen naast de plant. Van elk wortelmonster is een submonster van 20 g onderzocht op de aanwezigheid van wortelknobbelaaltjes. Daarvoor zijn de wortels in stukjes geknipt van ca. 0,5 cm en geëxtraheerd op wattenfilters in schalen met water. Na een extractietijd van 3 en 7 dagen zijn de schalen afgegoten en zijn alle wortelknobbelaaltjes in de aldus verkregen suspensies geteld.

• *Drainwatermonsters*

Het drainwater is op drie verschillende manieren bemonsterd, c.q. geëxtraheerd: 10 liter in jerrycans en 100 liter wat op twee manieren is uitgezeefd. De drie series van elk vier drainwatermonsters zijn rechtstreeks genomen uit de drainbuis waarop de bemonsterde kas de overtollige voedingsoplossing in de drainput afwaterde. Het drainwater is zodanig bemonsterd dat van elke serie eerst het eerste monster is genomen, vervolgens het tweede monster, enz. De 10 liter-monsters zijn in een jerrycan naar het laboratorium vervoerd waarin na afhevelen alle wortelknobbelaaltjes zijn geteld. De 100 liter-monsters zijn op het bemonsterde bedrijf tot geringe hoeveelheden gereduceerd door de aaltjes eruit te zeven. Dit is op twee manieren gebeurd, namelijk met behulp van een enkelvoudige zeef met 10 µm polyester zeefgaas en met een set van vier gestapelde zeven met 45 µm roestvrij staal zeefgaas. In beide gevallen zijn de zeven steeds nadat er ca. 33 liter overheen was gegoten, afgespoeld met ca. 400 ml water per zeef wat is verzameld. De aldus verkregen aaltjessuspensies zijn op het laboratorium met behulp van de wattenfiltermethode verwerkt om de aaltjes uit de troebele suspensies te extraheren. Na een extractietijd van één dag zijn alle wortelknobbelaaltjes geteld. Deze drie methoden voor het bemonsteren van drainwater zijn gebruikt om na te gaan welke methode het meest efficiënt is.

2.2.3 Bedrijf C: steenwolmatten

De bemonsteringen op Bedrijf C zijn uitgevoerd in een rozengewas met onderstaande specificaties.

- Kas : 4800 m² (afdeling 3)
- Aantal bedden : 20
- Aantal rijen/bed : 4
- Aantal planten/m² : 8
- Aantal drainputten : 1
- Cultivar : Dolce Vita stentling op Natal Briar
- Plantdatum : maart 2002
- Teeltwijze : goten
- Substraat : steenwol (100x15x7,5 cm)
- Ontsmetter : UV, later vervangen door een verhitte

In bovenstaand rozengewas zijn in oktober 2003 de volgende bemonsteringen uitgevoerd:

- Wortels : 4 monsters à 40 planten
- Drainwater : 12 monsters, verdeeld over:
 - 4 monsters à 10 liter (jerrycan)
 - 4 monsters à 100 liter over 10 µm zeef met polyester zeefgaas
 - 4 monsters à 100 liter over 4x 45 µm zeven met roestvrij staal zeefgaas

- *Wortelmonsters*

De vier wortelmonsters zijn op dezelfde wijze genomen en verwerkt als beschreven in paragraaf 2.2.2. De wortels zijn op verschillende plekken uit de matten genomen, maar vooral boven- en onderin na het opensnijden van de matten naast de plant.

- *Drainwatermonsters*

De twaalf drainwatermonsters zijn op dezelfde wijze genomen en verwerkt als vermeld in paragraaf 2.2.2.

2.3 Resultaten en discussie

2.3.1 Bedrijf A

De kokos-, wortel- en drainwaterbemonsteringen, die op een bedrijf met rozen in kokos zijn uitgevoerd, leverden de in Tabellen 1-3 en Figuren 1-3 getoonde resultaten op.

2.3.1.1 Kokosmonsters

- *Monstergrootte*

De resultaten in Tabel 1 laten zien welke aantallen J2 van *M. hapla* er gemiddeld, minimaal en maximaal in de kokosmonsters aanwezig waren. Hoewel de gemiddelden natuurlijk niet van elkaar afwijken, omdat de 120 en 240 container-monsters zijn samengesteld uit de 60 container-monsters, laten de minima en maxima wel grote verschillen zien in relatie tot de monstergrootte. Het verschil tussen het minimum en maximum aantal J2 per 100 ml kokos neemt af naarmate de monstergrootte toeneemt. Dit komt tot uiting in een afnemende standaardafwijking en variatiecoëfficiënt bij een toenemende monstergrootte.

Worden de twaalf 60 container-monsters in groepen van vier bij elkaar genomen en gemiddeld dan levert dit drie gemiddelden op variërend van 205 tot 320 J2 per 100 ml kokos.

Tabel 1. **Kokos.** Invloed van de monstergrootte op het resultaat.

Monstergrootte (aantal containers)	Aantal J2 van <i>M. hapla</i> per 100 ml kokos			Standaard- afwijking	Variatie- coëfficiënt (%) ¹⁾
	Gemiddeld	Minimum	Maximum		
60	251	120	502	96	38
120	264	250	318	27	10
240	254	243	273	17	7

¹⁾ Variatiecoëfficiënt = (gemiddelde x 100)/standaardafwijking.

- *Monsters uit dezelfde containers*

In Tabel 2 zijn de resultaten opgenomen van twee series van vier monsters à 60 containers. De overeenkomst tussen beide series is dat de monsters 1 genomen zijn uit dezelfde 60 containers. Dat geldt ook voor de overige monsternummers. Bij serie 2 is tussen haakjes aangegeven hoeveel procent wortelknobbe-laaltjes er meer of minder in deze monsters aanwezig waren dan in de monsters van serie 1. Dit varieerde van -47% tot 23%. De resultaten van beide series zijn gepaard en aan correlatietoetsen onderworpen. Uit de toetsen blijkt dat beide series significant ($P \leq 0,05$) verschillen ten opzichte van elkaar. Dit betekent dat een monster, dat is samengesteld uit één kokosprik per container, niet representatief is voor de besmettingsgraad in de bemonsterde containers.

- *Submonsters uit hetzelfde monster*

Tabel 2 bevat ook de resultaten van twee series van vier submonsters genomen uit hetzelfde monster. Zo zijn beide submonsters 1 genomen uit hetzelfde kokosmonster à 60 containers. Dat geldt ook voor de overige nummers. Ook deze resultaten zijn gepaard en getoetst en laten zien dat de submonsters uit beide

series niet significant ten opzichte van elkaar verschillen ($P \leq 0,05$). Dit betekent dat indien het mengen van de verzamelde kokos goed gebeurt en hieruit op de voorgeschreven wijze een submonster wordt gehaald, de uitslag van dit monster representatief is voor de aaltjesbesmetting in de verzamelde hoeveelheid kokos. Tussen de monsters in beide series varieerde het verschil in aantal J2 per 100 ml kokos van -16% tot 16%.

Tabel 2. **Kokos.** Twee serie (sub)monsters uit dezelfde containers en hetzelfde monster.

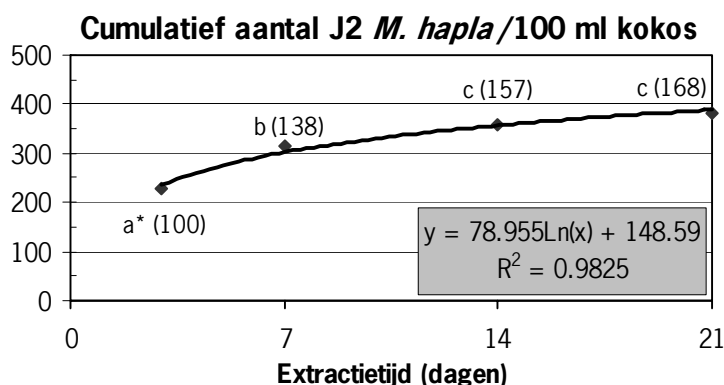
(Sub)monster	Monsters uit dezelfde containers		Submonsters uit hetzelfde monster	
	Aantal J2 <i>M. hapla</i> per 100 ml kokos serie 1	Serie 2	Aantal J2 <i>M. hapla</i> per 100 ml kokos serie 1	Serie 2
1	502	267 (-47%) ¹⁾	120	131 (9%) ¹⁾
2	228	280 (23%)	215	250 (16%)
3	254	195 (-23%)	237	198 (-16%)
4	306	341 (11%)	247	231 (-6%)
gemiddeld	323	271	205	203
standaardafwijking	124	60	58	52
variatiecoëfficiënt (%) ²⁾	38	22	28	26
	serie 1 significant verschillend t.o.v. serie 2 ($P \leq 0,05$)		serie 1 niet significant verschillend t.o.v. serie 2 ($P \leq 0,05$)	

¹⁾ Relatief verschil in aantal wortelknobbelaaltjes tussen serie 1 en 2.

²⁾ Variatiecoëfficiënt = (gemiddelde x 100)/standaardafwijking.

• Extractietijd van 21 dagen

Figuur 1 laat het verloop zien van het cumulatief aantal geëxtraheerde J2 van *M. hapla* per 100 ml kokos in relatie tot de extractietijd van 21 dagen. Daaruit blijkt dat na drie dagen nog niet alle aaltjes uit de kokos zijn geëxtraheerd, maar wel het grootste gedeelte. Tot 14 dagen was er nog wel sprake van een significante toename van het aantal aaltjes, daarna niet meer. Het aantal geëxtraheerde aaltjes volgde een logaritmische lijn ($R^2 = 0,9825$).



Figuur 1. **Kokos.** Cumulatief verloop van het aantal geëxtraheerde J2 van *M. hapla* uit kokos in relatie tot de extractietijd van maximaal 21 dagen (n=6).

* Absolute aantallen gevolgd door verschillende letters zijn significant verschillend ($P \leq 0,05$).

Getallen tussen haakjes zijn relatief ten opzichte van een extractietijd van 3 dagen.

2.3.1.2 Wortelmonsters

• Monsters uit dezelfde containers

Tabel 3 bevat de resultaten van twee series van vier wortelmonsters à 30 planten. De overeenkomst tussen beide series is dat de monsters 1 genomen zijn van planten uit dezelfde dertig containers. Dat geldt ook voor de overige monsternummers. Tussen de monsters uit beide series varieerde het verschil in aantal J2 per 10 g wortels van -53% tot 502%. De resultaten van beide series zijn gepaard en aan correlatietoetsen onderworpen. Uit de toetsen blijkt dat beide series significant ($P \leq 0,05$) verschillen ten opzichte van elkaar. Dit betekent dat de wortels in een container niet allemaal in dezelfde mate zijn aangetast.

Tabel 3. **Wortels.** Twee serie monsters uit dezelfde containers.

Monster	Aantal J2 <i>M. hapla</i> per 10 g wortels	
	serie 1	serie 2
1	379	178 (-53%) ¹⁾
2	43	259 (502%)
3	53	185 (249%)
4	119	43 (-64%)
Gemiddeld	148	166
Standaardafwijking	157	90
Variatiecoëfficiënt (%) ²⁾	106	54

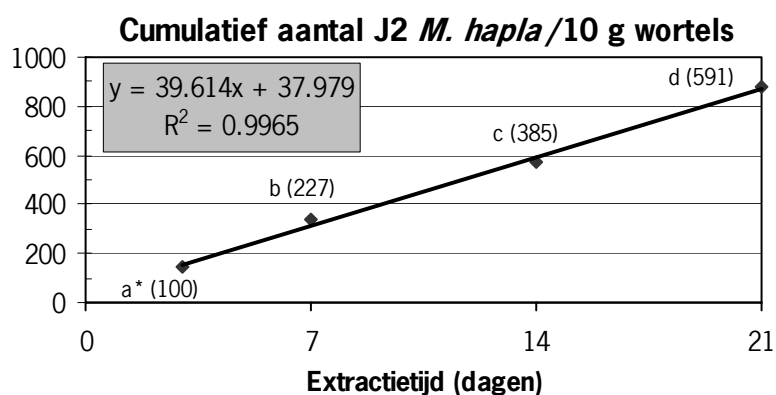
serie 1 significant verschillend t.o.v. serie 2
($P \leq 0,05$)

¹⁾ Relatief verschil in aantal wortelknobbelaaltjes tussen serie 1 en 2.

²⁾ Variatiecoëfficiënt = (gemiddelde x 100)/standaardafwijking.

• Extractietijd van 21 dagen

Figuur 2 laat het verloop zien van het cumulatief aantal geëxtraheerde J2 van *M. hapla* per 10 g wortels in relatie tot de extractietijd van 21 dagen. Daaruit blijkt dat na drie dagen slechts een zeer geringe fractie van het totaal aantal geëxtraheerde aantal aaltjes in de wortels is geëxtraheerd. Tot en met de 21^e dag nam het aantal geëxtraheerde aaltjes lineair toe ($R^2 = 0,9965$). Dit betekent dat drie dagen extractie – een tijd die door de meeste onderzoekslaboratoria wordt aangehouden – absoluut onvoldoende is om inzicht te krijgen in het aantal aaltjes dat in een wortelmonster aanwezig is. Zelfs in de derde extractieweek was de toename nog zo groot dat geconcludeerd mag worden dat na 21 dagen nog lang niet alle aaltjes zijn geëxtraheerd. In paragraaf 3.3.1.3 is een extractietijd aangehouden van 35 dagen.



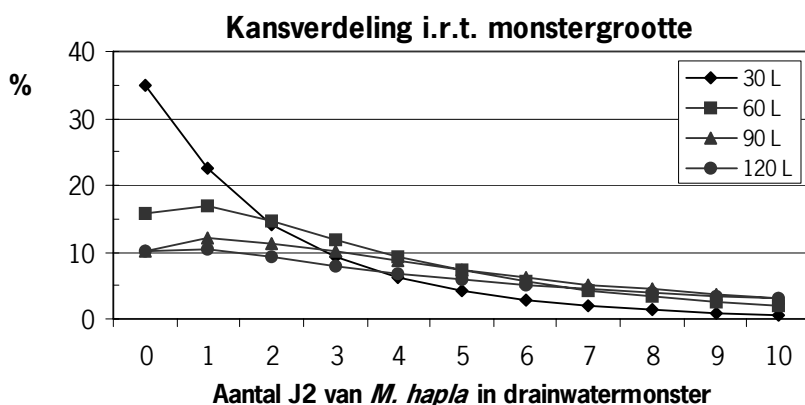
Figuur 2. **Wortels.** Cumulatief verloop van het aantal geëxtraheerde J2 van *M. hapla* uit wortels in relatie tot de extractietijd van maximaal 21 dagen (n=4).

* Absolute aantallen gevolg door verschillende letters zijn significant verschillend ($P \leq 0,05$).
Getallen tussen haakjes zijn relatief ten opzichte van een extractietijd van 3 dagen.

2.3.1.3 Drainwatermonsters

In de twaalf 30 liter-drainwatermonsters waren 0 (5x), 1 (2x), 3 (1x) en 4 (4x) J2 van *M. hapla* aanwezig. Deze resultaten zijn gebruikt om samengestelde monsters te maken met als doel na te gaan hoe groot de kans is dat er nul aaltjes in een monster van een bepaalde hoeveelheid drainwater worden aangetroffen. De kansverdeling in relatie tot de monstergrootte van 30, 60, 90 en 120 liter drainwater is grafisch weergegeven in Figuur 3.

Uit Figuur 3 blijkt dat de kans om geen J2 van *M. hapla* in een monster aan te treffen aanmerkelijk kleiner wordt naarmate de monstergrootte toeneemt. Vanaf 90 liter bleef de kans op een nulscore steken op 10%.



Figuur 3. **Drainwater.** Kansverdeling van het aantal J2 van *M. hapla* dat in relatie tot de monstergrootte in het drainwater kan worden aangetroffen.

2.3.1.4 Relatie wortel- en drainwatermonsters

Er bestaat uiteraard een relatie tussen het aantal aaltjes in de wortel- en drainwatermonsters. Maar de vraag doet zich daarbij voor of dit een bruikbare relatie is op basis waarvan het aantal aaltjes in het drainwater gebruikt kan worden om een inschatting te maken van de wortelaantasting. Is dat het geval dan kan worden volstaan met het nemen van drainwatermonsters waardoor het bemonsteren sterk wordt vereenvoudigd. De twaalf 30 liter-drainwatermonsters en de daaruit berekende 60-, 90- en 120 liter-monsters bevatten gemiddeld respectievelijk 1,75; 3,50; 5,25 en 7,0 J2 van *M. hapla*. In de vier wortelmonsters waren, berekend over beide series, na drie dagen extractie gemiddeld 157 J2 van *M. hapla* per 10 g wortels aanwezig (Tabel 3). Ten opzichte van de aantallen J2 in 30, 60, 90 en 120 liter drainwater waren er in 10 g wortels respectievelijk 90x, 45x, 30x en 22x meer wortelknobbelaaltjes aanwezig.

2.3.2 Bedrijf B

De wortel- en drainwaterbemonsteringen, die op een bedrijf met rozen in perliet zijn uitgevoerd, leverden de in Tabel 4 vermelde resultaten op.

2.3.2.1 Wortelmonsters

Uit Tabel 4 blijkt dat in alle vier wortelmonsters à 40 planten wortelknobbelaaltjes aanwezig waren. Een extractietijd van zeven dagen leverde gemiddeld ruim 4x zoveel aaltjes op dan een extractietijd van drie dagen. De variatie tussen de monsters, die kan worden aangeduid met de variatiecoëfficiënt, was behoorlijk groot. Hoe groter de variatiecoëfficiënt is, des te groter zijn de verschillen tussen de monsters. Omdat de variatie tussen de monsters behoorlijk groot is, heeft dit als consequentie dat één monster geen uitsluitsel geeft over de mate van aantasting in de kas. Dit onderzoek bevestigt de resultaten van de bemonsteringen die op bedrijf A zijn uitgevoerd.

Tabel 4 - **Wortels en drainwater.** Resultaten van bemonsteringen op bedrijf B met rozen in perliet.

Monster	Aantal wortelknobbelaaltjes (J2) per			
	10 g wortels dag 1-3 / dag 1-7	10 liter drainwater	100 liter drainwater (10 µm zeef)	100 liter drainwater (4x 45 µm zeef)
1	14 / 36	0	0	0
2	13 / 35	0	0	20
3	24 / 68	0	0	4
4	35 / 246	0	0	0
Gemiddelde	22 / 96	0	0	6
Standaardafwijking	10 / 101	0	0	9,5
Variatiecoëfficiënt ¹⁾	47% / 105%	0%	0%	158%

¹⁾ Variatiecoëfficiënt = (standaardafwijking x 100)/gemiddelde.

2.3.2.2 Drainwatermonsters

Het op drie manieren bemonsteren van het drainwater leverde praktische resultaten op (Tabel 4). De 10 liter-monsters, waarin na bezinken en afhevelen de aantallen aaltjes zijn geteld, bevatten geen wortelknobbelaaltjes. In de 100 liter-monsters waren deze wel aanwezig, maar alleen in de monsters waar de aaltjes zijn uitgezeefd met behulp van een gestapelde set van vier zeven met een maaswijdte van 45 µm. Met een enkelvoudige zeef, gemaakt van 10 µm polyester zeefgaas, gingen blijkbaar zoveel aaltjes verloren dat er geen J2 meer in de monsters zijn aangetroffen. Hoewel de set van vier 45 µm-zeven het beste resultaat opleverde, werd ook hiermee niet in alle vier monsters aaltjes aangetroffen. In de helft van het aantal monsters was dit het geval. Eén monster hoeft op dit bedrijf dus niet voldoende te zijn om aaltjes in het drainwatermonster aan te tonen. De kans hierop kan worden verhoogd door meer dan één drainwatermonster te nemen of het aantal te bemonsters liters te verdubbelen.

2.3.2.3 Relatie wortel- en drainwatermonsters

Op basis van het gemiddelde aantal J2 van *M. hapla* in de wortelmonsters (22 J2/10 g wortels; extractietijd: 3 dagen) en de drainwatermonsters (6 J2/100 liter; 4x 45 µm-zeven) waren er in 10 g wortels 3,7x meer wortelknobbelaaltjes aanwezig dan in 100 liter drainwater.

2.3.3 Bedrijf C

De wortel- en drainwaterbemonsteringen, die op een bedrijf met rozen in steenwolmatten zijn uitgevoerd, leverden de in Tabel 5 vermelde resultaten op.

2.3.3.1 Wortelmonsters

Uit Tabel 5 blijkt dat in alle vier wortelmonsters à 40 planten wortelknobbelaaltjes aanwezig waren. In tegenstelling tot bedrijf B leverde de extractietijd van zeven dagen nu nauwelijks meer aaltjes op dan de extractie gedurende drie dagen. De variatie tussen de monsters was betrekkelijk groot wat wordt geïllustreerd door de hoge variatiecoëfficiënt.

2.3.3.2 Drainwatermonsters

Het bemonsteren van drainwater door middel van het verzamelen van 10 liter, de hierin aanwezige aaltjes te laten bezinken en vervolgens na afhevelen te tellen, was minder efficiënt dan beide andere methoden (Tabel 5). Wat betreft het uitzeven van aaltjes blijkt dat beide zeefmethoden gemiddeld niet voor elkaar onderdeden, maar de variatie tussen de monsters was in geval van de 10 µm zeef aanmerkelijk groter dan bij de set van vier gestapelde 45 µm-zeven. Een dergelijke set zeven heeft daarom de voorkeur boven een enkelvoudige zeef van 10 µm.

2.3.3.3 Relatie wortel- en drainwatermonsters

Op basis van de gemiddelde aantallen *M. hapla* in de wortelmonsters (16 J2/10 g wortels; extractietijd: 3 dagen) en in de drainwatermonsters (575 J2/100 liter; 4x 45 µm-zeven), waren er in 10 g wortels 36x minder wortelknobbelaaltjes aanwezig dan in 100 liter drainwater.

Tabel 5 - **Wortels en drainwater.** Resultaten van bemonsteringen op bedrijf C met rozen in steenwol.

Monster	Aantal wortelknobbelaaltjes (J2) per			
	10 g wortels dag 1-3 / dag 1-7	10 liter drainwater	100 liter drainwater (10 µm zeef)	100 liter drainwater (4x 45 µm zeef)
1	29 / 39	29	348	468
2	7 / 8	5	539	703
3	16 / 20	0	65	508
4	12 / 19	2	1173	619
Gemiddelde	16 / 21	9	531	575
Standaardafwijking	9 / 13	13	470	107
Variatiecoëfficiënt ¹⁾	60% / 61%	150%	88%	19%

¹⁾ Variatiecoëfficiënt = (standaardafwijking x 100)/gemiddelde.

2.4 Algehele discussie en conclusies

Kokosmonsters

- a. Grote variatie in aantal wortelknobbelaaltjes. Minder variatie bij een toenemende monstergrootte.
- b. Eén monster kan voldoende zijn om een aantasting door wortelknobbelaaltjes aan te tonen, maar is niet representatief voor de aantastingssituatie in de kas.
- c. Monsters uit dezelfde containers vertonen een grote onderlinge variatie in uitslag.
- d. Submonsters uit hetzelfde monster geven geen significante variatie in uitslag.
- e. Na drie dagen extractie zijn de meeste aaltjes uit het kokosmonster geëxtraheerd.

ad. a. Het bemonsteren van kokos in een kas met ca. 40.000 containers waarbij uit 60 containers een kokosprik werd genomen, liet tussen de twaalf monsters een grote variatie in aantal wortelknobbelaaltjes zien. De variatie tussen de monsters werd bijna 4x kleiner toen het aantal te bemonsteren containers werd verdubbeld. Hoe meer containers er in de monsters worden betrokken, hoe kleiner de variatie is tussen de monsters. Ook wanneer de besmetting bepaald wordt op basis van bijvoorbeeld vier monsters kan de variatie groot zijn. In dit onderzoek varieerden de besmettingen dan van 205 tot 320 J2 van *M. hapla* per 100 ml kokos. Dat de variatie groot kan zijn, heeft onder andere te maken met het feit dat de eitjes van wortelknobbelaaltjes in eiproppen worden afgezet. Een eiprop bevat gemiddeld enkele honderden eitjes. Zodoende hoeft een monster maar één eiprop meer of minder te bevatten en het aantal aaltjes in het monster verschilt een paar honderd. Dit geldt eveneens voor wortelmonsters.

ad. b. Is het doel van de monsternamen om aan te tonen dat er aaltjes in de kas aanwezig zijn, dan zou in deze kas een monstergrootte van zestig containers zeker voldoende zijn geweest. Misschien waren minder containers ook al voldoende geweest. Dit is echter afhankelijk van het percentage containers dat met aaltjes is besmet: hoe geringer dit aantal is, hoe meer containers er moeten worden bemonsterd (zie par. 2.5). Is het doel echter om een zo goed mogelijke indruk te krijgen van de besmettingsgraad in de kas, dan moeten er in deze kas minstens 120 containers worden bemonsterd. Of dit aantal ook voor andere kassen met evenveel containers voldoende is, kan niet op voorhand bevestigend worden beantwoord. Dit is namelijk geheel afhankelijk van de aantastingskenmerken in de kas zoals het percentage aangetaste planten, de leeftijd van de aantasting en de verspreiding van de aantasting over de kas. Omdat deze kenmerken niet bekend zijn, is het niet mogelijk aan te geven hoeveel containers er moeten worden bemonsterd om een goed beeld te krijgen van de besmettingsgraad in de kas. Dit zal per bedrijf proefondervindelijk moeten worden vastgesteld.

ad. c. Meestal wordt er bij het bemonsteren slechts één kokosprik uit een container genomen. In dat geval is de kans groot, zoals dit onderzoek heeft aangetoond, dat de uitslag van het monster niet representatief is voor de besmettingsgraad in de bemonsterde containers. Dit betekent dat het kokossubstraat in de containers niet overal in dezelfde mate is besmet. Misschien zijn meerdere prikken uit elke container wel representatief voor de besmettingsgraad. Hoeveel prikken dit dan moeten zijn, is niet onderzocht.

ad. d. Nadat een monster is genomen, wordt hieruit in het laboratorium een submonster van 100 ml genomen. Indien de verzamelde hoeveelheid kokos goed is gemengd, is de uitslag van het submonster representatief voor de aaltjesbesmetting in het monster. Dit is getoetst door uit iedere kokosmonster twee submonsters te nemen, te verwerken en vervolgens te bepalen hoeveel wortelknobbelaaltjes er in de submonsters aanwezig waren.

ad. e. De extractietijd die diverse onderzoekslaboratoria voor grond en andere substraten hanteren, is in het algemeen maximaal drie dagen. Voor kokos blijkt deze tijd voldoende om meer dan de helft van het aantal wortelknobbelaaltjes uit het monster te extraheren. Maar gedurende de hele extractietijd van 21 dagen werden er wortelknobbelaaltjes geëxtraheerd. Wanneer het de bedoeling is om vast te stellen hoeveel wortelknobbelaaltjes er totaal in een kokosmonster aanwezig zijn, dan zal de extractietijd zeker langer moeten zijn dan 21 dagen. Dat er ook na drie dagen wortelknobbelaaltjes uit de kokosmonsters werden geëxtraheerd, moet te maken hebben met het feit dat er losse eitjes of zelfs enkele eiproppen in de kokosmonsters hebben gezeten. Dit valt af te leiden uit een extractieproefje met aaltjesvrije kokos waaraan uitsluitend J2 van *M. hapla* zijn toegevoegd. De kokos bevatte in dit geval dus geen eitjes of eiproppen. Alleen de eerste drie dagen kwamen er aaltjes uit de kokos. Op de vierde dag werden er geen aaltjes meer gevonden. Dit betekent dat voor het vaststellen van uitsluitend de besmetting met J2 in kokos een extractietijd van drie

dagen voldoende is. De eitjes zijn normaal gesproken onderdeel van de wortelaantasting, maar komen als gevolg van het prikken met de grondboor door het wortelstelsel in het kokosmonster terecht.

Wortelmonsters

- a. Grote variatie in aantal wortelknobbelaaltjes tussen de monsters.
- b. Monsters uit dezelfde containers vertonen een grote onderlinge variatie in uitslag.
- c. Na drie dagen extractie is slechts een zeer gering gedeelte van het aantal aaltjes in het wortelmonster geëxtraheerd.

ad. a. Algemeen kan worden gesteld dat er tussen de wortelmonsters een grote variatie is in aantal aaltjes. Alle drie bedrijven lieten dit zien. Dit betekent dat een wortelmonster, samengesteld uit wortels van maximaal 1‰ van het aantal planten, zeker geen representatieve uitslag oplevert aangaande het aantastingsniveau in de kas. Meerdere monsters zijn daarvoor nodig of meer planten per monster. Hoeveel monsters dit moeten zijn en hoeveel planten er per monster moeten worden bemonsterd, is afhankelijk van de aantastingskenmerken in de kas. Aangezien deze kenmerken in elke kas weer anders zijn, zijn hiervoor geen algemene richtlijnen te geven.

De alledaagse praktijk is echter dat er slechts één monster uit een kas of afdeling wordt genomen. Gelet op de resultaten die ons onderzoek heeft opgeleverd, mag aan de uitslag van slechts één wortelmonster geen andere waarde worden toegekend dan dat er wel of geen aaltjes in de kas aanwezig zijn. De uitslag mag zeker niet worden gebruikt om het verloop van de aaltjespopulatie te volgen. En dus ook niet om vast te stellen of een bestrijding wel of niet werkt. Maar op basis van slechts één monster zonder aaltjes, mag ook niet worden geconcludeerd dat de kas aaltjesvrij is. Daarover kan pas een harde uitspraak worden gedaan als er meerdere monsters worden genomen en alle monsters een nul scoren.

ad.b. Bij het bemonsteren van planten worden meestal uit elke bemonsterde container of mat slechts enkele wortels verwijderd. In dat geval is de kans groot, zoals dit onderzoek heeft aangetoond, dat het monster niet representatief is voor het aantastingsniveau van de bemonsterde planten. Het wortelstelsel is dus niet overal in dezelfde mate aangetast. Het beste bemonsteringsresultaat wordt verkregen als van alle te bemonsteren planten alle wortels in het monster worden opgenomen. Dan gaat het echter om destructieve bemonsteringen, wat in de praktijk niet mogelijk is. Daarom zal het in de praktijk altijd moeilijk zijn om goede representatieve wortelbemonsteringen uit te voeren. Verbetering is mogelijk door zoveel mogelijk planten in de bemonstering te betrekken en meer dan één monster te nemen.

ad. c. Ook voor wortels hanteren de meeste laboratoria een extractietijd van drie dagen. Op verzoek zijn langere extractietijden mogelijk. Voor wortels is dit zeker nodig indien men de mate van aantasting wenst te bepalen. Drie dagen extractie leverde bijna 6x minder aaltjes op dan 21 dagen extractie. Zelfs in de derde extractieweek was de toename nog zo groot dat geconcludeerd mag worden dat er na 21 dagen nog veel aaltjes in de wortels aanwezig zijn. Langere extractietijden kunnen dus wenselijk zijn.

Drainwatermonsters

- a. Meer liters bemonsteren, geeft grotere kans op het vinden van wortelknobbelaaltjes in het drainwater.
- b. Een monstergrootte van ca. 100 liter is vaak voldoende om aaltjes aan te tonen.
- c. Betere resultaten met een set van 4 gestapelde 45 µm-zeven dan met een 10 µm-zeef en bezinken/afhevelen.

ad. a en b. Hoe meer drainwater er wordt bemonsterd, des te groter is de kans dat er aaltjes in het monster worden gevonden. Op basis van het onderzoek op bedrijf A leverden een monster van 30 liter en de daaruit geëxtrapoleerde monsters van 60, 90 en 120 liter drainwater een kans op van respectievelijk 35%, 16%, 10% en 10% om onterecht tot de conclusie te komen dat er geen aaltjesaantasting in de kas aanwezig was. Wanneer niet bekend is dat het gewas door aaltjes is aangetast, dan zijn meerdere of grotere drainwatermonsters wenselijk om de aantasting aan te tonen, tenzij er ook andere soorten monsters worden genomen. Een drainwatermonster van 100 liter is veelal voldoende om een aantasting op te sporen. Maar ook dan kan het voorkomen dat er geen aaltjes in het monster worden aangetroffen terwijl deze wel in het gewas aanwezig zijn. Dit deed zich voor op bedrijf B waar twee van de vier drainwatermonsters, die verwerkt zijn met een set van vier zeven, geen aaltjes bleken te bevatten. Was er slechts één drainwater-

monster genomen, dan was de kans 50% dat er geen aaltjes werden gevonden en er dus een verkeerde conclusie werd getrokken. Dat er geen aaltjes in het monster worden gevonden terwijl deze wel in het gewas aanwezig zijn, is afhankelijk van diverse factoren. Daarbij moet worden gedacht aan:

- a. percentage aangetaste planten
- b. mate van aantasting
- c. verdeling van de aantasting in de kas
- d. populatieontwikkeling (afhankelijk van: temperatuur, cultivar en aaltjessoort en -isolaat)
- e. aantal planten in de kas
- f. totale hoeveelheid volume aan substraat in de te bemonsteren kas
- g. dagelijkse watergift
- h. drainpercentage.

Omdat al deze factoren van kas tot kas verschillen en tevens wat betreft de aaltjes (a t/m d) onbekend zijn, is het niet mogelijk een universeel antwoord te geven op de vraag hoe een kas het beste kan worden bemonsterd. Dit wordt bevestigd door de grote verschillen in aantallen wortelknobbelaaltjes die zijn gevonden in de drainwatermonsters op de bedrijven B en C met ongeveer even oude rozen gewassen.

Wanneer het de bedoeling is om een aaltjesaantasting uitsluitend op basis van een drainwaterbemonstering op te sporen, dan zijn minstens twee monsters gewenst. Een andere strategie die gevolgd kan worden, is om de monsternamen tot één monster te beperken en dit enkele maanden later te herhalen indien het eerste monster geen plantenparasitaire aaltjes heeft opgeleverd. Worden er twee of meer 100 liter-monsters genomen zonder dat daarin plantenparasitaire aaltjes worden aangetroffen, ook dan is het raadzaam de bemonstering bijvoorbeeld een half jaar later nog een keer te herhalen. Worden ze ook dan niet aangetroffen, dan mag er van worden uitgegaan dat de kas aaltjesvrij is. Of de kas vervolgens aaltjesvrij blijft, kan worden gecontroleerd door jaarlijks een bemonstering uit te laten voeren.

ad. c. Een set met vier gestapelde 45 µm-zeven, vervaardigd van roestvrij staal zeefgaas, leverde meer wortelknobbelaaltjes op dan een 10 µm-zeef gemaakt van polyester zeefgaas. Dit bevestigt de conclusie uit vorig onderzoek dat 45 µm roestvrij staal zeefgaas een hogere extractie-efficiëntie heeft dan 10 µm polyester zeefgaas (Amsing en Zijlstra, 2003). De reden voor dit verschil ligt in het feit dat het polyester zeefgaas ook mazen bevat van ca. 20 µm en dat er tijdens het gieten een waterlaag op de 10 µm-zeef aanwezig is. Zodoende krijgen de aaltjes meer gelegenheid om met kop of staart in een grote maas terecht te komen en zo door de maas te verdwijnen. De set met vier zeven leverde niet alleen meer aaltjes op, maar de variatie tussen de monsters was hierbij kleiner dan bij de enkelvoudige 10 µm-zeef.

Het bezinken en afhevelen van de 10 liter-drainwatermonsters had in principe per liter de meeste wortelknobbelaaltjes moeten opleveren, maar dit was niet het geval. Dit moet worden toegeschreven aan afhevelverliezen. Verliezen ontstaan als niet alle aaltjes naar de bodem zijn gezonken, wat bij een te hoge oppervlaktespanning van de suspensie mogelijk is omdat de aaltjes dan op het water blijven drijven. Verlagen van de oppervlaktespanning middels het toevoegen van een uitvloeier verhelpt dit. Een andere verliespost kan het afhevelen zelf zijn indien er tijdens het afhevelen wervelingen in het water ontstaan. Afzuigen met behulp van een vacuümpomp kan dit voorkomen. Bovendien kan hiermee tot op zeer geringe hoogte worden afgezogen wat een ander voordeel is van het afhevelen met behulp van een vacuümpomp.

Relatie wortel- en drainwatermonsters

- | |
|---|
| a. Er is geen eenduidige relatie tussen het aantal aaltjes in de drainwater- en wortelmonsters. |
|---|

ad. a. Werden er op de bedrijven met kokos (bedrijf A) en perliet (bedrijf B) nauwelijks wortelknobbelaaltjes in het drainwater gevonden, op het bedrijf met steenwolmatten (bedrijf C) waren de aantallen aanmerkelijk hoger. Dit ondanks het feit dat de aantallen in de wortels van de rozen in steenwol het laagst waren. Een verklaring kan zijn dat de waterstromen in steenwolmatten zodanig zijn dat er meer wortelknobbelaaltjes uit de matten worden meegenomen. Andere factoren die hierbij een rol spelen zijn de reeds hierboven genoemde factoren a t/m h. Onder invloed van deze factoren waren de relaties tussen het aantal aaltjes in de wortel- en drainwatermonsters op de drie praktijkbedrijven zeer verschillend. Waren er op bedrijf A 30x meer wortelknobbelaaltjes in 10 g wortels aanwezig dan in 100 liter drainwater, op bedrijf B was dit 3,7x meer en op bedrijf C zelfs 36x minder. Op grond van dit onderzoek is het dan ook niet mogelijk om voor de

praktijk een algemene vertaalslag te maken van het aantal aaltjes in een drainwatermonster naar de hoogte van de aaltjesaantasting in de wortels.

2.5 Bemonstering: theoretische benadering

Naar aanleiding van de grote variatie in aantallen aaltjes, die de bemonsteringen in de praktijk hebben opgeleverd, is de bemonstering theoretisch benaderd. Daarvoor zijn rekenregels gehanteerd. Op deze wijze is het mogelijk inzicht te krijgen in de wijze waarop er zou moeten worden bemonsterd. Bijvoorbeeld om op basis van wortelbemonsteringen een aantasting in de kas aan te kunnen tonen. Dit vereist dat er minstens van één aangetaste plant wortels of substraat in het monster aanwezig moeten zijn. Op basis van het feit dat de te bemonsteren partijen over het algemeen zeer groot zijn (0,5 - 1 hectare; ca. 8 planten/m²) en dat de kans op het wel of niet aantonen van een aantasting binomiaal is verdeeld, is onderstaande Genstat-formule geldig. De formule berekent bij een bepaalde betrouwbaarheidspercentage (P) hoeveel aangetaste planten er minimaal in het monster aanwezig zijn (x) wanneer er n planten worden bemonsterd uit een partij waarvan y% is aangetast.

Genstat-formule: $\text{calc } x = \text{edbin}(P; n, y\%)$

Verklaring

x = minimaal aantal aangetaste planten in het monster

P = betrouwbaarheidspercentage

n = aantal bemonsterde planten

y% = percentage aangetaste planten in de te bemonsteren partij

Tabel 6 - Theoretisch minimum aantal aangetaste planten in het monster in relatie tot de monstergrootte en het percentage aangetaste planten in de te bemonsteren partij.

Monstergrootte	Minimaal aantal aangetaste planten in het monster (betrouwbaarheid: 95%)						
	Percentage aangetaste planten in de partij						
	1%	2%	5%	10%	25%	50%	75%
20	0	0	0	0	2	6	12
40	0	0	0	1	6	15	25
80	0	0	1	4	14	33	54
120	0	0	2	7	22	51	82
160	0	1	4	10	31	70	111
200	0	1	5	13	40	88	140

Tabel 7. Theoretisch minimum aantal te bemonsteren planten om een aantasting op te sporen in relatie tot het percentage aangetaste planten in de te bemonsteren partij.

Minimaal aantal te bemonsteren planten om een aantasting aan te tonen (betrouwbaarheid: 95%)						
Percentage aangetaste planten in de partij						
1%	2%	5%	10%	25%	50%	75%
299	149	59	29	11	5	3

Tabel 6 geeft aan hoeveel aangetaste planten er minimaal in het wortelmonster terechtkomen. Dit in relatie tot het aantal planten waarvan er wortels worden genomen (monstergrootte) en het percentage aangetaste planten in de te bemonsteren partij. Uit Tabel 6 blijkt dat bij lage aantastingspercentages, wat bij een beginnende aantasting vaak het geval is, de kans groot is dat de aantasting niet wordt opgespoord. Een nulscore in Tabel 6 betekent dat de kans 95% is dat de aantasting niet wordt opgespoord. Een score van één of meer aangetaste planten wil zeggen dat de aantasting met een kans van 95% wordt opgespoord. Anders-

om betekent dit dat er 5% kans is dat de aantasting wordt gemist. In de praktijk worden voor een wortelmonster meestal van 40 planten enkele wortels genomen. Bij deze monstergrootte en een aantastingspercentage van 5% of minder laat Tabel 6 zien - ervan uitgaande dat alle wortels van een aangetaste plant door aaltjes zijn aangetast - dat de kans dan 95% is dat de aantasting niet wordt aangetoond. Om een aantastingspercentage van 5% wel aan te kunnen tonen, moet het aantal te bemonsteren planten minstens worden verdubbeld. Bij lagere aantastingspercentages moeten nog veel meer planten worden bemonsterd. Is slechts 1% van het aantal planten in de kas door aaltjes aangetast, dan zijn zelfs 200 planten niet genoeg om aan te kunnen tonen dat er aaltjes in de kas aanwezig zijn. Uit Tabel 7 blijkt dat er bij een aantastingspercentage van 1% minimaal 299 planten moeten worden bemonsterd om van één aangetaste plant wortels in het monster te krijgen. Hoe hoger het percentage aangetaste planten is, des te minder planten hoeven er te worden bemonsterd om de aantasting aan te kunnen tonen.

2.6 Bemonsteringsadviezen

- *mate van aantasting*

De huidige bemonsteringspraktijk is dat er meestal maar één wortel-, substraat- of drainwatermonster wordt genomen. Het bemonsteringsonderzoek op de drie praktijkbedrijven heeft laten zien dat de resultaten tussen de monsters zo verschillend kunnen zijn dat er op basis van slechts één wortel- of substraatmonster absoluut geen uitspraak mogelijk is over de mate of hoogte van de aantasting (aantastingsniveau). Daarvoor zijn meerdere monsters noodzakelijk en/of meer planten per monster. Hoeveel monsters en planten dit dan moeten zijn, is afhankelijk van de aantastingskenmerken in de kas, zoals het percentage aangetaste planten, leeftijd van de aantasting en de verspreiding van de aantasting in de kas. Aangezien deze kenmerken niet alleen tussen kassen, maar ook in een kas sterk kunnen verschillen, is het niet mogelijk om voor een optimale bemonstering algemene richtlijnen te geven. Ook het relatief gemakkelijk te bemonsteren drainwater heeft in het onderzoek geen eenduidige relatie opgeleverd ten aanzien van het aantastingsniveau in de wortels in de verschillende substraten. De praktische waarde van het bemonsteren moet dan ook niet worden gezocht in het bepalen van het aantastingsniveau, maar in het opsporen van een aantasting.

- *aantasting opsporen*

Het bemonsteren zoals dat in de praktijk gebeurt, kan goed worden gebruikt om vast te stellen of er wel of geen aaltjes in de kas aanwezig zijn. Zijn ze aanwezig, dan moet een foutieve uitspraak, dat wil zeggen een nulscore, worden voorkomen. Bij een beginnende aantasting is de kans op een nulscore groot. De kans hierop wordt verkleind door op één tijdstip twee monsters te nemen of in geval van één monster de monstergrootte te verdubbelen. Wanneer er meerdere monsters worden genomen, dan gaat de voorkeur uit naar een wortelmonster van ca. 30 planten en een drainwatermonster van 100 liter. Wordt er slechts één monster genomen, dan wordt aanbevolen de dubbele hoeveelheid planten (60 planten) of de dubbele hoeveelheid drainwater (200 liter) te bemonsteren. In dat geval is de kans groot dat de aantasting direct wordt opgespoord wat wenselijk is in verband met het nemen van bestrijdings- en/of hygiënische maatregelen. Bij een monstergrootte van 60 planten is de kans 95% dat de aantasting in een afdeling met slechts 5% aangetaste planten wordt aangetoond. Onderzoek op twee van de drie praktijkbedrijven heeft laten zien dat een drainwatermonster van 100 liter niet altijd voldoende is om een aantasting op te sporen. Wanneer alleen het drainwater wordt bemonsterd, is het dan ook raadzaam een monster te nemen van meer dan 100 liter. Dit is gemakkelijk te realiseren door het drainwater over een set van vier gestapelde 45 µm-zeven te pompen. Als er op het eerste bemonsteringstijdstip geen schadelijke wortelaaltjes worden gevonden (*M. hapla*, *P. penetrans* of *P. vulnus*), dan wordt geadviseerd de monsternamen met een interval van enkele maanden te blijven herhalen. Worden er een half jaar na de eerste bemonstering nog geen aaltjes in de monsters aangetroffen, dan mag er van worden uitgegaan dat de kas op dat moment aaltjesvrij is. Een jaarlijkse bemonstering moet dan voldoende zijn om vast te stellen of, onder toepassing van allerlei hygiënische maatregelen, de kas aaltjesvrij blijft.

3 Extraheren

3.1 Inleiding

Om inzicht te krijgen in de wijze waarop door aaltjes aangetaste rozenwortels moeten worden geëxtraheerd om zoveel mogelijk aaltjes uit de wortels te krijgen, zijn onderstaande vier extractiemethoden onderzocht.

- Knippen/wattenfilter
- Mixer/wattenfilter
- Mistkamer
- Centrifuge

Vanwege het feit dat PPO Glastuinbouw niet beschikt over een mistkamer, is een vergelijking van de extractie-efficiëntie van alle vier methoden uitgevoerd door de Plantenziektenkundige Dienst (PD) in Wageningen. Dit is gedaan voor zowel het wortelknobbelaaltje *Meloidogyne hapla* als het wortellesieaaltje *Pratylenchus penetrans*. De vier methoden zijn beschreven in Bijlage 2. Verder zijn door PPO Glastuinbouw de eerste twee methoden onder verschillende omstandigheden onderzocht. Zo is voor beide soorten aaltjes bij de mixer/wattenfiltermethode het effect op de extractie-efficiëntie onderzocht van diverse mixertijden en toerentallen en is bij beide wattenfiltermethoden nagegaan wat de invloed is van het regelmatig verversen van het water in de extractieschalen.

De door aaltjes aangetaste rozen die in het onderzoek zijn gebruikt, zijn zelf opgekweekt. Voor de kweek met wortelknobbelaaltjes zijn in week 15 2001 rozenstekken cv. Vendela in kokos opgepot en elf dagen later geïnoculeerd met ca. 11.000 J2 (tweede-stadium-juvenielen) van *M. hapla* per plant. Het onderzoek met deze rozen is uitgevoerd in de eerste helft van 2003. Tegelijk met het opstarten van de kweek met wortellesieaaltjes is nog een tweede kweek met wortelknobbelaaltjes opgezet. Voor de kweek met wortellesieaaltjes zijn in week 19 2003 rozenstekken cv. Vendela in kokos opgepot en veertien dagen later geïnoculeerd met 6500 *P. penetrans* per plant. Een deel van deze stekken is toen geïnoculeerd met 6100 J2 van *M. hapla* per plant. Het onderzoek met deze planten is gestart in het najaar van 2003.

Alvorens met een extractiemethode kon worden begonnen, moesten de wortels worden geprepareerd met als eindresultaat wortelstukjes van ca. 0,5 cm. Deze voorbereiding was voor alle methoden dezelfde en is beschreven in Bijlage 2 onder het kopje 'Vorbewerking wortels'.

3.2 Materialen en methoden

3.2.1 Vergelijking extractiemethoden (PD)

De PD heeft voor *M. hapla* en *P. penetrans* de extractie-efficiëntie van de vier methoden met elkaar vergeleken. Dit onderzoek is in vijfvoud uitgevoerd, waarbij het vers wortelgewicht per monster afhankelijk was van de methode en het wortelaaltje (Tabel 6). Bij *P. penetrans* waren er minder wortels beschikbaar dan bij *M. hapla*. Alle methoden zijn gestart met een voorraad wortelstukjes van ca. 0,5 cm waaruit na het mengen het benodigde aantal wortelmonsters is genomen. Hoe de monsters bij de verschillende extractiemethoden zijn verwerkt, is beschreven in Bijlage 2. Bij de mixer/wattenfiltermethode zijn de wortelstukjes gedurende 5 seconden bij een toerental van 12.000 t/minuut stukgeslagen.

Bij knippen- en mixer/wattenfiltermethode en de mistkamer hebben de extracties veertien dagen geduurd, waarbij tussentijds de aaltjessuspensies enkele keren zijn afgegoten om het verloop van het aantal geëxtraheerde aaltjes vast te stellen. Bij de centrifugemethode is er uiteraard geen sprake van verschillende extractietijden, omdat daarbij alle aaltjes en eitjes direct in de aaltjessuspensie terechtkomen en als zodanig kunnen worden geteld.

Tabel 6 - Vergelijking extractie-efficiëntie van vier extractiemethoden (n=5).

Nr.	Extractiemethode	Monstergrootte (g)			Extractietijd (dagen)
		<i>M. hapla</i>	<i>P. pen.</i>	Mixer	
1.	Knippen/wattenfilter	20	15	n.v.t.	2, 3, 7 en 14
2.	Mixer/wattenfilter	20	15	12.000 t/min. - 5 sec.	2, 3, 7 en 14
3.	Mistkamer	20	15	n.v.t.	2, 3, 7 en 14
4.	Centrifuge	5	5	PD-protocol	n.v.t.

3.2.2 Verversen water

Bij de wattenfiltermethoden liggen de in stukjes geknipte wortels en de wortels die in een mixer zijn stukgeslagen op filters in een extractiezeef. De extractiezeef bevindt zich in een extractieschaal met water. Daarbij is het de bedoeling dat de aaltjes door de filters kruipen en aldus in het water terechtkomen. Op deze manier worden alleen levende aaltjes geëxtraheerd, geen eitjes, maar wel tweede-larvale-stadium aaltjes (J2) die uit de eitjes komen. Doordat de wortels vochtig zijn, komen er wortellexudaten in het water terecht. Ook het zuurstofgehalte in het water loopt na verloop van tijd terug. De wortellexudaten en de afname van het zuurstofgehalte in het water kunnen van invloed zijn op de extractie-efficiëntie. Om de invloed hiervan na te gaan, is met beide soorten aaltjes een proef uitgevoerd waarbij het water in de extractieschalen dagelijks, om de drie dagen en na zes dagen is verversd (Tabel 7). Dit onderzoek is bij beide wattenfiltermethoden in vijfvoud uitgevoerd. Na zes dagen extractie zijn de schalen voor het laatst afgegoten. Bij de mixer/wattenfiltermethode is in de proef met *M. hapla* een toerental gebruikt van 10.700 toeren/ minuut (t/min.) en in de proef met *P. penetrans* 16.000 t/minuut. In beide proeven bedroeg de mixertijd 5 seconden.

Tabel 7 - Invloed van het **verversen** van water in de extractieschalen op de extractie-efficiëntie (n=5).

Extractiemethode	Monstergrootte (g)		Extractieschalen afgieten en terugzetten					
	<i>M. hapla</i>	<i>P. pen.</i>	dag 1	2	3	4	5	6
Knippen- & mixer/wattenfilter	15	14	x	x	x	x	x	x
Knippen- & mixer/wattenfilter ¹⁾	15	14			x			x
Knippen- & mixer/wattenfilter ¹⁾	15	14						x

¹⁾ Verversen na 3 en 6 dagen is bij wortels met *P. penetrans* alleen uitgevoerd bij de mixer/wattenfiltermethode.

3.2.3 Mixertijd

Bij de mixer/wattenfiltermethode worden de in 0,5 cm stukjes geknipte wortels in een mixer stukgeslagen waarna de wortels voor extractie van de aaltjes op filters worden gelegd. De mixertijd die daarbij wordt gehanteerd, kan van invloed zijn op de extractie-efficiëntie. In de proeven die in vijfvoud zijn uitgevoerd, is nagegaan welke mixertijd de meeste aaltjes oplevert: 5, 10, 20 en 40 sec (Tabel 8). Dit onderzoek is bij beide soorten wortelaaltjes (*M. hapla* en *P. penetrans*) uitgevoerd met een toerental van 10.700 t/minuut. Als referentie is de knippen/wattenfiltermethode in het onderzoek opgenomen.

Bij alle behandelingen zijn de extractieschalen na 3 en 7 dagen afgegoten en zijn de aaltjes geteld. Bij het onderdeel knippen en mixen gedurende 5 seconden zijn de extracties tot 35 dagen voortgezet om na te gaan hoelang er aaltjes uit de wortels te voorschijn komen en hoeveel.

Tabel 8 - Invloed van de **mixertijd** op de extractie-efficiëntie (n=5).

Extractiemethode	Monstergrootte (g)		Mixertijd (sec)	Extractietijd (dagen)
	<i>M. hapla</i>	<i>P. pen.</i>		
Mixer/wattenfilter	12	12	5	3, 7, 14, 21, 28 en 35
Mixer/wattenfilter	12	12	10	3 en 7
Mixer/wattenfilter	12	12	20	3 en 7
Mixer/wattenfilter	12	12	40	3 en 7
Knippen/wattenfilter	12	12	n.v.t.	3, 7, 14, 21, 28 en 35

3.2.4 Mixertoerental

Bij de mixer/wattenfiltermethode kan ook het toerental een grote rol spelen op de efficiëntie waarmee de aaltjes uit de wortels worden geëxtraheerd. In de proeven die in vijfvoud zijn uitgevoerd, is dit voor beide soorten wortelaaltjes (*M. hapla* en *P. penetrans*) nagegaan bij toerentalen van 10.700 en 16.000 t/minuut. Bij het laagste toerental is een mixertijd aangehouden van 5 seconden, terwijl bij het hoogste toerental mixertijden van 5 tot 20 seconden zijn gebruikt (Tabel 9). De knippen/wattenfiltermethode is als referentie in het onderzoek opgenomen. Het onderzoek met *M. hapla* zoals aangegeven in Tabel 9, is voorafgegaan door een proef met beide toerentalen, maar met slechts één mixertijd, namelijk 5 seconden. Bij de bespreking van de resultaten is de proef met één mixertijd aangeduid met proef 1 en de proef met verschillende mixertijden met proef 2.

Tabel 9 - Invloed van het **toerental** op de extractie-efficiëntie (n=5).

Extractiemethode	Monstergrootte (g)		Toerental (t/min.)	Mixertijd (sec)	Extractietijd (dagen)
	<i>M. hapla</i>	<i>P. pen.</i>			
Mixer/wattenfilter	15	13	10.700	5	3 en 7
Mixer/wattenfilter	15	13	16.000	5	3 en 7
Mixer/wattenfilter	15	13	16.000	10	3 en 7
Mixer/wattenfilter	15	- ¹⁾	16.000	20	3 en 7
Knippen/wattenfilter	15	13	n.v.t.	n.v.t.	3 en 7

¹⁾ Niet in de proef opgenomen.

• **Statistische toetsing**

De resultaten zijn statistisch verwerkt door middel van de variantie-analyse (ANOVA) en met de student *t*-toets op significantie beoordeeld ($P \leq 0,05$). Om de grote variaties in de aantallen aaltjes te verkleinen, zijn deze aantallen voorafgaand aan de statistische verwerking getransformeerd naar \log_{10} (aantal).

3.3 Resultaten en discussie

De resultaten betreffende de verschillende extractiemethoden en de omstandigheden waaronder deze zijn uitgevoerd, zijn voor de overzichtelijkheid voor beide soorten wortelaaltjes, *M. hapla* en *P. penetrans*, apart behandeld.

3.3.1 Wortelknobbelaaltjes

3.3.1.1 Vergelijking extractiemethoden (PD)

Door de PD zijn op twee verschillende tijdstippen proeven uitgevoerd ter vergelijking van de efficiëntie van vier extractiemethoden ten aanzien van de extractie van *M. hapla* (PD-proef 1) en *P. penetrans* (PD-proef 2) uit rozenwortels. Uit de resultaten van de tweede proef bleek dat de wortels niet alleen door *P. penetrans* waren aangetast, maar ook door *M. hapla*. Derhalve zijn in deze paragraaf de resultaten betreffende het wortelknobbelaaltje van beide PD-proeven opgenomen. Na een uitgebreide bespreking van de resultaten van PD-proef 1, komen de resultaten van PD-proef 2 in beknoptere vorm aan de orde. Daarbij is met name ingegaan in hoeverre beide proeven van elkaar afwijken wat betreft de extractie-efficiëntie ten aanzien van de vier extractiemethoden.

• **PD-proef 1**

Tabel 10 laat voor de extractiemethoden knippen/wattenfilter, mixer/wattenfilter en mistkamer zien hoeveel J2 van *M. hapla* er cumulatief na extractietijden van 2, 3, 7 en 14 dagen uit de wortelmonsters zijn geëxtraheerd. In tegenstelling hiermee kent de centrifugemethode geen verschillende extractietijden, omdat daarbij alle eitjes en J2 in een keer uit de wortels zijn geëxtraheerd. Hoewel er verschillende gewichtshoeveelheden aan wortels zijn geruikt, zijn bij alle extractiemethoden alle aantallen omgerekend naar 10 g wortels. Dit

maakt een goede vergelijking tussen de extractiemethoden mogelijk. Om dezelfde reden zijn bij de centrifugemethode onder alle extractietijden dezelfde aantallen vermeld.

Uit Tabel 10 blijkt dat de centrifugemethode veruit de meest efficiënte extractiemethode is wanneer het aantal J2 en eitjes bij elkaar worden opgeteld. Wanneer alleen wordt gekeken naar het aantal geëxtraheerde J2 dan is de centrifugemethode ten opzichte van beide wattenfiltermethoden alleen significant beter bij extractietijden van twee en drie dagen. Dat de centrifugemethode vanaf zeven dagen niet meer significant hoger scoorde houdt verband met het feit dat er bij de wattenfiltermethoden voortdurend eitjes uitkomen waarvan de J2 via de wattenfilters in de suspensie terecht komen. Zodoende nam het aantal J2 gaandeweg toe. Onderling deden beide wattenfiltermethoden, die het meest door de onderzoekslaboratoria worden gebruikt, niet voor elkaar onder. De mistkamer, die veel overeenkomst vertoont met de knippen/wattenfiltermethode, was in deze proef het minst efficiënt.

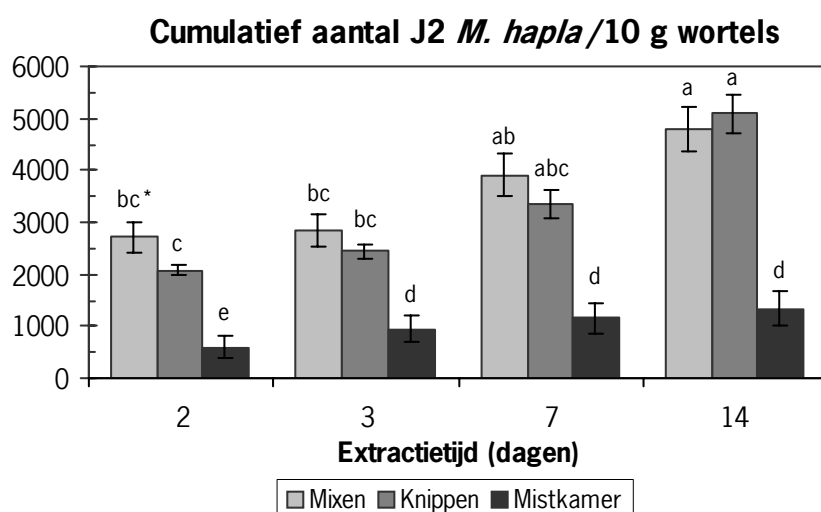
Tabel 10 - **PD-proef 1.** Extractie-efficiëntie van vier methoden voor het extraheren van met rozenwortels aangetast door *M. hapla* in relatie tot de extractietijd (n=5).

Extractiemethode	Aaltjes-stadium	Cumulatief aantal <i>M. hapla</i> /10 g wortels (relatief t.o.v. dag 2)			
		Extractietijd: 2	3	7	14 dagen
Knippen/wattenfilter	J2	2.078 c ²⁾ (100)	2.436 c (117)	3.340 b (161)	5.086 b (245)
Mixer/wattenfilter ¹⁾	J2	2.709 c (100)	2.855 c (105)	3.913 b (144)	4.783 b (177)
Mistkamer	J2	600 d (100)	949 d (158)	1.161 c (194)	1.336 c (223)
Centrifuge	J2	7.166 b	7.166 b	7.166 b	7.166 b
	ei	23.002 a	23.002 a	23.002 a	23.002 a

¹⁾ Toerental: 12.000 toeren/ minuut; mixertijd: 5 seconden.

²⁾ Gemiddelden in een kolom gevolgd door verschillende letters zijn significant verschillend ($P \leq 0,05$).

In Figuur 4 is te zien of de extractietijd een significante invloed heeft gehad op het aantal geëxtraheerde aaltjes. Hieruit blijkt dat een langere extractietijd niet altijd resulteerde in significant meer J2. Zo leverden bij beide wattenfiltermethoden de extractietijden van 2, 3 en 7 dagen geen significante toename op, maar waren alleen de aantallen J2 na 14 dagen significant hoger dan na twee en drie dagen extractie. In de mistkamer deden de extractietijden van 3, 7 en 14 dagen niet voor elkaar onder, maar leverden wel significant meer J2 op dan na 2 dagen. Opvallend is dat de knippen/wattenfiltermethode na 14 dagen de mixer/wattenfiltermethode voorbij is gestreefd, hoewel niet significant.



Figuur 4 - **PD-proef 1.** Extractie-efficiëntie (gemiddelden en standaardafwijkingen) van drie methoden voor het extraheren van rozenwortels met *M. hapla* in relatie tot de extractietijd (n=5).

* Gemiddelden gevolgd door verschillende letters zijn significant verschillend ($P \leq 0,05$).

• **PD-proef 2**

Uit Tabel 11 blijkt dat evenals in PD-proef 1 de knippen- en mixer/wattenfiltermethoden niet voor elkaar onderdeden. Bij alle extractietijden werd dezelfde extractie-efficiëntie verkregen. De mistkamer heeft nu wel beter gepresteerd dan in proef 1 en was daarmee even efficiënt als beide wattenfiltermethoden wat in proef 1 niet het geval was. Mogelijk kwam nu de temperatuur in de mistkamer meer overeen met de temperatuur die bij de wattenfiltermethoden is gerealiseerd.

De centrifugemethode heeft nu minder goed gepresteerd ten opzichte van de andere drie methoden dan in proef 1. Dit geldt met name voor het aantal J2, dat nu niet onderdeed voor beide wattenfiltermethoden, terwijl dit aantal in proef 1 bij de extractietijden van 2 en 3 dagen significant hoger was. Waarom de centrifugemethode nu relatief gezien minder J2 heeft opgeleverd dan de wattenfiltermethoden kan mogelijk te maken hebben met het tijdstip waarop de centrifugemonsters zijn geteld. Omdat deze monsters eitjes bevatten, kan het aantal J2 met de tijd zijn toegenomen ten nadele van het aantal eitjes. Verhoudingsgewijs bevatten de centrifugemonsters in proef 2 zes keer minder J2 dan eitjes, terwijl dit in proef 1 ruim drie keer minder was. Mogelijk zijn de monsters in proef 2 op een eerder tijdstip na het centrifugeren geteld dan de monsters in proef 1.

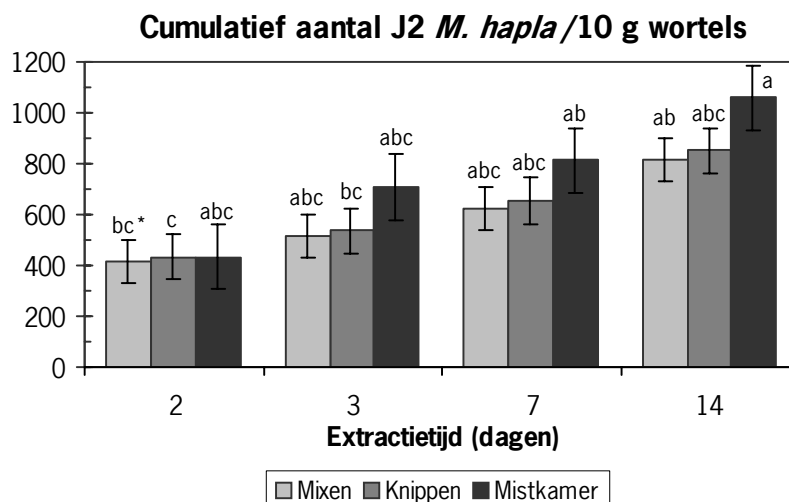
Tabel 11 - **PD-proef 2**. Extractie-efficiëntie van vier methoden voor het extraheren van rozenwortels aangetast door *M. hapla* in relatie tot de extractietijd (n=5).

Extractiemethode	Aaltjes-stadium	Cumulatief aantal <i>M. hapla</i> /10 g wortels (relatief t.o.v. dag 2)			
		Extractietijd: 2	3	7	14 dagen
Knippen/wattenfilter	J2	433 b ²⁾ (100)	537 bc (124)	655 bc (151)	850 b (196)
Mixer/wattenfilter ¹⁾	J2	417 b (100)	518 bc (124)	625 bc (125)	816 ab (195)
Mistkamer	J2	434 b (100)	709 ab (163)	813 ab (187)	1.059 ab (244)
Centrifuge	J2	285 b	285 c	285 c	285 c
	ei	1.888 a	1.888 a	1.888 a	1.888 a

¹⁾Toerental: 12.000 toeren/minuut; mixertijd: 5 seconden.

²⁾Gemiddelden in een kolom gevolgd door verschillende letters zijn significant verschillend ($P \leq 0,05$).

Worden per extractiemethode de aantallen geëxtraheerde J2 in de tijd met elkaar vergeleken dan blijkt uit Figuur 5 dat deze aantallen bij alle drie de extractiemethoden toenamen. Maar bij geen van de extractiemethoden waren de toenames significant wat in proef 1 wel het geval was. Dat de toenames in proef 2 niet significant waren, zou te maken kunnen hebben met het feit dat de wortels in proef 2 in veel geringere mate waren aangetast door *M. hapla* dan in proef 1.

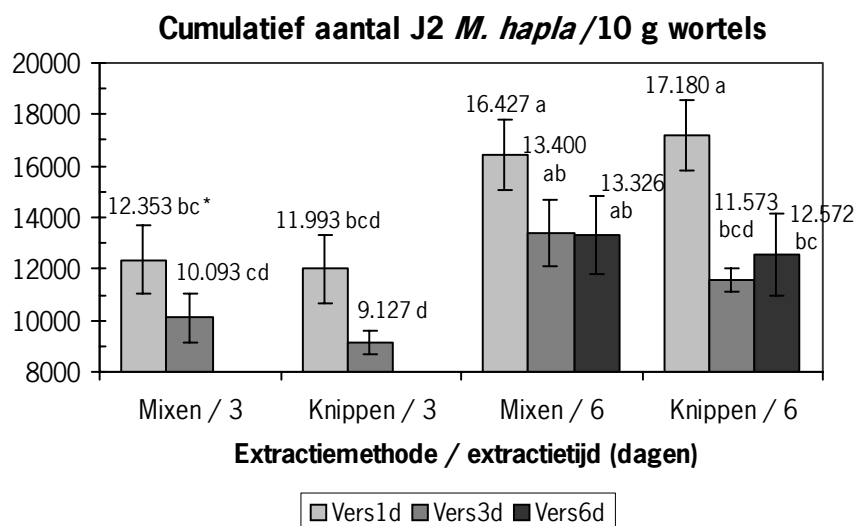


Figuur 5 - **PD-proef 2**. Extractie-efficiëntie (gemiddelden en standaardafwijkingen) van drie methoden voor het extraheren van rozenwortels met *M. hapla* in relatie tot de extractietijd (n=5).

* Gemiddelden gevolgd door verschillende letters zijn significant verschillend ($P \leq 0,05$).

3.3.1.2 Verversen water

Uit Figuur 6 blijkt dat het dagelijks verversen van het water in de extractieschalen een gunstige invloed heeft op het aantal geëxtraheerde wortelknobbelaaltjes. Maar alleen bij een totale extractietijd van zes dagen leverde dit significant meer aaltjes op, en dan alleen nog maar bij de knippen/wattenfiltermethode. Bij deze methode resulteerde het verversen na drie en zes dagen in respectievelijk 33% en 27% minder J2 dan het dagelijks verversen. Onderling maakte het verversen na drie en zes dagen geen verschil uit. Ook in deze proef waren de mixer- en knippen/wattenfiltermethoden even efficiënt met betrekking tot het aantal J2 dat uit de wortels is geëxtraheerd.



Figuur 6 - Extractie-efficiëntie (gemiddelden en standaardafwijkingen) van de mixer- en knippen/wattenfiltermethoden in relatie tot het verversen van het water in de extractieschalen en de extractietijd (n=5).

* Gemiddelden gevolgd door verschillende letters zijn significant verschillend ($P \leq 0,05$).

In de 'ververs'-proef, die ten behoeve van *P. penetrans* is uitgevoerd, waren de wortels ook aangetast door *M. hapla*. De resultaten van die proef kwamen ten aanzien van het verversen van het water in de extractieschalen wat betreft *M. hapla* statistisch gezien geheel overeen met de hierboven genoemde resultaten en worden daarom hier niet verder besproken.

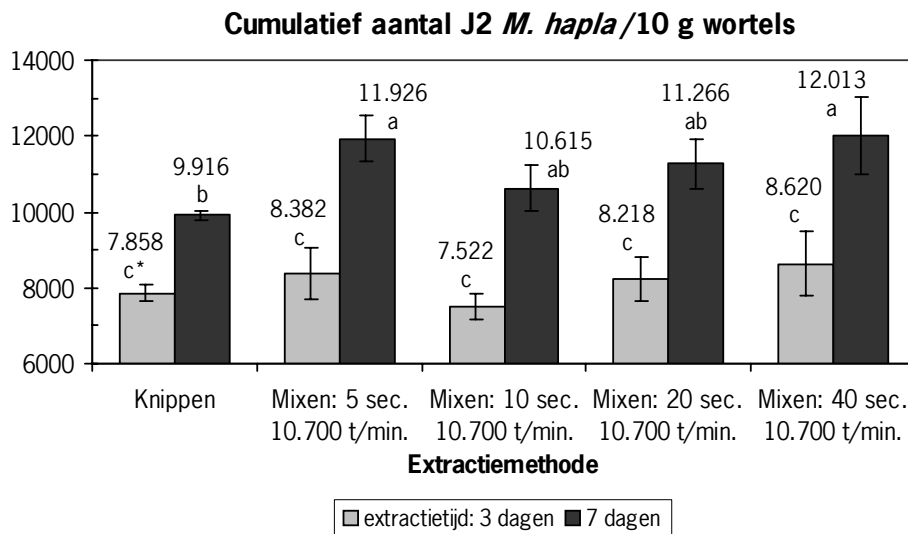
3.3.1.3 Mixertijd

• *mixen*

Uit Figuur 7 blijkt dat bij beide extractietijden (3 en 7 dagen) de mixertijden van 5 tot 40 seconden bij een toerental van 10.700 toeren/ minuut niet verschillend van invloed zijn geweest op de extractie-efficiëntie. Bij het extraheren van wortelknobbelaaltjes uit wortels door middel van de wattenfiltermethoden gaat om het extraheren van J2. Deze komen niet als J2 uit de wortels, maar komen tijdens het extraheren uit de eitjes. Omdat de mixertijd niet van invloed was op het aantal geëxtraheerde J2 betekent dit dat het mixen bij 10.700 toeren/ minuut gedurende 5 tot 40 sec geen negatieve invloed heeft gehad op de vitaliteit van de eitjes. Bij beide wattenfiltermethoden nam het aantal geëxtraheerde aaltjes significant toe met de tijd.

• *knippen versus mixen*

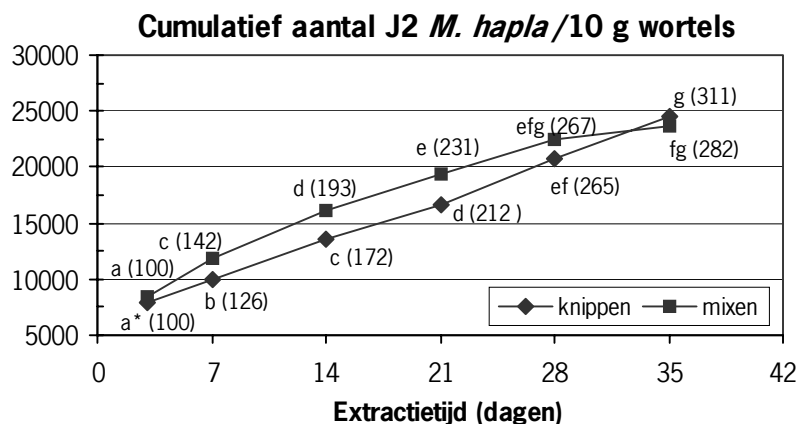
Omdat bij beide extractietijden de vier mixertijden onderling geen significant verschillende aantallen J2 hebben laten zien, zijn de aantallen per extractietijd samengevoegd en gemiddeld. Dit resulteerde voor de extractietijden van 3 en 7 dagen in respectievelijk 8.186 en 11.455 J2 per 10 g wortels. Worden deze aantallen vergeleken met die welke de knippen/wattenfiltermethode heeft opgeleverd, dan was het mixen na drie dagen even efficiënt als het knippen en na zeven dagen significant efficiënter.



Figuur 7 - Extractie-efficiëntie (gemiddelden en standaardafwijking) van het wortelknobbelaaltje *M. hapla* uit rozenwortels door middel van de mixer/wattenfiltermethode bij een toerental van 10.700 t/min. in relatie tot de mixertijd (5-40 sec.) en extractietijd (3 en 7 dagen). Knippen/wattenfiltermethode als referentie (n=5).
* Gemiddelden gevolgd door verschillende letters zijn significant verschillend ($P \leq 0,05$).

• *extractietijd tot 35 dagen*

Bij beide wattenfiltermethoden (mixertijd: 5 sec.) zijn de extracties tot 35 dagen aangehouden om na te gaan hoeveel J2 er gedurende die tijd nog uit de eitjes zouden komen en hoe het verloop zou zijn. Uit figuur 8 blijkt dat er bij beide methoden gedurende lange tijd J2 kunnen worden geëxtraheerd. Ten opzichte van het aantal geëxtraheerde J2 na drie dagen was dit aantal na 35 dagen bij beide methoden ongeveer verdrievoudigd. Bij beide methoden liep het aantal J2 tot 28 dagen vrijwel gelijk op met iets meer J2 bij het mixen dan bij het knippen. Maar alleen na 7, 14 en 21 dagen waren de cumulatieve aantallen J2 significant verschillend ten opzichte van elkaar. In de laatste week nam bij het mixen het aantal J2 iets af, terwijl dit aantal bij het knippen op hetzelfde niveau bleef door stijgen. Dit resulteerde erin dat na 35 dagen het cumulatieve aantal J2 bij de knippen/wattenfiltermethode voor het eerst iets voor lag op dat van de mixer/wattenfiltermethode. Bij de extracties tot 35 dagen volgden de cumulatieve aantallen geëxtraheerde aaltjes bij beide extractiemethoden lineaire lijnen. Bij de mixer/wattenfiltermethode betrof het de lijn $y = 476,95x + 8405,4$ ($R^2 = 0,9621$) en bij de knippen/wattenfiltermethode de lijn $y = 517,13x + 6227,7$ ($R^2 = 0,9989$).

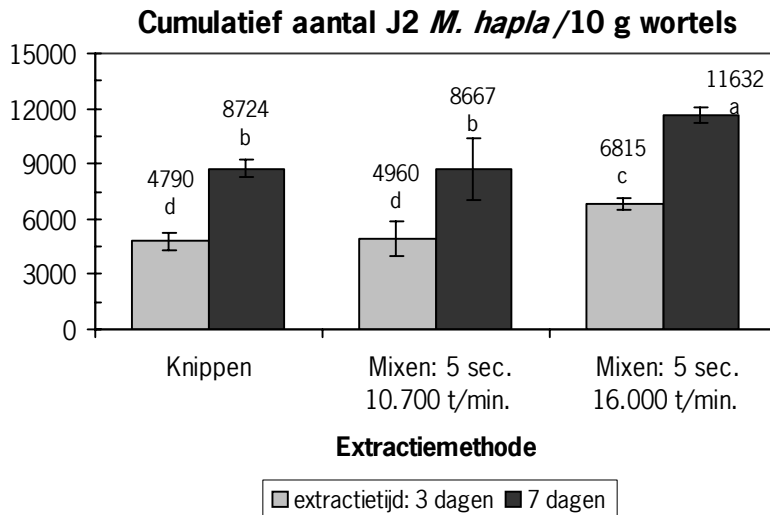


Figuur 8 - Cumulatief verloop van het aantal geëxtraheerde J2 van *M. hapla* in relatie tot de knippen- en mixer/wattenfiltermethode (10.700 t/min.; 5 sec.).
* Absolute aantallen zijn significant verschillend als ze worden gevolgd door verschillende letters ($P \leq 0,05$).
Getallen tussen haakjes zijn relatief ten opzichte van een extractietijd van 3 dagen.

3.3.1.4 Toerental

• proef 1

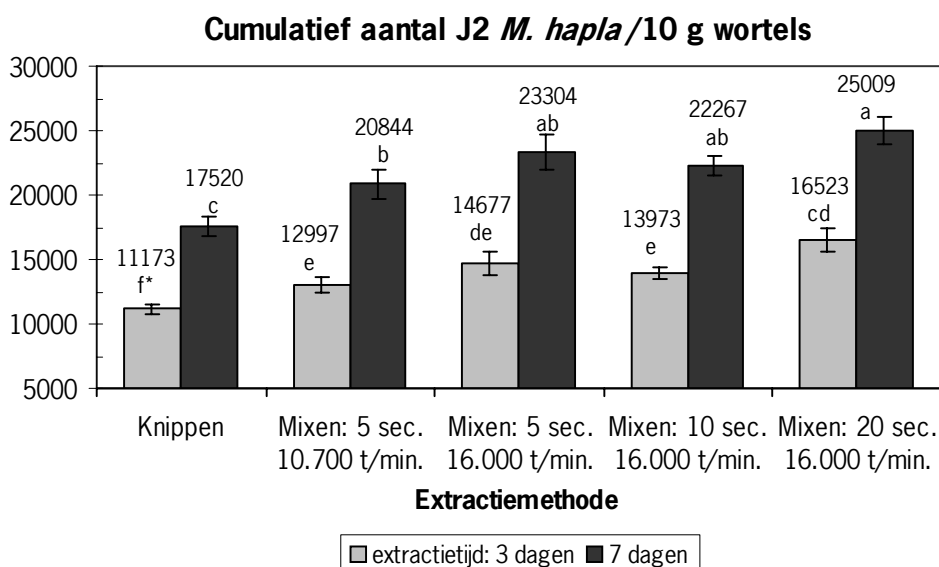
Uit Figuur 9 blijkt dat het hoogste toerental (16.000 t/min.) tot significant meer geëxtraheerde wortelknobbelaaltjes heeft geleid dan het laagste toerental (10.700 t/min.). Dit was het geval na een extractietijd van zowel drie als zeven dagen. De knippen/wattenfiltermethode was ten opzichte van het laagste toerental even efficiënt, maar ten opzichte van het hoogste toerental bij beide extractietijden significant minder efficiënt. Nu doet zich de vraag voor wat de extractie-efficiëntie is van langere mixertijden dan 5 seconden bij een toerental van 16.000 t/minuut? Dit is in proef 2 onderzocht.



Figuur 9 - **Proef 1.** Extractie-efficiëntie (gemiddelden en standaardafwijkingen) van het wortelknobbelaaltje *M. hapla* uit wortels door middel van de mixer/wattenfiltermethode in relatie tot het toerental. Extractietijden: 3 en 7 dagen. Knippen als referentie (n=5).
* Gemiddelden gevolgd door verschillende letters zijn significant verschillend ($P \leq 0,05$).

• proef 2

Uit de resultaten van de tweede proef blijkt dat de mixertijden van 5 tot 20 seconden bij een toerental van 16.000 t/minuut geen significant verschillende invloed heeft gehad op het aantal geëxtraheerde *M. hapla* (Figuur 10). Vergelijking van de efficiëntie van beide toerentalen bij een mixertijd van 5 seconden leverde in deze proef geen significante verschillen op, terwijl dat in de eerste proef wel het geval was. In de tweede proef was mixen gedurende 5 seconden met een toerental van 10.700 t/minuut alleen minder efficiënt ten opzichte van 20 seconden en 16.000 t/minuut. Dit geldt voor beide extractietijden. Worden alle resultaten die verkregen zijn bij een toerental van 16.000 t/minuut gemiddeld, dan levert dit voor de extractietijden van 3 en 7 dagen gemiddelde cumulatieve aantallen *M. hapla* op van respectievelijk 15.058 en 23527 per 10 g wortels. Deze aantallen zijn significant hoger ten opzichte van de aantallen die verkregen zijn bij het mixen met een toerental van 10.700 t/minuut gedurende 5 seconden.



Figuur 10 - **Proef 2.** Extractie-efficiëntie (gemiddelden en standaardafwijkingen) van het wortelknob-belaaltje *M. hapla* uit wortels door middel van de mixer/wattenfiltermethode in relatie tot het toerental en de mixertijd. Extractietijden: 3 en 7 dagen. Knippen als referentie (n=5).
* Gemiddelden gevolgd door verschillende letters zijn significant verschillend ($P \leq 0,05$).

3.3.2 Wortellesieaaltjes

3.3.2.1 Vergelijking extractiemethoden (PD)

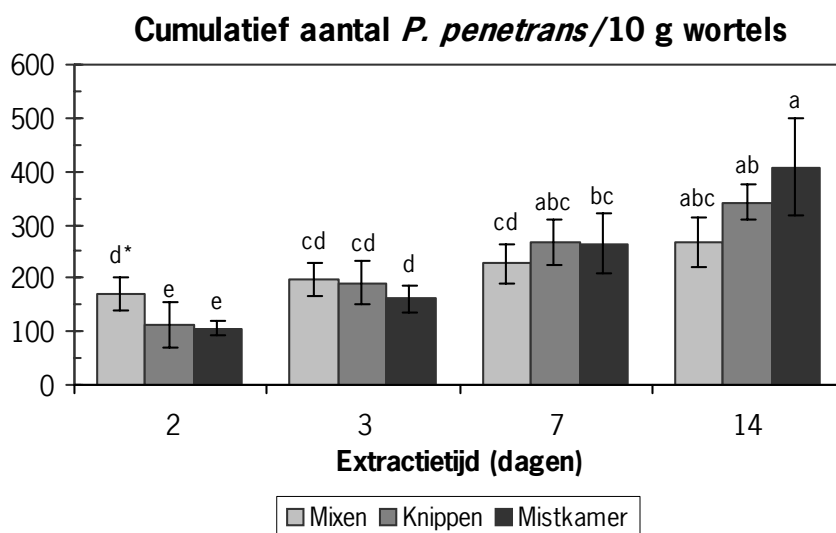
In Tabel 12 staan voor de extractiemethoden knippen/wattenfilter, mixer/wattenfilter en mistkamer de cumulatieve aantallen *P. penetrans* (J2 - volwassen stadia) die na 2, 3, 7 en 14 dagen uit de wortelmonsters zijn geëxtraheerd. In tegenstelling hiermee kent de centrifugemethode geen verschillende extractietijden, omdat daarbij alle eitjes en aalvormige stadia in een keer uit de wortels zijn geëxtraheerd. Hoewel er verschillende gewichtshoeveelheden aan wortels zijn geëxtraheerd, zijn bij alle extractiemethoden alle aantallen omgerekend naar 10 g wortels. Dit maakt een goede vergelijking tussen de extractiemethoden mogelijk. Om dezelfde reden zijn bij de centrifugemethode onder alle extractietijden dezelfde aantallen vermeld. Tabel 12 laat zien dat de centrifugemethode de meest efficiënte extractiemethode is, althans wanneer het aantal J2 en eitjes bij elkaar wordt opgeteld. Wordt alleen gekeken naar het aantal geëxtraheerde aalvormige stadia J2 - ♀, ♂ dan is de centrifugemethode alleen significant beter bij extractietijden van twee en drie dagen. Dat de centrifugemethode vanaf zeven dagen niet meer significant hoger scoorde dan beide wattenfiltermethoden houdt verband met het feit dat er bij de wattenfiltermethoden voortdurend eitjes uitkomen waarvan de J2 via de wattenfilters in de suspensie terecht komen en het aantal J2 zodoende gaandeweg toeneemt.

Tabel 12 - **PD-proef 2.** Extractie-efficiëntie van vier methoden voor het extraheren van rozenwortels aangetast door *P. penetrans* in relatie tot de extractietijd (n=5).

Extractiemethode	Aaltjes-Stadium	Cumulatief aantal <i>P. penetrans</i> 10 g wortels (relatief t.o.v. dag 2)			
		Extractietijd: 2	3	7	14 dagen
Knippen/wattenfilter	J2 - ♀, ♂	113 c ¹⁾ (100)	191 b (169)	267 bc (236)	342 ab (302)
Mixer/wattenfilter	J2 - ♀, ♂	171 b (100)	197 b (115)	227 c (133)	267 b (156)
Mistkamer	J2 - ♀, ♂	106 c (100)	162 b (153)	265 bc (249)	408 ab (384)
Centrifuge	J2 - ♀, ♂	380 a	380 a	380 ab	380 ab
	ei	524 a	524 a	524 a	524 a

¹⁾ Gemiddelden in een kolom gevolgd door verschillende letters zijn significant verschillend ($P \leq 0,05$).

Worden beide wattenfiltermethoden met elkaar vergeleken dan blijkt dat na twee dagen het aantal geëxtraheerde aaltjes bij het knippen significant lager is dan bij het mixen. Maar vanaf drie dagen zijn beide methoden niet meer significant verschillend. Bij het knippen van de wortels in stukjes van ca. 0,5 cm komen de aaltjes aanvankelijk dus minder goed vrij dan na het mixen van de wortels. Later wordt dit weer ingehaald. Dit fenomeen deed zich niet voor bij *M. hapla*. Daarbij was het knippen steeds even efficiënt als het mixen (Tabel 10 en 11). Dit verschil tussen *P. penetrans* en *M. hapla* kan als volgt worden verklaard. Bij *P. penetrans* moeten de aaltjes uit de wortels kruipen, terwijl het bij *M. hapla* gaat om het uit de eitjes komen van J2 waarbij de eitjes zich voornamelijk aan de buitenzijde van de rozenwortels bevinden. De mistkamer liet hetzelfde beeld zien als het knippen.



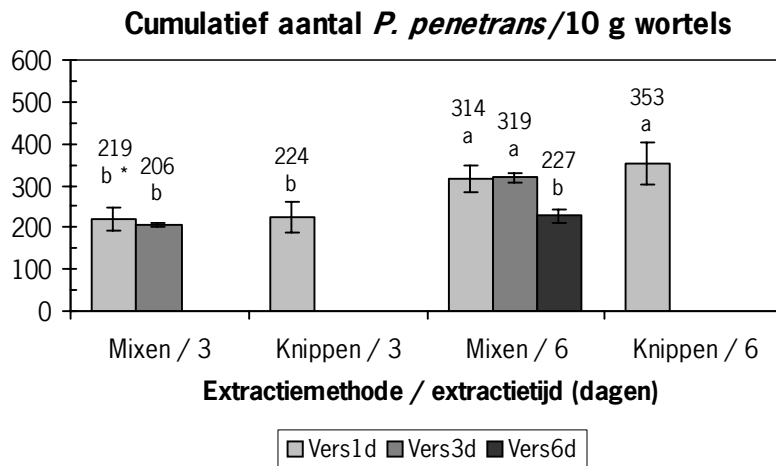
Figuur 11 - **PD-proef 2.** Extractie-efficiëntie (gemiddelden en standaardafwijkingen) van drie methoden voor het extraheren van rozenwortels met *M. hapla* in relatie tot de extractietijd (n=5).

* Gemiddelden gevolgd door verschillende letters zijn significant verschillend ($P \leq 0,05$).

Figuur 11 toont het verloop van het aantal geëxtraheerde aaltjes over een periode van twee tot veertien dagen. Hieruit blijkt dat de extractietijd van invloed is op het aantal aaltjes dat uit de wortels is geëxtraheerd. Een langere extractietijd resulteerde in meer aaltjes, maar dit was niet altijd significant hoger. De extractietijd was het meest van invloed bij de mistkamer methode en het minst bij de mixer/wattenfiltermethode. Bij de mistkamer methode leverde elke extractietijd significant meer aaltjes op dan de voorgaande extractietijd. Bij de mixer/wattenfiltermethode waren alleen dag 2 en dag 14 significant verschillend ten opzichte van elkaar, terwijl de eerste drie extractietijden niet voor elkaar onderdeden. Bij de knippen/wattenfiltermethode leverde drie dagen extractie significant meer aaltjes op dan twee dagen extractie. Wat verder opviel was dat vanaf dag 7 het aantal geëxtraheerde aaltjes bij de mixer/wattenfiltermethode werd ingehaald door de knippen/wattenfiltermethode en de mistkamer methode. Bij beide laatste methoden zijn de wortels geknipt. Op de lange duur is dit blijkbaar gunstiger dan het mixen.

3.3.2.2 Verversen water

Figuur 12 laat zien dat bij een extractietijd van drie dagen het dagelijks verversen van water in de extractieschalen niet tot een verhoging van het aantal geëxtraheerde wortellesieaaltjes heeft geleid. Dit is alleen voor de mixer/wattenfiltermethode onderzocht. Bij een extractieduur van zes dagen is het niet tussentijds verversen significant nadelig voor de extractie-efficiëntie. Hoewel bij de knippen/wattenfiltermethode geen verschillende ververs-strategieën zijn toegepast maar alleen dagelijks verversen, zijn de resultaten van deze methode wel in de grafiek opgenomen. Ter vergelijking met het dagelijks verversen bij de mixer/wattenfiltermethode blijkt dat beide methoden even efficiënt zijn geweest.



Figuur 12 - Extractie-efficiëntie (gemiddelden en standaardafwijkingen) van de mixer- en knippen/wattenfiltermethoden in relatie tot het verversen van het water in de extractieschalen en de extractietijd. Knippen als referentie (n=5).

* Gemiddelden gevolgd door verschillende letters zijn significant verschillend ($P \leq 0,05$).

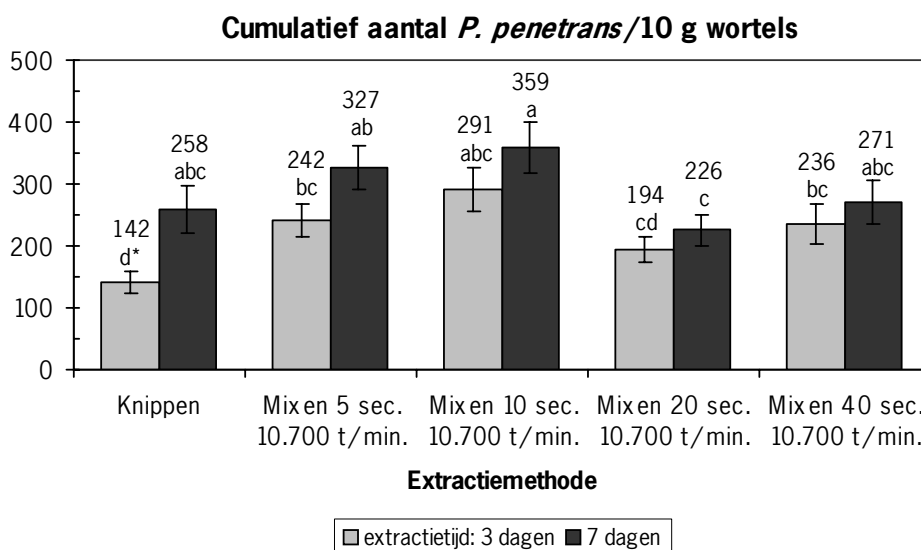
3.3.2.3 Mixertijden

• mixertijden

Uit Figuur 13 blijkt dat bij een toerental van 10.700 t/minuut de extractie-efficiëntie het hoogst was bij de twee kortste mixertijden (5 en 10 sec.). Langere mixertijden hebben de extractie-efficiëntie nadelig beïnvloed. Dit geldt met name voor de extractietijd van 7 dagen, waarbij de mixertijd van 20 seconden significant minder wortellessieaaltjes heeft opgeleverd dan de mixertijden van 5 en 10 seconden.

• knippen versus mixen

Figuur 13 toont dat het knippen met name bij de extractietijd van drie dagen minder efficiënt was dan het mixen gedurende 5 en 10 seconden. Dit komt doordat er bij het knippen nauwelijks wortels worden kapot gemaakt, waardoor de aaltjes een iets langere weg door de wortels moeten afleggen om er uit te voorschijn te komen. Na zeven dagen extractie was bij het knippen het aantal aaltjes nog wel lager dan bij het mixen gedurende 5 en 10 seconden, maar dit verschil was niet meer significant. Tevens was toen bij het knippen het aantal geëxtraheerde aaltjes even hoog als na drie extractiedagen bij het mixen.



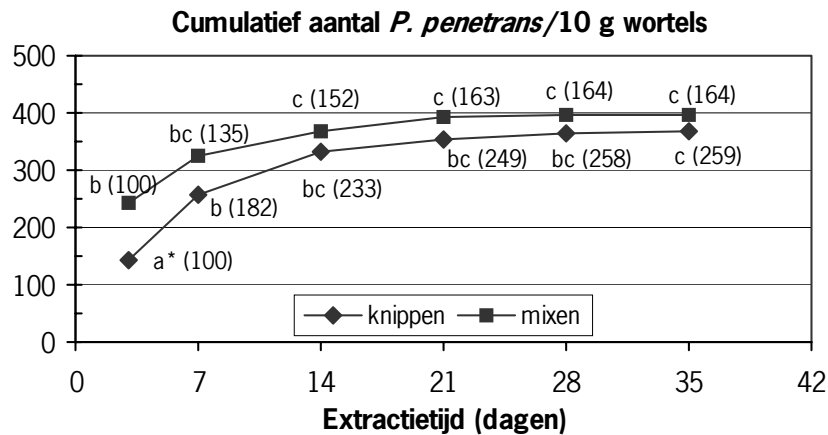
Figuur 13 - Extractie-efficiëntie (gemiddelden en standaardafwijking) van het wortellessieaaltje *P. penetrans* uit wortels door middel van de mixer/wattenfiltermethode bij een toerental van 10.700 t/min. in relatie tot de mixertijd (5-40 sec.) en extractietijd (3 en 7 dagen).

* Gemiddelden gevolgd door verschillende letters zijn significant verschillend ($P \leq 0,05$).

• *extractietijden tot 35 dagen*

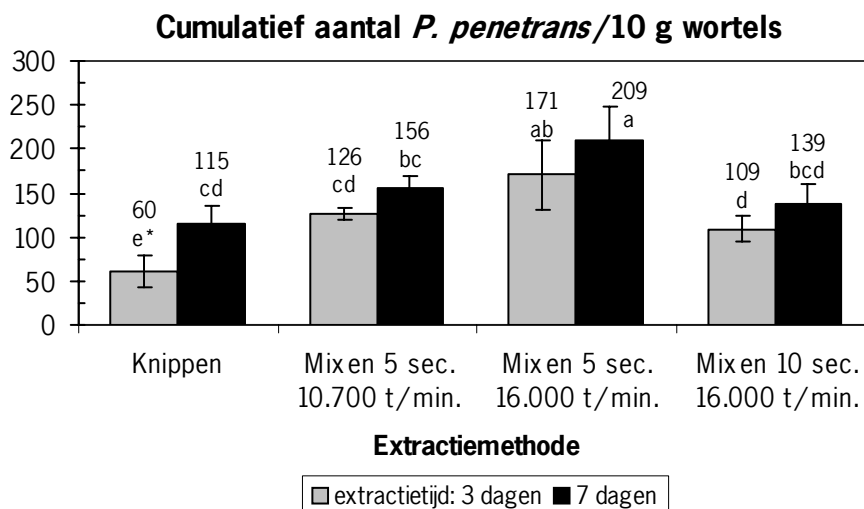
Figuur 14 laat zien dat het aantal geëxtraheerde wortellesieaaltjes bij het knippen gelijk oploopt met het mixen (10.700 t/min.; 5 sec.), zij het op een iets lager niveau en dat er na 28 dagen bij beide wattenfiltermethoden nog nauwelijks wortellesieaaltjes uit de wortels te voorschijn kwamen. Vanaf veertien dagen nam het aantal aaltjes niet meer significant toe.

Bij extractietijden tot 35 dagen volgden de cumulatieve aantallen geëxtraheerde aaltjes bij beide extractiemethoden een logaritmische lijn. Bij de mixer/wattenfiltermethode betrof het de lijn $y = 64,325\ln(x) + 186,95$ ($R^2 = 0,9461$) en bij de knippen/wattenfiltermethode de lijn $y = 92,89\ln(x) + 61,05$ ($R^2 = 0,9498$).



Figuur 14 - Cumulatief verloop van het aantal geëxtraheerde wortellesieaaltjes *P. penetrans* in relatie tot de knippen- en mixer/wattenfiltermethoden (10.700 t/min.; 5 sec.).
* Absolute aantallen zijn significant verschillend als ze worden gevolgd door verschillende letters ($P \leq 0,05$).
Getallen tussen haakjes zijn relatief ten opzichte van een extractietijd van 3 dagen.

3.3.2.4 Toerental



Figuur 15 - Extractie-efficiëntie (gemiddelden en standaardafwijkingen) van het wortellesieaaltje *P. penetrans* uit rozenwortels door middel van de mixer/wattenfiltermethode in relatie tot het toerental (10.700 en 16.000 t/min.), mixertijd (5 en 10 sec.) en extractietijd (3 en 7 dagen). Knippen als referentie ($n=5$).

* Gemiddelden gevolgd door verschillende letters zijn significant verschillend ($P \leq 0,05$).

Uit Figuur 15 blijkt dat het mixen van rozenwortels bij een hoger toerental (16.000 t/min.) gedurende 5 seconden een significant gunstige invloed heeft op de extractie-efficiëntie ten aanzien van *P. penetrans*. Bij een mixertijd van 10 seconden neemt de efficiëntie weer significant af en is daarmee gelijk aan die van 5 seconden bij het laagste toerental. De knippen/wattenfiltermethode is ten opzichte van de meest efficiënte mixer/wattenfilter-methode (5 sec.; 16.000 t/min.) bij beide extractietijden minder efficiënt.

3.4 Algehele discussie en conclusies

Meloidogyne hapla

- a. Extractie-efficiëntie uit wortels: centrifugemethode > mixer/wattenfiltermethode > knippen/wattenfiltermethode ≥ mistkamer.
- b. Dagelijks water verversen in extractieschalen verhoogt de extractie-efficiëntie.
- c. Mixertijd is niet van invloed op de extractie-efficiëntie.
- d. Extractie-efficiëntie toerental: 16.000 t/minuut > 10.700 t/minuut.
- e. Sterke toename aantal aaltjes bij langere extractietijden.

Pratylenchus penetrans

- f. Extractie-efficiëntie uit wortels: centrifugemethode > mixer/wattenfiltermethode > knippen/wattenfiltermethode = mistkamer.
- g. Dagelijks water verversen in extractieschalen verhoogt de extractie-efficiëntie alleen bij extractietijden langer dan 3 dagen.
- h. Mixertijd is van invloed op de extractie-efficiëntie: korter is beter dan langer.
- i. Extractie-efficiëntie toerental: 16.000 t/minuut > 10.700 t/minuut.
- j. Redelijke toename aantal aaltjes bij langere extractietijden.

ad. a en f. Van de vier onderzochte extractiemethoden (centrifuge, knippen- en mixer/wattenfiltermethode en mistkamer) is de centrifugemethode voor zowel wortelknobbelaaltjes als wortellesieaaltjes de meest efficiënte methode. Behalve de aanzienlijk hogere extractie-efficiëntie heeft de centrifugemethode ook het voordeel dat daarmee binnen een uur de uitslag bekend kan zijn. Dit in tegenstelling tot de andere drie methoden waarbij in dagen of zelfs weken moet worden gerekend. Ten opzichte van beide wattenfiltermethoden en de mistkamer heeft de centrifugemethode echter ook een nadeel. Dit heeft betrekking op het feit dat de centrifugemethode geen informatie geeft over de levensvatbaarheid van de aaltjes, iets wat de wattenfiltermethoden en mistkamer wel doen. Immers ook niet levensvatbare eitjes en dode aaltjes worden door de centrifugemethode geëxtraheerd.

De extractie-efficiëntie van de mixer/wattenfiltermethode is in het algemeen hoger dan van de knippen/wattenfiltermethode zeker wanneer een goed toerental en de daarbij behorende mixertijd worden toegepast. Dit houdt verband met het feit dat door het mixen het plantenweefsel wordt stukgeslagen. Daardoor worden de eitjes en aaltjes, die zich in het plantenweefsel bevinden, vrijgemaakt. De J2 die uit de eitjes komen en de vrijgemaakte aaltjes kunnen zodoende gemakkelijker in de suspensie terecht komen.

Wat betreft de extractie-efficiëntie van de mistkamer, die was in de eerste proef waarin de vier extractiemethoden met elkaar zijn vergeleken ten aanzien van het wortelknobbelaaltje *M. hapla*, het laagst. Dit is opvallend omdat deze extractiemethode sterk overeenkomt met de knippen/wattenfiltermethode. In beide gevallen worden de wortels geknipt en vervolgens geëxtraheerd. Het verschil tussen beide methoden is dat er in de mistkamer steeds vers, zuurstofrijk water van bovenaf over de wortels wordt verneveld. Op basis van het onderzoek naar het wel of niet verversen van het water in de extractieschalen zou het continu toedienen van vers water moeten resulteren in een hogere extractie-efficiëntie dan bij de knippen/wattenfiltermethode waarbij de extractieschalen eenmalig werden gevuld met water wat langzamerhand zuurstofarm wordt en allerlei wortellexudaten gaat bevatten wat nadelig kan zijn voor het extraheren. Dat de mistkamer na twee weken 74% minder J2 van *M. hapla* heeft opgeleverd dan de knippen/wattenfiltermethode zou verband kunnen houden met de temperatuur waarbij de extracties zijn uitgevoerd. De knippen/wattenfiltermethode is uitgevoerd bij een temperatuur van ca. 21°C, terwijl in de mistkamer water van 18°C is gebruikt. Dit is van invloed op de extractie-efficiëntie. Bird en Wallace (1966) hebben aangetoond dat er bij 18°C ca. 8% minder

eitjes uitkomen dan bij 21°C. Maar dit verklaart niet het verschil van 74% tussen beide extractiemethoden. In een latere fase is gecontroleerd of er in het water dat via de overloop in de mistkamer wegstroomt wortelknobbelaaltjes aanwezig zijn. Dat bleek niet het geval te zijn. In de tweede proef heeft de mistkamer wel dezelfde resultaten opgeleverd als beide wattenfiltermethoden.

ad. b en g. Het extraheren van het wortelknobbelaaltje *M. hapla* werd meer door het verversen van het water in de extractieschalen beïnvloed dan het extraheren van het wortellesieaaltje *P. penetrans*. Gedurende de eerste drie dagen had bij *P. penetrans* het verversen geen invloed, wat bij *M. hapla* wel het geval was. Werd er langer dan drie dagen geëxtraheerd, dan had ook bij *P. penetrans* het verversen een gunstige invloed, dat wil zeggen dat dit meer aaltjes opleverde. Dit heeft te maken met het feit dat zuurstofrijk water de aaltjes actiever houdt. Bovendien worden door het regelmatig verversen van water wortellexudaten afgevoerd. Wortellexudaten kunnen aaltjes immobiel maken en het uitkomen van eitjes bemoeilijken.

ad. c en h. Bij *M. hapla* hadden mixertijden van 5 tot 40 seconden bij een toerental van 10.700 t/minuut geen invloed op de extractie-efficiëntie. Ook de geteste mixertijden van 5 tot 20 seconden bij 16.000 t/minuut waren hierop niet van invloed. Bij *P. penetrans* hadden de mixertijden wel een effect. Mixertijden langer dan 10 seconden verlaagden de extractie-efficiëntie. Dit was het sterkst het geval bij het hoogste toerental van 16.000 t/minuut. Deze resultaten bevestigen de bevindingen van Stemerding (1964) die bij een toerental van 10.000 t/minuut en een mixertijd van 5 seconden na drie dagen extractie van rozenwortels 30% meer *P. penetrans* vond dan bij mixen gedurende 30 seconden. Tusseliggende tijden zijn helaas niet in zijn onderzoek meegenomen. Dat langere mixertijden bij *P. penetrans* een negatieve invloed hadden op de extractie-efficiëntie kan verklaard worden uit het feit dat er bij wortellesieaaltjes allerlei levende stadia uit de wortels moeten worden geëxtraheerd. In tegenstelling hiermee worden er bij wortelknobbelaaltjes uitsluitend J2 geëxtraheerd die tijdens het extractieproces uit de eitjes zijn gekomen. Eitjes zijn blijkbaar minder kwetsbaar voor het mixen van wortels dan de diverse levende stadia van wortellesieaaltjes, die tijdens het extraheren uit de wortels moeten kruipen. Stemerding (1964) constateerde dat vooral de volwassen wortellesieaaltjes beschadigd of gedood worden.

ad. d en i. Voor beide soorten aaltjes, *M. hapla* en *P. penetrans*, had verhoging van het toerental van 10.700 naar 16.000 t/min een gunstig effect op de extractie-efficiëntie. In dat geval wordt het plantenweefsel blijkbaar beter stukgeslagen waardoor er meer eitjes en aaltjes uit het weefsel worden bevrijd. Bij het mixen is de extractie-efficiëntie altijd gerelateerd aan de combinatie van toerental en tijd. Voor *M. hapla* geldt dat bij een toerental van 16.000 t/minuut mixertijden van 5 tot 20 seconden kunnen worden gebruikt, zonder dat de extractie-efficiëntie daarbij inboet. Maar wortels met *P. penetrans* mogen bij een toerental van 16.000 t/minuut niet langer dan 5 seconden worden gemixt.

ad. e en j. Gedurende de hele extractieperiode van 35 dagen kwamen er *M. hapla* en *P. penetrans* uit de wortels. Bij *M. hapla* bleef het aantal geëxtraheerde aaltjes bij beide wattenfiltermethoden de hele tijd sterk toenemen. De cumulatieve aantallen *M. hapla* volgden lineaire lijnen. In tegenstelling hiermee zwakte het aantal geëxtraheerde *P. penetrans* na zeven dagen sterk af. Voor beide wattenfiltermethoden resulteerde dit in logaritmische lijnen. Wat betreft *M. hapla* was het cumulatief aantal geëxtraheerde aaltjes bij de mixer/wattenfiltermethode tot 28 dagen steeds hoger dan bij de knippen/wattenfiltermethode. Daarna werd het door laatstgenoemde methode ingehaald. Dit kan komen doordat de vrouwtjes in de geknipte wortels in tegenstelling tot in de gemixte wortels heel blijven en zodoende nog enige tijd eitjes hebben kunnen produceren die alsnog zijn uitgekomen. Ook is bekend dat de embryonale ontwikkeling die in het ei plaatsvindt, door het mixen kan worden gehinderd. Hoewel vooral bij het wortelknobbelaaltje de extractie na 35 dagen nog niet ten einde is, is het niet altijd nodig om zolang te extraheren. Alleen als de totale besmetting met aaltjes moet worden bepaald, is dat nodig. *M. hapla* vereist dan een extractietijd van minstens vier weken, terwijl voor *P. penetrans* twee weken voldoende zijn. Gaat het echter alleen om het bepalen van verschillen tussen behandelingen, dan is voor beide soorten wortelaaltjes een extractietijd van hooguit drie dagen al voldoende. Bij extractietijden van enkele weken of langer biedt de centrifugemethode een ideale oplossing zeker wanneer de uitslag snel beschikbaar moet zijn.

3.5 Extractie-adviezen

Het doel van de extractie is mede bepalend voor de methode die wordt toegepast om aaltjes uit wortels te extraheren. Wanneer het er om gaat om de totale besmetting met aaltjes vast te stellen, dan heeft de cen-

trifugemethode de voorkeur boven beide wattenfiltermethoden en de mistkamer. De voorkeur voor de centrifugemethode heeft voornamelijk te maken met het feit dat hiermee de uitslag nog dezelfde dag bekend kan zijn, terwijl bij de andere drie methoden extractietijden van tenminste twee weken voor wortellesieaaltjes tot vier weken voor wortelknobbelaaltjes nodig zijn. Daarbij komt dat bij de wattenfiltermethoden het water in de extractieschalen regelmatig moet worden ververs, omdat dit de extractie-efficiëntie verhoogt. In dit verband kan het gewenst zijn een mistkamer te gebruiken waarin continu vers water over de wortels wordt verneveld. Is het doel van de extractie echter om verschillen tussen behandelingen vast te stellen, dan kunnen ook beide wattenfiltermethoden en de mistkamer goede diensten bewijzen. Immers voor het vaststellen van verschillen in behandelingseffecten is het niet nodig de totale aantallen aaltjes te bepalen. Met een extractietijd van hooguit drie dagen kan dan worden volstaan. Bij dergelijke korte extractietijden hoeft ook het water in de extractieschalen tussentijds niet persé te worden ververs, maar levert bij wortelknobbelaaltjes wel iets meer J2 op als dit wel een keer gebeurt.

Onderzoeklaboratoria die niet beschikken over een centrifuge en een mistkamer, zullen meestal een van beide wattenfiltermethoden gebruiken*. Moeten er, ongeacht de lengte van de extractieperiode, zoveel mogelijk aaltjes worden geëxtraheerd, dan is het raadzaam de mixer/wattenfiltermethode te gebruiken omdat de extractie-efficiëntie van deze methode over het algemeen iets hoger is dan van de knippen/wattenfiltermethode. Indien niet bekend is welke aaltjes in de wortels aanwezig zijn, dan wordt geadviseerd om een zodanig toerental en mixertijd te kiezen dat zowel wortelknobbelaaltjes als wortellesieaaltjes zo efficiënt mogelijk worden geëxtraheerd. Dat is het geval bij een toerental van 16.000 t/minuut in combinatie met een mixertijd van vijf seconden. Zijn de wortels alleen aangetast door wortelknobbelaaltjes, dan zijn bij dit toerental ook mixertijden tot 20 seconden mogelijk zonder dat daardoor de extractie-efficiëntie nadelig wordt beïnvloed.

De vier genoemde extractiemethoden voor wortels zijn uitgebreid beschreven in Bijlage 2.

* Voor het extraheren van wortelknobbelaaltjes kan ook de niet in dit project onderzochte chloormethode worden gebruikt.

Literatuur

AMSING, J.J. en C. ZIJLSTRA, 2003. Detectie van wortelaaltjes in water. *PPO Rapport 583*, 36 blz.

BIRD, A.F. and H.R. WALLACE, 1966. The influence of temperature on *Meloidogyne hapla* and *M. javanica*. *Nematologica 11*: 581-589.

STEMERDING, S., 1964. Een mixer-wattenfilter methode om vrijbewegende endoparasitaire nematoden uit wortels te verzamelen. *Verslag Plantenziektenkundige Dienst no. 141 (Jaarboek 1963)*: 170-175.

Bijlage 1 Extractieprotocol kokos

Erlenmeyer- of (melk)flessen-wattenfiltermethode

A. 100 ml-submonster nemen

- Uitzeven kokosmonster om grove delen en wortels, enz. te verwijderen (maaswijdte: 5 mm).
- Uitgezeefde monster opvangen op zeiltje (60x120 cm).
- Mengen monster door het zeiltje aan een hoek op te tillen zodat het substraat naar de tegenoverliggende hoek rolt.
- Herhaal dit nogmaals zeven keer vanuit verschillende hoeken.
- Vul een 400 ml-bekerglas met 100 ml water.
- Neem een submonster van 100 ml kokos door verspreid kleine schepjes uit het monster te nemen en dit al roerende toe te voegen aan het beekerglas tot een niveau van 200 ml is bereikt.

B. Erlenmeyer- (melk)flessenmethode

- Hang de met een kurk gesloten trechter boven fles A in de ring aan het statief.
- Hang de huishoudezeef (maaswijdte: 1,6 mm) in de trechter.
- Doe het 200 ml-substraat/watermonster in de trechter. Bekerglas naspoelen.
- Voeg zoveel water toe totdat het monster goed met het water in contact komt. Totaal ca. 800 ml water.
- Beroer het water voorzichtig met de hand zodat het monster door de zeef in de trechter spoelt. In geval van kokos blijft ongeveer de helft van het 100 ml-monster op de zeef achter. Verwijder de zeef.
- Trek de kurk los en laat de suspensie in fles A stromen. Spoel de trechter na met schoon water.
- Vul fles A met water aan tot aan de rand.
- Bevestig een gesloten opzetstuk op fles A.
- Vul fles B tot aan de rand met water en plaats deze op het statief.
- Schud fles A goed en hang deze omgekeerd in de ring van het statief op een zodanige hoogte dat de monding van het afgesloten opzetstuk in fles B steekt.
- Open het opzetstuk en laat het geheel 10 minuten staan. Gedurende die tijd zullen de zwaardere substraatdelen vanuit fles A in fles B stromen. Bovenin fles A ontstaat een vacuüm waardoor er een tegenstroom vanuit fles B ontstaat.
- Sluit na 10 minuten het opzetstuk en neem fles A van het statief.
- Herhaal deze procedure met fles B op een geheel met water gevulde fles C gedurende 3 minuten.
- Spoel de inhoud van fles A en B over een set van vier gestapelde, bevochtigde 52 µm zeven. Flessen naspoelen.
- Spoel met water het debris van de vier zeven in een teil. Houd hierbij de zeven schuin naar voren.
- Laat de suspensie enigszins bezinken.

C. Wattenfiltermethode

- Bevestig een filter bestaande uit twee wattenfilters (onder) en een vliesfilter (boven) met een klemring in een extractiezeef. (vliesfilter = Favorit en wattenfilter = Hygia rapid).
- Leg een horlogeglas op de filters en plaats de extractiezeef in een overschenkschaal met kruisstuk.
- Laat via het horlogeglas water over de filters lopen totdat het water met de onderkant van de zeef in contact komt.
- Giet de bezonken suspensie uit het teiltje voorzichtig via het horlogeglas op de filters. Schud de laatste 200-300 ml goed rond en schenk deze op het horlogeglas. Spoel de teil en vervolgens het horlogeglas schoon.
- Haal de extractiezeef voorzichtig uit de overschenkschaal en verwijder de klemring.
- Plaats de uitgelekte extractiezeef in een extractieschaal met ca. 100 ml water, voldoende om de filters vochtig te houden.
- Plaats de extractieschaal in de extractiekast bij een temperatuur van ca. 20°C.
- Dek de schaal af met een deksel om verdamping zoveel mogelijk te voorkomen.

- Haal na het bereiken van de gewenste extractieperiode de extractiezeef uit de schaal.
- Giet de inhoud van de schaal over in een 100 ml glazen potje met schroefdeksel.
- Plaats, indien nodig, de extractiezeef terug in de met 100 ml water gevulde extractieschaal. Dek deze af.

Bijlage 2 Extractieprotocollen wortels

Vorbewerking wortels

- Verwijder voorzichtig de grote stukken substraat met de hand.
- Spoel de rest van het substraat voorzichtig van de wortels met de broes (PD) of in een bak water.
- Knip de wortels dikker dan 2 mm los en verwijder deze.
- Zorg voor een voldoende totale hoeveelheid wortels.
- Verwijder aanhangend water door de wortels voorzichtig droog te deppen.
- Knip de wortels in stukjes van ca. 0,5 cm in een voldoende grote bak.
- Meng de wortelstukjes goed.

Knippen/wattenfiltermethode

- Volg voor het verkrijgen van de wortels de werkwijze die beschreven is onder 'Vorbewerking wortels'.
- Maak een filter bestaande uit een vliesfilter (boven), twee wattenfilters (tussen) en een vliesfilter (onder). Leg het filter in een extractiezeef met een maaswijdte van ca. 0.5 mm ter ondersteuning van het filter. (Vliesfilter = Favorit en wattenfilter = Hygia rapid).
- Zet een extractieschaal klaar met daarin 100 ml water.
- Neem uit het verkregen wortelmateriaal, bestaande uit wortelstukjes van ca. 0,5 cm, het gewenste aantal monsters.
- Spoel een monster goed verdeeld op het filter, plaats de extractiezeef + filter in de extractieschaal en zet het geheel in de incubatiekast bij een constante temperatuur van ca. 20°C.
- Dek de schaal af met plastic.
- Herhaal dit voor alle andere monsters nadat al het materiaal, dat in contact is geweest met het monster, is gereinigd.
- Na het verstrijken van de extractietijd extractieschalen afgieten en indien nodig extractiezeven terugplaatsen in de schalen met 100 ml vers water en dek deze weer af.

Mixer/wattenfiltermethode

- Volg voor het verkrijgen van de wortels de werkwijze die beschreven is onder 'Vorbewerking wortels'.
- Maak een filter bestaande uit een vliesfilter (boven), twee wattenfilters (tussen) en een vliesfilter (onder). Leg het filter in een extractiezeef met een maaswijdte van ca. 0.5 mm ter ondersteuning van het filter. (Vliesfilter = Favorit en wattenfilter = Hygia rapid).
- Zet een extractieschaal klaar met daarin 100 ml water.
- Neem uit het verkregen wortelmateriaal, bestaande uit wortelstukjes van ca. 0,5 cm, het gewenste aantal monsters.
- Doe een monster in de mixerbeker en voeg water toe totdat de messen van de mixer net onder water staan.
- Stel de timer in op 5 seconden en vermaal het monster (PD: 12.600 toeren/min.).
- Plaats de extractiezeef in een overschenkschaal met kruisstuk en laat via een horlogeglas water over het filter lopen totdat het water de onderkant van de extractiezeef raakt.
- Giet het monster via een horlogeglas op het filter, spoel de beker na met water en voeg dit toe aan het filter.
- Haal de extractiezeef met filter uit de overschenkschaal, plaats de zeef + filter in de extractieschaal en zet het geheel in de incubatiekast bij een constante temperatuur van ca. 20°C.
- Dek het schaalje af met plastic.
- Herhaal dit voor alle andere monsters nadat al het materiaal, dat in contact is geweest met het monster, is gereinigd.
- Na het verstrijken van de extractietijd extractieschalen afgieten en indien nodig extractiezeven terugplaatsen in de schalen met 100 ml vers water en dek deze weer af.

Mistkamermethode

- Volg voor het verkrijgen van de wortels de werkwijze die beschreven is onder 'Vorbewerking wortels'.
- Plaats het filter (Schut V-255-12,5) in een extractiezeef (maaswijdte zeef = 1mm).
- Plaats de klem op het slangetje.
- Vul de trechter met leidingwater.
- Neem uit het verkregen wortelmateriaal, bestaande uit wortelstukjes van ca. 0,5 cm, het gewenste aantal monsters.
- Stop elk monster in een extractiezeefje met filter.
- Plaats het zeefje in de trechter en zet het mistapparaat aan (18°C).
- Na verstrijken extractietijd trechters aftappen en trechters eventueel opnieuw vullen met vers water voor een vervolg van de extractie.

Centrifugemethode

- Volg voor het verkrijgen van de wortels de werkwijze die beschreven is onder 'Vorbewerking wortels'.
- Neem uit het verkregen wortelmateriaal met wortelstukjes van ca. 0,5 cm een wortelmonster van 5 gram.
- Plaats een glas op de Metler balans, zet de balans op nul en weeg de benodigde hoeveelheid wortels af. Doe er een beetje water op om uitdrogen van de wortels te voorkomen.
- Mixer 30 seconden in een Waring Blendor (12.600 t/min.) in 100 - 125 ml water in 250 ml-beker. De mesjes moeten goed onder water staan, tijdens het mixen mogen er geen wortelstukjes aan het deksel blijven hangen.
- Broes via een zeef van 0,6 - 1,2 mm de gemixerde wortelstukjes in centrifugebuizen. De wortelstukjes die op de zeef blijven liggen weggoaien.
- Voeg 3 à 4 g (2 à 3 ml) kaolien toe en meng dit gedurende ½ minuut met de fibro-mixer.
- Centrifugeer 5 minuten, 2850 toeren/minuut (±1500 g.).
- Water afgieten.
- Voeg MgSO₄-oplossing toe (soortelijk gewicht 1,16; s.g. nematoden: 1,08). (Voor het maken van een MgSO₄-oplossing met een s.g. van 1,16 moet aan 1 liter water 350 g MgSO₄ worden toegevoegd. Het s.g. altijd controleren met een densitometer).
- Minimaal ½ minuut mengen met een vibromixer. Het sediment moet volledig los van de bodem zijn.
- Centrifugeer 4 minuten bij 3000 toeren/minuut
- Al ronddraaiend centrifugebuizen afgieten over zeef met een doorlaat van 0,005 mm + onderzetter.
- Als de MgSO₄-oplossing door de zeef is, deze met een spuitfles afspoelen in potje van 100 ml; dit twee keer herhalen.