毛状根によるサツマイモネコブセンチュウの培養¹⁾

安達 宏*・奈良部孝**・百田洋二**,2)

*ライオン株式会社生物科学センター

**農林水産省農業研究センター

Culture of *Meloidogyne incognita* on Oriental-Melon Roots Genetically Transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. Hiroshi ADACHI (Biological Science Research Center 4, Lion Corporation, Tajima, Odawara, Kanagawa 256, Japan), Takashi NARABU and Yoji MOMOTA³⁾ (National Agriculture Research Center, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan). *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* **36**: 225–230 (1992)

The root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, was cultured monoxenically on oriental-melon (*Cucumis melo* L.) roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes* at various temperatures. The developmental zero degree of the nematode was 10.9°C. The day-degrees for the onset of oviposition were 293, and 473 for completing one generation after inoculation with 2nd-stage juveniles. There were no significant differences in the dimensions of eggs and pre-parasitic 2nd-stage juveniles between transformed roots and intact plant roots, although a slight temperature-dependency was seen in body length, tail length, and the a-avalue of juveniles. Regarding the infectivity on six differential host plants, juveniles produced on transformed roots were the same as those produced on intact host plant roots. These results suggest that the transformed root system is appropriate for culture of root-knot nematodes under sterile conditions.

Key words: *Agrobacterium rhizogenes*, hairy root, *Meloidogyne incognita*, root-knot nematode, transformed root

緒 言

ネコブセンチュウ類 (*Meloidogyne* spp.) やシストセンチュウ類 (*Heterodera* spp., *Globodera* spp.) 等の定着性植物寄生線虫の培養は人工培地上ではもちろん、カルス上でも成功を見ず、従来は無菌の根組織 (PEACOCK, 1959) や植物体 (McKENNA et al., 1963) を利用した培養が行われてきた。しかしこの方法は、宿主植物の増殖速度が遅く、手間を要するために線虫の大量増殖には不適であった。近年、新たな培養法として、毛根病の病原菌として知られている *Agrobacterium rhizogenes* の感染により誘発された毛状根で、*Meloidogyne javanica* (VERDEJO et al., 1988), *Heterodera glycines* (SAVKA et al., 1990), *H. schachtii* (PAUL et al., 1987), *Globodera rostochiensis* (KUMAR and FORREST 1990) の培養が試みられ、大量培養の可能性が示唆されてきた。

しかしわが国では、国内で分離した *A. rhizogenes* 菌の感染により誘発された毛状根による線虫の培養はまったく試みられていない。筆者らは *A. rhizogenes* の国内菌で誘発した毛状根でサツマイモネコブセンチュウ (*Meloidogyne incognita*) を無菌的に培養するとともに、培養条件下における発育零点、産卵開始および1世代完了に要する有効積算温度、卵および2期幼虫の形態計測値、ならびに病原性について調査した。

報告に先立ち、本稿の取りまとめに当りご援助とご教示をいただいた農業研究センター線虫害研究室の大島康臣室長に厚く御礼申し上げる。

材料および方法

1. 毛状根作出方法

Agrobacterium rhizogenes (MAFF 03-1724) を YEB 寒天培地 (pH 7.2) で3日間25°Cで培養後、その1白金耳

1) 本報告の概略は、平成3年度日本植物病理学会 (1991年4月、東京) で発表した。

2) 現在 農林水産省北陸農業試験場

3) Present address: Hokuriku National Agricultural Experiment Station, 1-2-1, Inada, Joetsu-shi, Niigata 943-01, Japan.
1992年1月30日受領 (Received 30 January 1992)

1992年7月16日登載決定 (Accepted 16 July 1992)

を YEB 液体培地で 16 時間振とう培養し接種源とした。供試植物としてはマクワウリ (*Cucumis melo* L.) を用い、その種子を 0.05% 次亜塩素酸ナトリウム溶液中で 15 分間表面殺菌後に Woody Plant Medium (LLOYD and McCOWN, 1980) (WP) の固型培地上に播種し、無菌の実生を得た。この実生に McCORMICK ら (1986) の方法に準じて *A. rhizogenes* (MAFF 03-1724) を感染させた後、セフォタキシムナトリウムを 0.5% 添加した WP 培地に置床した。この培地上で誘導された根を切り取り、セフォタキシムナトリウムを含む WP 培地で 1 週間ごとに 3 回移植を繰り返して *A. rhizogenes* を除菌後、TANAKA ら (1985) の方法に従い、ろ紙電気泳動とパウリ染色によってオバイン(ミキモピン)を検出し、毛状根であることを確認した。

2. 線虫の培養

実験には、ポット栽培のトマト(品種: 強力米寿)で継代された単卵塊由来のサツマイモネコブセンチュウレース 1 の個体群(千葉県旭市産)を用いた。トマトの根から摘出した卵嚢を 25°C の水中に入れ、24 時間以内に孵化してきた 2 期幼虫を 420 ppm メトキシエチル塩化水銀中で 20 分間、次いで 0.5% 硫酸ストレプトマイシン中で 20 分間表面殺菌後、滅菌水で 3 回洗浄した。この 2 期幼虫を GAMBORG の B5 培地 (GAMBORG et al., 1968) 上で 4~5 cm 程度に成長した毛状根に接種した。接種数はベトリ皿当たり 100 頭とした。培養開始後

5 日目に、未侵入の幼虫を除くために毛状根を新たな培地上に移植した。同時に一部の毛状根を酸性フクシンで染色し、侵入した線虫を計数した。その後、培養温度を 20, 25, 27, 30, 32°C ($\pm 0.1^\circ\text{C}$) の 5 段階に設定し、線虫発育経過を実体顕微鏡下で観察し、産卵開始および 1 世代完了に要する日数を調査した。調査後、一部のベトリ皿は 25°C に放置し、100 日後に全卵数および空卵の数を計数した。実験は 3 反復で行った。

3. 卵および 2 期幼虫の計測

上記の温度条件下で培養した線虫 (T 群) から得た卵の水封プレパラートを作製し、ただちに長径と短径を測定した。調査卵数は各温度につき 30 個とした。

培養後に得た 2 期幼虫は熱殺 (60°C, 5 分間) 後に水封プレパラートを作製し、体長 (L), 最大体幅, 肛門部体幅, 尾長, 尾端透明部長, 口針長を計測し, a 値 (体長/最大体幅), c 値 (体長/尾長), c' 値 (尾長/肛門部体幅) を求めた。調査個体数は各温度につき 20~40 頭とした。幼虫の計測は、温室 (17~24°C) で継代している個体群 (P 群) についても行った。

4. 寄生性の調査

毛状根で培養した線虫の寄生性を TAYLOR and SASSER (1978) の方法に準じて調べた。すなわち、温室内でポット栽培した 6 種類の判別寄主 (ワタ: Deltapine 16, タバコ: NC 95, ピーマン: California Wonder, スイカ: Charleston Gray, ラッカセイ: Florrunner, トマト:

Fig. 1. Gall formation of *Meloidogyne incognita* on the transformed root of Oriental-melon, *Cucumis melo* L. A: transformed root without nematode. B: Galls on the root 30 days after nematode inoculation. Scale bar=1 cm in A and B.

Rutger) に T 群の 2 期幼虫を 200 頭ずつ接種し、60 日後にゴールおよび卵嚢形成の有無を調査した。

結 果

1. 毛状根上での線虫の発育

線虫接種 5 日目における毛状根への侵入率は 49.1 ± 10.9 (平均値 $\pm$ S.D.) % であった。線虫が侵入した部位では接種後 4 日目より根の肥大が観察され、30 日目までに Fig. 1 に示すようなゴールが形成された。雌成虫の産卵は 25°C で接種後 23 日目より始まり、30 日目より卵嚢中の卵の孵化が開始した (Fig. 2)。このとき、1 卵嚢に含まれる卵は 626 ± 157 個で産卵開始後 100 日目での孵化率は $85.9 \pm 4.7\%$ であった。雄成虫はベトリ皿当り 1 頭程度認められた。

2. 1 世代所要日数、発育零点および有効積算温度

2 期幼虫を毛状根に接種後、産卵開始および次世代幼虫出現までの所要日数は、 30°C までは温度が上がるにつれて短くなったが、 32°C では長くなった (Table 1)。 32°C における発育遅延は毛状根の発育適温度を越えたためと思われた。そのため、 32°C での結果を削除して発育速度 (培養開始から産卵開始までの所要日数の逆数) と培養温度との相関関係を調べたところ、両者の間には直接関係が認められ (Fig. 3)、回帰式 $Y = -0.0419 + 0.00384 X$ ($r = 0.95$) を得た。この回帰式から求められた発育零点は 10.9°C であった。次に発育零点を基点として産卵開始までと次世代幼虫出現までの総温量を積算した結果、それぞれの有効積算温度 (K) は、培養温度を V 、 25°C で 5 日間の侵入期間を経た後の経過所要日数を T とすると、 $K = (V - 10.9^{\circ}\text{C}) \times T + (25^{\circ}\text{C} - 10.9^{\circ}\text{C}) \times 5$ 日より求められ、296 日度と 473 日度であった (Table 2)。

3. 卵および 2 期幼虫の形態測定値

T 群と P 群の卵の長径および短径の測定結果を Table 3 に示した。短径については T 群と P 群の間でまったく差は認められなかった。長径は、P 群より T 群のほうが平均で $2.8 \mu\text{m}$ 大きかったものの 1% の水準で有意差は認められなかった。また培養温度別に T 群の卵の大きさを比較すると、温度と卵の長径との間に有意な正の相関関係 ($r = 0.59$) が認められたが、短径との間には認められなかった (Table 4)。

2 期幼虫の形態測定結果は Table 3 に示した。いずれの計測値についても T 群と P 群の間に 1% の水準で有意差は認められなかった。T 群の 2 期幼虫の計測値を培養温度別に比較すると、体長、 a 値および尾長と温度との間にそれぞれ、 $r = 0.39$ 、 $r = 0.41$ および $r = 0.44$ の有

意な正の相関関係が認められた。しかし、 c 値、 c' 値、肛門部体幅、尾端透明部長、口針長および最大体幅との間には相関関係が認められなかった (Table 5)。

4. 寄生性

毛状根培養で得た 2 期幼虫をポット栽培の判別寄主に接種したところ、ラッカセイ、ワタ、タバコには寄生せず、トマト、ピーマン、スイカに寄生し、ゴールおよび卵嚢を形成した (Table 6)。この結果は、トマトを寄主として培養した線虫の寄生性とまったく変わらず、レース 1 の性質を示した。

考 察

日本産サツマイモネコブセンチュウレース 1 の 2 期幼虫は、接種 5 日目までに約半数が毛状根に侵入し、その後ゴールを形成した。ゴール内で発育した雌成虫は、培地中あるいは培地表面上に褐色と白色の卵嚢を形成した。卵嚢には、通常の植物根に寄生した場合と同様に 400 から 1,000 個の卵が含まれていた。卵嚢中の卵は順調に生育し、最終的には 80 から 90% の卵より次世代幼虫が培地中へ孵化遊出した。雄成虫はベトリ皿当り 1 頭程度観察された。これらの結果より、国内菌の *A. rhizogenes* により誘導されたマクワウリの毛状根は本線虫の宿主になることが確認された。

サツマイモネコブセンチュウの発育零点は、いままでに 2 例報告されている。一つは日本 (熊本) におけるホウセンカでの 12.0°C (後藤ら, 1973) で、他の一つは米国 (North Carolina) におけるクローバーでの 10.1°C (VRAIN et al., 1978) である。これらの報告と、今回毛状根培養で求めた値 (10.9°C) を比較した結果、両者の間に差異は認められなかった。

2 期幼虫接種から産卵開始および次世代幼虫の孵化遊出までの有効積算温度は、それぞれ 296 日度および 473 日度となり、これらの値は後藤ら (1973) の報告よりもそれぞれ、31 日度および 63 日度大きかった。しかしこの値は、日数に換算すると前者で 1 日、後者で 2 日長いにすぎない。一方、一世代経過所要日数は、 28°C ではタバコでの 30 日 (田中, 1962) と一致し、 20°C ではトマトでの 57 日 (TARJAN, 1952) より 6 日短い。以上の結果より、サツマイモネコブセンチュウの発育に関する有効積算温度は、毛状根と通常の植物体の間で違いはほとんどないと判断される。

毛状根に侵入した線虫の発育速度は $20 \sim 30^{\circ}\text{C}$ の範囲では温度に比例して早くなったが、 32°C ではむしろ低下し、卵嚢生産数および卵嚢当りの卵数も低下する傾向

Fig. 2. Hatched juveniles (arrow) emerged from egg mass (EM) formed on the transformed oriental-melon root 40 days after nematode inoculation on agar plate. Scale bar=1 mm.

Table 1. Effects of temperature on the development of *Meloidogyne incognita* on transformed root culture of oriental-melon

Temperatures (°C)	Days required for the onset of		Number of egg masses produced per petri dish ¹⁾
	egg-laying	hatching	
20	35±4 ²⁾	51±1	10±4
25	23±0	35±1	18±6
27	21±2	30±1	15±3
30	19±1	26±1	12±3
32	24±4	29±2	8±4

1) Transformed roots in Petri dish were inoculated with 100 juveniles.
2) Mean±S.D.

Fig. 3. Relationships between the temperature and developmental rate of *Meloidogyne incognita* and the days required for the onset of oviposition. ●: rate of nematode development. ▲: days required for the onset of oviposition.

Table 2. Comparison of *Meloidogyne incognita* development on the transformed root and on the intact plant roots

Items examined	Trans- formed root	Intact roots of	
		<i>Impatiens balsamina</i> ¹⁾	<i>Trifolium repens</i> ²⁾
Developmental zero (°C)	10.9	12.0	10.1
Day-degree for oviposition	296	265	—
Day-degree for hatching	473	410	410

1) GOTO et al. (1973), field test in Kumamoto, Japan.
2) VRAIN et al. (1978), field test in North Carolina, U.S.A.

Table 3. Egg size and 2nd-stage juvenile's body dimension of *Meloidogyne incognita* recovered from the transformed root (T-group) and from the intact plant root (P-group)

Items examined	T-group	P-group
Egg size ¹⁾		
Long diameter (μm)	74.6± 6.7 ³⁾	71.8± 8.0
Short diameter (μm)	33.3± 2.2	33.0± 1.8
Juvenile's body dimension ²⁾		
Body length (L) (μm)	397.6±24.4	397.1±19.4
L/greatest body width	25.8± 1.9	25.6± 2.1
Tail length (μm)	49.0± 3.1	48.5± 2.9
L/tail length	8.1± 0.5	8.2± 0.3
Tail length /body width at anus	4.7± 0.4	4.6± 0.3
Hyaline tail		
portion length (μm)	11.2± 1.3	10.6± 1.5
Spears length (μm)	13.7± 0.7	13.9± 0.4

1) Number of eggs examined was 125 for T-group and 25 for P-group.
2) Number of juveniles examined was 146 for T-group and 33 for P-group.
3) Mean±S.D.

Table 4. Egg size of *Meloidogyne incognita* produced on the transformed roots of oriental-melon at various temperatures and its correlation coefficient to temperature

Temperature (°C)	Number of eggs examined	Long diameter (μm)	Short diameter (μm)
20	25	70.6±6.7 ¹⁾ a ²⁾	33.2±1.4 a
25	25	71.3±4.3 a	33.1±1.5 a
27	25	73.0±4.9 ab	34.0±2.8 a
30	25	74.9±6.7 b	32.9±2.7 a
32	25	81.9±4.9 c	33.2±1.9 a
Correlation coefficient		r=0.59*** ³⁾	r=-0.13ns

1) Mean±S.D.
2) Data in each column followed by the same letter are not significantly different (p=0.05) according to Student's t-test.
3) ***: Significant at 0.1% level, ns: Non-significant.

Table 5. Measurements of *Meloidogyne incognita* 2nd-stage juveniles produced on the transformed roots of oriental-melon at various temperatures and their correlation coefficients to temperature

Temperature (°C)	Number of juveniles examined	Body length (L) (μm)	L/greatest body width	Tail length (μm)	L/tail length	Tail length/body width at anus	Hyaline tail portion length (μm)	Spear length (μm)
20	28	384.4±30.4 ¹⁾ a ²⁾	24.8±1.9 a	46.6±3.6 a	8.3±0.4 a	4.5±0.3 a	11.0±1.2 ac	13.2±0.4 a
25	34	396.1±11.1 b	25.5±1.4 a	49.6±2.5 b	8.0±0.4 b	4.9±0.3 b	11.5±1.0 a	13.1±0.5 a
27	27	380.9±17.7 a	24.7±1.8 a	47.7±2.8 a	8.0±0.6 b	4.6±0.3 a	10.3±1.2 bc	14.0±0.8 b
30	37	414.5±19.7 c	27.3±1.3 b	50.6±2.5 b	8.2±0.5 ab	4.8±0.3 ab	11.8±1.1 b	13.9±0.5 b
32	20	410.0±21.7 c	26.6±2.0 b	50.1±2.4 b	8.1±0.3 b	4.8±0.3 b	10.7±1.5 bc	13.4±0.7 ab
Correlation coefficient		$r=0.39^{***}$	$r=0.41^{**}$	$r=0.44^{***}$	$r=-0.08^{ns}$	$r=0.27^{ns}$	$r=0.01^{ns}$	$r=0.01^{ns}$

1) Mean±S.D.

2) Data in each column followed by the same letter are not significantly different ($p=0.05$) according to Student's *t*-test.

3) **: Significant at 1% level, ***: Significant at 0.1% level, ns: Non-significant.

Table 6. Infectivity and propagation of *Meloidogyne incognita* population recovered from transformed roots on differential host plants

Differential host plants	Numbers of	
	galls	egg masses
Tobacco (NC 95)	0	0
Cotton (Deltapine 16)	0	0
Pepper (California Wonder)	71	65
Watermelon (Charlston Grey)	23	13
Peanut (Florrunner)	0	0
Tomato (Rutgers)	112	106

Inoculum size: 200 juveniles per pot.

が認められた。サツマイモネコブセンチュウの卵および卵嚢形成は 25~32°C の温度範囲が最適であるという報告 (THOMASON and LEAR, 1961) と 32°C における毛状根の状態から、今回の結果は毛状根が高温域で生育阻害を受けたためと考えられるが、さらに検討する必要がある。

培地中での幼虫の孵化は、産卵開始日より 177 日度で観察された。孵化幼虫を同一ペトリ皿内でさらに培養することも可能である。だが、培養期間が線虫接種後 1 か月以上たつと毛状根の生育が衰え、線虫の生育への影響が懸念されるので、新たな毛状根に移植することが望ましい。

卵および 2 期幼虫の形態測定値は、毛状根で培養した群と通常の植物根で継代した群との間に差異は認められなかった。一方、体長、 a 値および尾長は、温度に依存して変化した。この結果は、卵の長径の温度に依存した変化と一致した。一方、幼虫の最大体幅は一定のまま a 値が変化したことから、温度上昇に従って体長のみが大きくなるといえる。尾部の形態は、 c 値および c' 値が一定なことから、温度に影響されないと判断される。温室

内で継代した P 群の 2 期幼虫の体長、 a 値および尾長は、T 群のそれぞれの値と 20°C および 25°C では類似していた。卵および 2 期幼虫の温度に依存した形態変化が普遍的なものか否かについては、他の線虫を用いた実験を行った上で、さらに検討する必要がある。

判別寄主を用いた調査の結果、毛状根で培養しても線虫の寄生性は変化しないことが認められた。現在までに毛状根を用いてネコブセンチュウを 5 世代継代培養したが、寄生性の変化は認められていない。

植物ホルモン等を含有しない培地中で毛状根は自立的に増殖し、生育の旺盛な根端を新たな培地に移植することで容易に継代できる。また、毛状根は多数の成長点を有し、その成長速度は速いので、培養根組織よりも線虫の大量無菌培養が可能である。滅菌土壤中で栽培した植物根を用いて線虫を大量培養することも可能ではあるが、無菌状態の維持や線虫発育経過の観察には毛状根培養のほうがはるかに有利である。ペトリ皿内で培養した毛状根は、温度等の外的環境の制御が容易で、線虫の生理・生態学的実験に適し、線虫が寄生した毛状根を冷蔵保存して必要時に実験に供試することも可能である。

マクワウリの毛状根を用いた一連の実験の結果、サツマイモネコブセンチュウの生理学的、形態学的、病原学的性質は無菌的培養後にも変化は認められず、本法はネコブセンチュウ類の無菌培養法として適したものと思われる。さらに本法は、ネコブセンチュウの天敵出芽細菌 *Pasteuria penetrans* の培養確立への道を開いたり、無菌培養の利点を活かした生理学的、生化学的および行動生態学的研究にも利・活用できると期待される。

摘 要

国内で分離した *Agrobacterium rhizogenes* 菌により誘導

されたマクワウリ毛状根を用いてサツマイモネコブセンチュウ (*Meloidogyne incognita*) を無菌的に培養するとともに、生育、産卵、卵のサイズおよび幼虫形態に及ぼす温度の影響を調べた。毛状根内に侵入した2期幼虫は、成虫まで成長し、卵嚢を産生した。この卵嚢からは次世代幼虫が孵化遊出した。発育零点は 10.9°C であった。2期幼虫の接種から産卵開始および次世代幼虫の孵化遊出までの有効積算温度は、それぞれ 296 日度および 473 日度であった。毛状根および通常の植物根から得た卵および2期幼虫の測定値に差異は認められなかった。一方、卵の長径および2期幼虫の体長、体長/最大体幅、尾長の測定値は、培養温度によって変化した。ネコブセンチュウの判別寄主に対する寄生性は毛状根で培養した後も変化しなかった。

引用文献

- GAMBORG, O.L., R.A. MILLER and K. OJIMA (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* **50**: 148—151.
- 後藤 昭・佐野善一・皆川 望 (1973) 有効積算温度によるサツマイモネコブセンチュウの侵入時期別発生予察. 九病虫研報 **19**: 124—127.
- KUMAR, A. and J.M.S. FORREST (1990) Reproduction of *Globodera rostochiensis* on transformed roots of *Solanum tuberosum* cv. DESIREE. *J. Nematol.* **22**: 395—398.
- LLOYD, G. and B. McCOWN (1980) Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Int. Plant Propagators' Soc. Combined Proc. for 1980*, pp. 421—427.
- MCCORMICK, S., J. NIEDERMEYER, J. FRY, A. BARNASON, R. HORSCH and R. FRALEY (1986) Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.* **5**: 81—84.
- McKENNA, L.A., R.J. WILLIS and R.D. WINSLOW (1963) Glass tube culture method for assessment of resistance of potatoes to potato root eelworm. *Rec. Agric. Res. Minist. Agric. North. Irel.* **13**: 29—32.
- PAUL, H., C. ZIJLSTRA, J.E. LEEUWANGH, F.A. KRENS and H.J. HUIZING (1987) Reproduction of the beet cyst nematode *Heterodera schachtii* SCHM. on transformed root cultures of *Beta vulgaris* L. *Plant Cell Rep.* **6**: 379—381.
- PEACOCK, F.C. (1959) The development of a technique for studying the host/parasite relationship of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* under controlled conditions. *Nematologica* **4**: 43—55.
- SAVKA, M.A., B. RAVILLION, G.R. NOEL and S.K. FARRAND (1990) Induction of hairy roots on cultivated soybean genotypes and their use to propagate the soybean cyst nematode. *Phytopathology* **80**: 503—508.
- 田中 勇 (1962) サツマイモネコブセンチュウ *Meloidogyne incognita* var. *acrita* CHITWOOD, 1949 の試験. 鹿児島たばこ試験場報告 **10**: 1—42.
- TANAKA, N., M. HAYAKAWA, Y. MANO, H. OHKAWA and C. MATSUI (1985) Infection of turinip and radish storage roots with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep.* **4**: 74—77.
- TARJAN, A.C. (1952) Comparative studies of some root-knot nematodes infecting the common snapdragon, *Antirrhinum majus* L. *Phytopathology* **42**: 641—644.
- TAYLOR, A.L. and J.N. SASSER (1978) Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). N. C. State Univ., Raleigh, 111 p.
- THOMASON, I.J. and B. LEAR (1961) Rate of reproduction of *Meloidogyne* spp. as influenced by soil temperature. *Phytopathology* **51**: 520—524.
- VERDEJO, S., B.A. JAFFEE and R. MANKAU (1988) Reproduction of *Meloidogyne javanica* on plant roots genetically transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *J. Nematol.* **20**: 599—604.
- VRAIN, T.C., K.R. BARKER and G.I. HOLTZMAN (1978) Influence of low temperature on rate of development of *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* larvae. *J. Nematol.* **10**: 166—171.