PM 4/35 (1)

Europejska i Śródziemnomorska Organizacja Ochrony Roślin

Organisation Europeenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes

Programy produkcji zdrowych roślin do sadzenia

Schémas pour la production de végétaux sains destinés a la plantation

**Badanie gleby pod kątem nicieni będących wektorami wirusów, w ramach Programów produkcji zdrowego materiału szkółkarskiego, winorośli, *Populus* i *Salix,* zgodnych ze Standardami EPPO PM 4**

Zatwierdzenie i nowelizacje

Po raz pierwszy zatwierdzono 2009-09.

Zakres szczegółowy

Niniejszy standard opisuje pobieranie i badanie prób gleby przeznaczonej do sadzenia materiału rozmnożeniowego i kwalifikowanego następujących roślin: PM 4/8 (*Vitis* spp.), PM 4/9 (*Ribes* spp.), PM 4/10 (*Rubus* spp.), PM 4/11 (*Fragaria* x *ananassa*), PM 4/16 (*Humulus lupulus*), PM 4/29 (*Prunus avium, Prunus cerasus* wraz z podkładkami), PM 4/30 (*Prunus armeniaca, Prunus domestica, Prunus dulcis, Prunus persica, Prunus salicina* wraz z podkładkami), PM 4/17 (*Olea europea*), PM 4/32 (*Sambuscus* spp.), PM 4/33 (*Populus* spp. i *Salix* spp.).

**Wstęp**

W programach produkcji zdrowego materiału nasadzeniowego wymienionych wyżej roślin uwzględniono wymagania dla gleby w zakresie nicieni będących wektorami wirusów (nicienie objęte niniejszym standardem wymieniono w tabeli nr 1). Wymagania w tych programach kwalifikacyjnych różnią się w zależności od danej rośliny; istnieją trzy typy wymagań.

• Gleba powinna być przebadana i uznana za wolną od nicieni będących wektorami wirusów.

• Gleba powinna być przebadana i uznana za praktycznie wolną od nicieni będących wektorami wirusów lub w przypadku stwierdzenia nicieni należy wykazać, że są one wolne od wirusów stosując test niszczący lub test z użyciem roślin pułapkowych

• Gleba powinna być przebadana i uznana za praktycznie wolną od nicieni będących wektorami wirusów.

Informacje o wymaganiach dla poszczególnych roślin można znaleźć w odpowiednich standardach.

W niniejszym standardzie opisano wytyczne w zakresie badania gleby oraz nicieni pod kątem występowania wirusów.

**Pobieranie prób gleby i ekstrakcja nicieni będących wektorami wirusów**

Opisane poniżej metody stosuje się do pobierania prób i badania gleby pod kątem obecności nicieni z rodziny *Longidoridae* należących do rodzajów *Longidorus*, *Paralongidorus* i *Xiphinema*, wektorów nepowirusów i sadwawirusów oraz nicieni będących wektorami tobrawirusów (tzn. *Trichodorus* i *Paratrichodorus* spp.).

**Pobieranie prób gleby**

Próby gleby należy pobierać rutynowo wiosną lub jesienią, kiedy nie jest ona ani zbyt mokra, ani zbyt sucha, tzn. kiedy panują wilgotne warunki glebowe. Próby należy pobierać z górnej warstwy gleby o głębokości 30-60 cm przy pomocy próbobierza półcylindrycznego. Ponieważ nicienie z rodziny *Longidoridae* są znacząco dłuższe od większości grup nicieni pasożytujących na roślinach (od 3 do 10 mm w porównaniu do <1 mm), istnieje większe prawdopodobieństwo ich fizycznego uszkodzenia podczas pobierania próbki, dlatego średnica sondy próbobierza powinna wynosić co najmniej 3 cm. Właściwą metodą jest wykopanie sztychu ziemi na głębokość 15 cm szpadlem, a następnie przy pomocy łopatki ogrodniczej pobranie próbki gleby z dna otworu na głębokość co najmniej 30 cm.

Obszar próbobrania może być podzielony na mniejsze obszary o odpowiedniej powierzchni. W każdym z podobszarów, punkty pobierania powinny być rozłożone równomiernie; należy pobrać z nich podpróbki, zgodnie z opisem poniżej, do uzyskania próbki gleby objętości co najmniej 500 ml (preferowaną wielkością może być 1500 ml, jeżeli wiedza o miejscu produkcji wskazuje na prawdopodobnie niskie zagęszczenie nicieni).

Tabela nr 1. Nicienie będące wektorami wirusów i powiązane z nimi wirusy, o których mowa w: PM 4/8 (*Vitis* spp.), PM 4/9 (*Ribes* spp.), PM 4/10 (*Rubus* spp.), PM 4/11 (*Fragaria* x *ananassa*), PM 4/16 (*Humulus lupulus*), PM 4/29 (*Prunus avium, Prunus cerasus* wraz z podkładkami), PM 4/30 (*Prunus armeniaca, Prunus domestica, Prunus dulcis, Prunus persica, Prunus salicina* wraz z podkładkami), PM 4/17 (*Olea europea*), PM 4/32 (*Sambuscus* spp.), PM 4/33 (*Populus* spp. i *Salix* spp.).

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Nicień | Wirus | Standard PM 4 |
| *Longidorus attenuatus* | Wirus czarnej pierścieniowej plamistości pomidora (nepowirus) (Tomato black ring virus) | *Vitis* spp., *Rubus* spp., *Fragaria* x *ananassa*, *Prunus avium, Prunus cerasus* wraz z podkładkami, *Prunus armeniaca, Prunus domestica, Prunus dulcis, Prunus persica, Prunus salicina* wraz z podkładkami, *Populus* spp. |
| *Longidorus elongatus* | Wirus pierścieniowej plamistości maliny (nepowirus) (Raspberry ringspot virus)Wirus czarnej pierścieniowej plamistości pomidora (nepowirus) (Tomato black ring virus) | *Vitis* spp., *Ribes* spp., *Rubus* spp., *Fragaria x ananassa, Prunus avium, Prunus cerasus* wraz z podkładkami, *Prunus armeniaca, Prunus domestica, Prunus dulcis, Prunus persica, Prunus salicina* wraz z podkładkami, *Populus* spp. |
| *Longidorus macrosoma* | Wirus pierścieniowej plamistości maliny (nepowirus) (Raspberry ringspot virus) | *Vitis* spp., *Ribes* spp., *Rubus* spp., *Fragaria x ananassa, Prunus avium, Prunus cerasus* wraz z podkładkami |
| *Paralongidorus maximus* | Wirus pierścieniowej plamistości maliny (nepowirus) (Raspberry ringspot virus) | *Vitis* spp. |
| *Xiphinema diversicaudatum* | Wirus mozaiki gęsiówki (nepowirus) (Arabis mosaic virus)Wirus liściozwoju wiśni (nepowirus)\* (Cherry leaf roll virus) Utajony wirus pierścieniowej plamistości truskawki (sadwawirus) (Strawberry latent ringspot) | *Vitis* spp., *Ribes* spp., *Rubus* spp *Fragaria x ananassa, Humulus lupulus, Prunus avium, Prunus cerasus* wraz z podkładkami, *Prunus armeniaca, Prunus domestica, Prunus dulcis, Prunus persica, Prunus salicina* wraz z podkładkami, *Olea europea, Sambuscus* spp., *Populus* spp. |
| *Xiphinema index* | Wirus wachlarzowatości liści winorośli (nepowirus) (Grapevine fanleaf virus) | *Vitis* spp. |
| *Xiphinema italiae* | Wirus wachlarzowatości liści winorośli (nepowirus) (Grapevine fanleaf virus) | *Vitis* spp. |
| *Xiphinema vuittenezi* | Wirus wachlarzowatości liści winorośli (nepowirus)\* (Grapevine fanleaf virus) | *Vitis* spp. |
| *Xiphinema americanum* sensu lato | Wirus pierścieniowej plamistości tytoniu (nepowirus) (Tobacco ringspot virus) | *Salix* spp. |
| *Paratrichodorus* spp.† | Wirus nekrotycznej kędzierzawki tytoniu (tobrawirus) (Tobacco rattle virus) | *Populus* spp. |
| *Trichodorus* spp.‡ | Wirus nekrotycznej kędzierzawki tytoniu (tobrawirus) (Tobacco rattle virus) | *Populus* spp. |

\* Pomimo, że ta kombinacja wirus – wektor wymieniona jest we właściwym standardzie PM 4, nie potwierdzono przenoszenia wirusa.

† Należy zauważyć, że następujące gatunki z rodzaju *Paratrychodorus* są uznawane za wektory wirusa nekrotycznej kędzierzawki tytoniu (tobrawirusa): *Paratrichodorus allius, P. anemones, P. christiei, P. nanus, P. pachydermus, P. teres.*

‡ Należy zauważyć, że następujące gatunki z rodzaju *Trichodorus* spp. są wektorami wirusa nekrotycznej kędzierzawki tytoniu (tobrawirusa): *Trichodorus minor, T. primitivus, T. viruliferus.*

Jedną z szeroko stosowanych metod jest pobieranie próbek z danego miejsca produkcji w układzie siatki (patrz rys. 1), na przykład 20 podpróbek z powierzchni do 0,2 ha i do 50-60 z powierzchni w przedziale 0,2 – 4 ha. Innym rozwiązaniem (charakteryzującym się większą intensywnością, ale stosowanym w niektórych krajach) jest podzielenie miejsca produkcji na działki wielkości 0,2 ha i pobieranie 60 podpróbek z każdej z nich. Dodatkowo, należy pobrać próbki z ewentualnych miejsc występowania żywopłotów otaczających teren. Jeśli rozkład nicieni w danym polu jest lepiej rozpoznany, można zastosować inne metody pobierania próbek (patrz rys. 1).

Glebę należy umieścić w polietylenowych workach, zamknąć i wyraźnie oznaczyć. Do czasu obróbki próbki należy chronić przed bezpośrednim działaniem światła słonecznego i przetrzymywać w chłodnym miejscu (w temp. poniżej 10°C). Podczas przenoszenia i przewozu próbek należy zachować środki ostrożności. Oprócz utrzymania ich w niskiej temperaturze, z próbkami należy obchodzić się delikatnie (nie rzucać) i nie składować zbyt długo jedne na drugich, ponieważ nacisk może doprowadzić do zgniecenia i śmierci nicieni. Zaleca się szybki transport do laboratorium. Z próbek należy usunąć duże kamienie. Próbki gleby najlepiej włożyć do drugiego worka, a etykietę umieścić pomiędzy nimi.

**Ekstrakcja nicieni**

Próbki należy poddać obróbce jak najszybciej. Każdą próbkę należy ostrożnie zmieszać i ręcznie rozkruszyć większe grudki. Jeżeli gleba ma być analizowana pod kątem obecności nicieni z rodziny *Longidoridae*, podczas mieszania i rozkruszania należy zachować ostrożność, aby ich nie zabić. Metody ekstrakcji nicieni przedstawiono w załączniku.

**Identyfikacja nicieni**

W przypadku większości nicieni wymagana jest identyfikacja do poziomu gatunku. Oznacza to konieczność badania próbek w laboratorium nematologicznym.

Rys. 1 Przykładowe sposoby pobierania próbek gleby z pól: A) Pobieranie próbek wzdłuż linii przecinających pole ukośnie i wykonywanie nakłuć w układzie gwiazdy; B) pobieranie próbek i wykonywanie nakłuć gleby wzdłuż linii łamanej w celu równomiernego pokrycia pola; C) pobieranie próbek i wykonywanie nakłuć gleby wewnątrz pól siatki; (D) pobieranie próbek w układzie siatki.

**Badanie nicieni na obecność wirusów.**

**Test niszczący**

Nicienie można przebadać pod kątem obecności wirusa metodą bezpośrednią stosując ‘test niszczący’ tzn. dokonując dekompozycji małej liczby nicieni w buforze fosforanowym (pH 6,9) i zaszczepiając powstałym roztworem rośliny wskaźnikowe (Taylor, 1964).

 **Test z użyciem roślin wskaźnikowych** Test z użyciem roślin wskaźnikowych wykorzystuje się często do badania gleby pod kątem występowania nepowirusów po wykryciu nicieni będących ich wektorem. Przenoszenie wirusów można zbadać uprawiając rośliny wabiące w dwóch podpróbkach gleby o masie 600g uzyskanych z próbki 2 kg (Taylor & Brown, 1976). Próbkę ziemi umieszcza się w kuwetach i uprawia w nich wrażliwe rośliny z rodzaju *Petunia* sp. oraz *Cucumis sativus* L. (ogórek) w szklarni w temperaturze 20°C z 12 godzinami dodatkowego światła. Kuwety z nasionami umieszcza się w płytkich tackach bez otworów umożliwiając nawadnianie od dołu. Po upływie co najmniej 4 tygodni rośliny wabiące są usuwane, z ich korzeni całkowicie zmywa się glebę, a następnie podpróbkę mieli się w buforze. Wydzielinę następnie przelewa się do naczyń na próbki i bada bezpośrednią metodą ELISA pod kątem występowania nepowirusów.

**Testy molekularne**

Można również wykrywać niektóre wirusy występujące w nicieniach przy pomocy testu PCR z zastosowaniem specyficznych starterów. W tabeli 2 przedstawiono wybór publikacji opisujących molekularne metody wykrywania wirusów w nicieniach (istnieje wiele innych publikacji opisujących metody PCR do wykrywania w roślinach, które można też wykorzystać do wykrywania w nicieniach). Nie mniej jednak, nie jest zalecana żadna konkretna metoda.

**Materiały źródłowe**

Materiały źródłowe dotyczące metod molekularnych znaleźć można również w tabeli 2.

Flegg JJM (1967) Extraction of *Xiphinema* and *Longidorus* spp. from soil by a modification of Cobb’s decanting and sieving technique. Annals of Applied Biology 60, 429-437.

Hooper DJ (1986) Extraction of free-living stages from soil. In: Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes (Ed. Southey JF), pp. 5­30. Her Majesty’s Stationery Office, London (GB).

Seinhorst JW (1955) [A method for the extraction of nematodes from soil]. Tijdschrift voor Plantenziekten 61, 188-190, (po holendersku).

Taylor CE (1964) Transmission. In: Report of the Scottish Horticultural Research Institute for 1963/1964, 65 pp. SCRI, Dundee (GB).

Taylor CE & Brown DJF (1976) The geographical distribution of Xiphinema and Longidorus nematodes in the British Isles and Ireland. Annals of applied Biology 84, 383^02.

**Załącznik 1 - Metody ekstrakcji nicieni**

**Ekstrakcja *Xiphinema* i *Longidorus***

*Technika Cobba zmodyfikowana przez Flegga (opisana przez Hoopera, 1986)*

Metoda ta została opracowana przez Flegga (1967) do ekstrakcji z gleby dużych nicieni z rzędu *Dorylaimida*. Stanowi ona połączenie metody dekantacji i przesiewania Cobba z metodą lejków Baermanna. Ostateczny wynik ekstrakcji metodą Baermanna uzależniony jest od zdolności aktywnych nicieni do przejścia przez sito o małych oczkach. Typ gleby może wpływać na niektóre aspekty tej metody (np. przesiewanie lub zawiesinę), w takich przypadkach należy dokonywać niezbędnych adaptacji.

Przygotowanie próbki gleby i wykonanie zmodyfikowanej ekstrakcji Cobba trwa ok. 1 godz. Ekstrakt należy zostawić na lejku Baermanna na kolejne 18-24 godz. Zbieranie ostatecznego ekstraktu trwa 2 minuty, a następnie odstawia się go na 2 godz. aby nicienie opadły, co jest wymagane do jego późniejszej koncentracji. Potrzebny jest następujący sprzęt: plastikowa zlewka o pojemności 1 l, trzy sita o średnicy oczek 150 μm, jedno sito o średnicy i oczek 4 mm oraz wiadro o pojemności 5 l o średnicy odpowiadającej średnicy sita o wielkości oczek4mm.

Do ostatecznej ekstrakcji Baermanna potrzeba: lejka szklanego o średnicy 150 mm z plastikowym wężykiem przymocowanym do odpływu; zacisku sprężynowowego zamykającego rurkę pozwalającego dozować próbkę; wykonanego ze stali nierdzewnej statywu na lejek; plastikowego sita wykonane z polietylenowego pierścienia o średnicy 125 mm z nylonową siatką o średnicy oczek 90 μm.

Tabela 2 Odnośniki do publikacji omawiających temat molekularnych metod wykrywania wirusów w nicieniach będących ich wektorami

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Wirusy | Gatunek nicienia | Publikacje | Badanie | Uprawy |
| Wirus nekrotycznej kędzierzawki tytoniu (Tobacco rattle virus) | *Paratrichodorus anemones* | Boutsika K, Phillips MS, MacFarlane SA, Brown DJF, Holeva RC & Blok VC (2004) Molecular diagnostics of some trichodorid nematodes and associated Tobacco rattle virus. Plant Pathology 53, 110-116 | RT-PCR (ze starterami specyficznymi dla poszczególnych izolatów) | Brak informacji o uprawie |
| Wirus wachlarzowatości liści winorośli (Grapevine fanleaf virus) | *Xiphinema index* | Demangeat G, Komar V, Cornuet P, Esmenjaud D & Fuchs M (2004) Sensitive and reliable detection of grapevine fanleaf virus in a single Xiphinema index nematode vector. Journal of Virological Methods 122, 79-86 | RT-PCR | Winorośl |
| Wirus wachlarzowatości liści winorośli (Grapevine fanleaf virus) | *Xiphinema index* | Esmenjaud D, Abad P, Pinck L & Walter B (1994) Detection of a region of the coat protein gene of Grapevine fanleaf virus by RT-PCR in the nematode vector Xiphinema index. Plant Disease 78, 1087-1090 | RT-PCR | Winorośl |
| Wirus wachlarzowatości liści winorośli (Grapevine fanleaf virus) | *Xiphinema index* | Finetti-Sialer MM & Ciancio A (2005) Isolate-Specific Detection of Grapevine fanleaf virus from Xiphinema index through DNA-based molecular probes. Phytopathology 95, 262-268 | Real-time RT-PCR | Winorośl |
| Wirus nekrotycznej kędzierzawki tytoniu (Tobacco rattle virus) | *Paratrichodorus pachydermus* oraz *Trichodorus similis* | Holeva R, Phillips MS, Neilson R, Brown DJF, Young V, Boutsika K & Blok VC (2006) Real-time PCR detection and quantification of vector trichodorid nematodes and Tobacco rattle virus. Molecular and Cellular Probes 20, 203-211 | RT-PCR (do wykrywania jednocześnie wirusa i gatunku nicienia) |  |
| Utajony wirus truskawki (Strawberry latent virus)Wirus mozaiki gęsiówki (Arabis mosaic virus) | *Xiphinema diversicaudatum* oraz *Longidorus macrosoma* | Kulshrestha S, Hallan V, Raikhy G, Adekunle OK, Verma N,. Haq QMR & Zaidi AA (2005) Reverse transcription polymerase chain reaction-based detection of Arabis mosaic virus and Strawberry latent ringspot virus in vector nematodes. Current Science 89, 1759-1762 | RT-PCR | Róża i lilia |
| Wirus nekrotycznej kędzierzawki tytoniu (Tobacco rattle virus) | *Trichodorus primitivus* | van der Wilk F, Korsman M & Zoon F (1994) Detection of tobacco rattle virus in nematodes by reverse transcription and polymerase chain reaction. European Journal of Plant Pathology 100, 109-122 | RT-PCR | Brak informacji o uprawie |

W tej technice wykorzystuje się próbki gleby o objętości ok. 200 ml (ok. 200 g gleby mineralnej). Do litrowej zlewki wlać ok. 250 ml wody. Wsypać przygotowaną próbkę gleby i moczyć ja przez 30 minut mieszając od czasu do czasu. Na wężyk lejka Baermanna założyć zacisk, umieścić w lejku plastikowe sito i wlać tyle wody kranowej (bieżącej), aby lekko przykryła dno sita. Upewnić się, czy lejek nie przecieka. Na plastikowe wiadro nałożyć sito o oczkach 4 mm. Przemyć mieszaninę gleby z wodą przez sito w celu usunięcia grubszych zanieczyszczeń. Zdjąć sito i dopełnić wiadro wodą. Umieścić jedno na drugim trzy czyste sita o średnicy oczek 150 μm i zwilżyć je. Pod krawędź sit podłożyć kawałek gumowej rurki przechylając je w stronę laboranta w celu ułatwienia odpływu wody. Ręcznie mocno zamieszać mieszaninę gleby i wody w wiadrze (10 obrotów lub więcej, zależnie od typu gleby) aby stworzyć zawiesinę. Odstawić mieszaninę na 25 sek. pozwalając opaść większym cząstkom, a następnie szybkim, płynnym ruchem zlać supernatant przez zestaw trzech sit o oczkach o średnicy 150 μm. Materiał cedzony przez sita nie powinien obejmować osadu. . Osad pozostały na górnym sicie przepłukać delikatnie niewielkim strumieniem wody bieżącejj za pomocą elastycznego, węża pozbywając się drobnych cząstek i piany. Wziąć górne sito i ustawić pod kątem 45°. Niewielkim strumieniem wody z elastycznego węża, zaczynając od położonej wyżej krawędzi sita powoli spłukać osad na dół. Przy pomocy tryskawki spłukać osad do czystej plastikowej zlewki o poj. 1 litra. Jeśli próbka ma wyjątkowo wysoką zawartość materii organicznej w tym momencie niezbędne może okazać się delikatne rozluźnienie pozostałych na sicie zanieczyszczeń przy pomocy strumienia wody skierowanego od tyłu sita, przy czym sito powinno nadal pozostawać pochylone. Odwrócić górne sito i umieścić je na pozostałych. Lekko ścisnąć końcówkę gumowego wężyka, aby zwiększyć ciśnienie wody. Przepłukać począwszy od tylnej krawędzii całą powierzchnię górnego sita przez kilka sekund, aby wymyć nicienie, które mogły pozostać w obrębie sita . Powtarzać te same kroki w przypadku pozostałych dwóch sit pomijając przemywanie od trzeciego sita. Roztwór przelewać ostrożnie, aby nie przepełnić zlewki. Ponownie napełnić wiadro wodą i powtórzyć procedurę pozwalając cząstkom ziemi osadzać się przez 15 sek. przed zlaniem zawiesiny przez sita.

Wziąć mokre plastikowe sito z lejka Baermanna i nad zlewem ostrożnie przelać przez nie zawartość litrowej zlewki. Przemyć zlewkę przelewając pozostały materiał przez sito. Ostrożnie umieścić plastikowe sito z powrotem na lejku Baermanna i w razie konieczności dolać wody do chwili przykrycia cienką warstwą dna sita i znajdujących się na nim cząstek. Po upływie 18-24 godz. zlać około 40 ml wody z lejka do odpowiedniego pojemnika celem zbadania.

*Aparat Oostenbrinka*

Próbkę 100 ml wilgotnej gleby, albo większą, umieszcza się w sicie o średnicy oczek 3-4 mm, a następnie spłukuje do urządzenia przez lejek za pomocą dyszy podającej wodę w dawce 1000 – 1500 ml min-1. Jednocześnie do dolnej części urządzenia przez dyszę z perforowanym zakończeniem podawana jest woda w dawce 1000 ml min-1, co tworzy prąd skierowany ku górze uniemożliwiający nicieniom i drobnym cząstkom gleby opadanie na dno, gdzie osadzają się tylko cięższe cząstki. Przemywanie próbki trwa 10-15 min. Kiedy aparat jest prawie całkowicie napełniony, woda z nicieniami zlewana jest na sita. Do zbierania osobników nicieni z rodzajów *Xiphinema* i *Longidorus* stosuje się zestaw dwóch sit o średnicy 20 cm o maksymalnej wielkości oczek 180 μm. Uzysk ze wszystkich sit umieszcza się w plastikowej misce z niewielką ilością wody bieżącej. Zawiesinę cedzi się przez sito nylonowe o oczkach wielkości 100 μm, które umieszcza się w naczyniu do ekstrakcji lub lejku Baermanna na co najmniej 20 godzin. Nicienie w wodzie można obserwować przez mikroskop stereoskopowy (x25).

**Ekstrakcja *Trichodorus* spp. i *Paratrichodorus* spp.**

W literaturze opisano wiele metod ekstrakcji mniejszych okazów z rodzajów *Trichodorus* spp. i *Paratrichodorus* spp. (patrz Hooper, 1986).

Opisana poniżej technika Seinhorsta (1955) wykorzystująca dwie kolby jest prosta, lecz skuteczna: przygotować podpróbkę objętości 200 ml, do której dodać należy 800 ml wody. Moczyć materiał przez 1 godz. w wodzie, a następnie delikatnie zamieszać. Przemyć mieszaninę gleby z wodą przez sito o średnicy oczek 4 mm do dużego lejka z szerokim odpływem zatkanym korkiem. Po przelaniu całości materiału przez sito, wyciągnąć korek i zlać mieszaninę do dwulitrowej kolby stożkowej (erlenmajerki) z szeroką szyjką. Wypłukać lejek niewielką ilością wody i dopełnić kolbę wodą usuwając tworzącą się pianę. Jeśli kolba ma standardowy szlif 35 mm, można zastosować odpowiedni lejek, w przeciwnym razie krótki plastikowy lejek można zamocować za pomocą gumowego rękawa. Średnica otworu nóżki lejka powinna wynosić około 12 mm w celu otrzymania odpowiedniej szybkości osadzania/wymywania. Przytrzymując palcem otwór nóżki lejka potrząsnąć kolbą w celu dokładnego zmieszania jej zawartości i odwrócić ją do góry dnem nad drugą kolbą wypełnioną wodą. Otwór lejka powinien być lekko zanurzony, wtedy należy szybko zdjąć palec; drobiny ziemi i nicienie osadzają się w sposób zróżnicowany. Po dziesięciu minutach rozdzielić dwie kolby umieszczając dolną odwróconą do góry dnem nad zlewką wypełnioną wodą na kolejne 10 minut. Zawartość obydwu kolb przelewa się następnie przez zestaw trzech sit o oczkach wielkości 50 μm. Następnie należy przejść do drugiego etapu techniki Cobba zmodyfikowanej przez Flegga opisanej powyżej dla rodzajów *Xiphinema* i *Longidorus*, z tym, że zamiast sita o oczkach wielkości 100 μm należy zastosować sito nylonowe o oczkach wielkości 50 μm.

Należy zauważyć, że nicienie z rodzaju *Trichodoridae* można również ekstrahować aparatem Oostenbrinka; zawiesinę nicieni zbiera się wówczas przy pomocy sita o oczkach średnicy 40-45 μm.