

Facteurs induisant chez *Meloidogyne incognita* un blocage du développement des œufs considéré comme une diapause

Georges de GUIRAN

I.N.R.A., Station de Recherches sur les Nématodes, 123, boul. Francis-Meilland, 06602 Antibes, France.

RÉSUMÉ

La cinétique de la multiplication de *M. incognita* a été établie sur tomate à 28° (Fig. 1). Le pouvoir d'éclosion des masses d'œufs ainsi produites croît avec leur âge jusqu'à ce que ce dernier atteigne six semaines et décroît ensuite (Fig. 2). Les œufs en diapause apparaissent dès le début de la ponte et leur pourcentage s'élève avec l'âge de la mère (Tab. 1). Ce pourcentage s'accroît également lorsque l'on fait séjourner des masses d'œufs séparées de la femelle soit à basse température (Fig. 3), soit dans des conditions anoxiques par saturation en eau du sol. Par contre le séjour des masses d'œufs dans un sol ou des solutions de polyéthylène-glycol 20 000 à pF 4,2, n'accroît pas le pourcentage de diapause.

Lorsque les femelles pondent dans un sol sec, la gangue gélatineuse des masses d'œufs reste incolore, molle et dilatée, tandis qu'elle brunit, se contracte et durcit très rapidement lorsque la ponte a lieu dans un sol très humide (Fig. 5). Dans ce dernier cas seulement le pourcentage de diapause est plus élevé (Tab. 2).

Enfin, si la diapause n'est pas affectée par une déficience minérale globale de la plante, la défoliation en augmente légèrement le pourcentage (Tab. 3).

SUMMARY

Factors inducing an arrest of development of Meloidogyne incognita eggs considered to be a diapause

Kinetics of multiplication of *M. incognita* have been established on tomato-plant at 28° (Fig. 1). Hatching power of egg masses thus produced increased with their age until this one reached six weeks, and then decreased (Fig. 2). Eggs in diapause appeared at the very beginning of egg-laying and their percentage increased with the age of the mother to represent most of the unhatched eggs after ten weeks (Tab. 1).

When egg masses were separated from the female and chilled at 4°, their hatching power subsequently decreased with the time of chilling, but the percentages of eggs in diapause (undifferentiated embryos) and of unhatchable larvae increased (Fig. 3). The percentage of diapause was also increased by storing the egg masses in water-saturated soil (de Guiran, 1979a : Fig. 6) but *not* in soil or polyethyleneglycol solution at PF 4.2.

Females allowed to lay their eggs in a very dry soil by a split-root technic (Fig. 4 : A) were normally supplied with water through the host plant and produced a colorless, soft and dilated gelatinous matrix (Fig. 5 : A) in the spaces left by the agregation of soil particles. When developed in a water-subsaturated soil (Fig. 5 : B), the gelatinous matrix rapidly turned brown, hard and contracted (Fig. 5 : B) probably under the conjugate effects of the pressure exerted by the uncoherent particles and the action of microorganisms, both favoured by water saturation. Only in the water-saturated soil is the percentage of diapause increased (Tab. 2).

As well as masculinisation, diapause is not affected by a global mineral deficiency of the host plant, but it is slightly increased by defoliation.

Diapause does not therefore require a stress to appear but is enhanced by many stresses, though an artificial mean to remove it remains to be found.

Les *Meloidogyne* compensent leur parasitisme très spécialisé envers les plantes par plusieurs caractères biologiques, en particulier par un grand pouvoir de multiplication : dès 1938, Tyler avait compté plus de 2.800 œufs pondus par une seule femelle. Ces œufs et les larves qui en sont issues présentent une résistance élevée aux contraintes de l'environnement. En outre, une diapause, qui peut seule expliquer la survie dans le sol en l'absence de plantes hôtes et de contraintes climatiques, apparaît au stade d'œuf indifférencié et peut concerner un pourcentage important d'une même ponte de *M. incognita* (de Guiran, 1979b).

Les conditions d'établissement et de levée de cette diapause restent à définir. Ishibashi (1969) signale brièvement que les femelles âgées ou mal nourries pondent des masses d'œufs brunes dont les œufs seraient dormants tandis que les femelles jeunes et bien nourries pondent des masses d'œufs non colorées et dont l'éclosion serait immédiate.

Dans une précédente étude (de Guiran & Bonnel, 1979), aucune relation n'a pu être trouvée entre la richesse du sol en matière organique et le pourcentage de diapause dans les masses d'œufs de *M. incognita*. Pour préciser davantage les conditions qui peuvent induire cette diapause, des masses d'œufs ont été soumises à différents facteurs au cours d'expériences relatées ci-après.

Méthodes générales

Toutes ces expériences ont été conduites sur une souche de *M. incognita* issue d'une seule femelle originaire d'Adiopodoumé (Côte d'Ivoire) et maintenue en élevage en serre à 25-30° sur tomate cv. Montfavet H 63-5. Le même cultivar de tomate a été utilisé dans toute l'étude. Le pourcentage de diapause a été mesuré selon la méthode exposée précédemment (de Guiran, 1979a) : éclosion totale dans une pellicule d'eau déminéralisée à 28° et comptage au microscope des œufs restant après coloration au New Blue R.

Lorsque cela a paru nécessaire, les résultats ont été soumis à l'analyse de variance de Kruskal et Wallis, avec classement par la méthode de Dunn (1964).

Influence de l'âge de la mère

PROCÉDURE

Des plantules de tomate âgées de deux semaines ont été repiquées dans des pots en matière plastique remplis de 500 cm³ d'un mélange de sol sableux et de terreau végétal tamisé à 2 mm et stérilisé au four à 130° pendant douze heures. Deux jours plus tard chaque plantule a été inoculée avec une suspension de 2.000 larves de *M. incognita* âgées de moins de 24 heures. Les pots ont été conservés en chambre climatisée à $28 \pm 0,5^\circ$ avec une photopériode de quinze heures à 6.000 Lux et 70 % d'humidité atmosphérique relative.

Trois, quatre, six, huit et dix semaines après l'inoculation, quatre pots ont été tirés au hasard. Les racines ont été lavées par agitation modérée dans l'eau et les masses d'œufs prélevées sur ces racines. Pour chaque pot, vingt masses d'œufs parmi les plus volumineuses ont été sélectionnées. Dix ont été dissociées par agitation dans du NaClO à 0,5 %, pendant cinq minutes, pour comptage des différents stades et dix ont été mises à éclore pour mesurer le pouvoir d'éclosion et calculer le pourcentage de diapause.

RÉSULTATS

Cinétique de la ponte et de l'éclosion

La figure 1 montre l'évolution des masses d'œufs dans le temps. On voit que dès la troisième semaine la ponte est déjà bien amorcée, la presque totalité des œufs étant encore au stade embryonnaire. Le rythme de ponte est très soutenu entre trois et six semaines, puis s'infléchit et semble s'arrêter après huit semaines. Si l'on compare la composition des masses d'œufs entre huit et dix semaines, on constate que les larves déjà formées ont éclos, mais que très peu d'embryons se sont transformés en larves. La courbe d'éclosion *in vitro* (Fig. 2) présente un maximum à six semaines. A huit et surtout à dix semaines les œufs pleins présents dans les masses d'œufs sont loin d'éclore en totalité. Ceux qui n'éclosent pas sont en majorité des embryons peu différenciés, vivants, considérés comme étant en diapause.

Tableau I

Évolution du pourcentage de diapause au sein de masses d'œufs de *M. incognita* récoltées sur tomate de 3 à 10 semaines après l'inoculation

Evolution of the percentage of diapause within M. incognita egg masses collected on tomato roots from 3 to 10 weeks after inoculation

œufs en diapause	Age des masses d'œufs (semaines)				
	3	4	6	8	10
Nombre par masse d'œufs	9	71	172	434	663
% des œufs pleins	5,4	9	13	38	84
% du total pondu	5,4	7,5	7,6	15	24

RÉSULTATS

La figure 3 montre les résultats obtenus. On voit que l'éclosion diminue progressivement pour ne représenter qu'un faible pourcentage après seize semaines de séjour au froid. Corrélativement, le pourcentage des œufs dont l'éclosion est suspendue augmente. Parmi ces derniers la proportion d'œufs morts reste faible jusqu'à quatre semaines de séjour préalable à 4° et augmente ensuite. Il reste cependant toujours une majorité d'œufs vivants dont l'éclosion est bloquée. Leur pourcentage et, parmi eux, la proportion de larves non écloses, augmentent jusqu'à quatre semaines de séjour préalable au froid, puis se stabilisent. Le séjour au froid augmente par conséquent le nombre des œufs considérés comme étant en diapause (embryons), mais également celui des larves vivantes ayant leur éclosion bloquée.

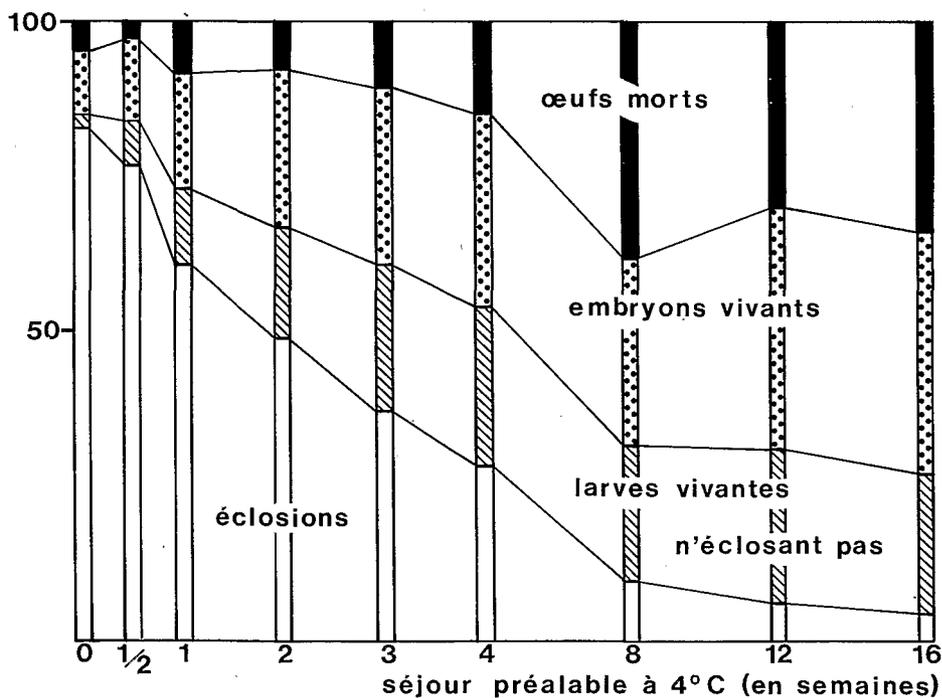


Fig. 3 : Éclosion, arrêt de développement et mortalité des œufs de *M. incognita* préalablement conservés à 4° pendant 1/2 à 16 semaines.

Hatching, arrest of development and mortality of M. incognita eggs previously stored at 4° during 1/2 to 16 weeks.

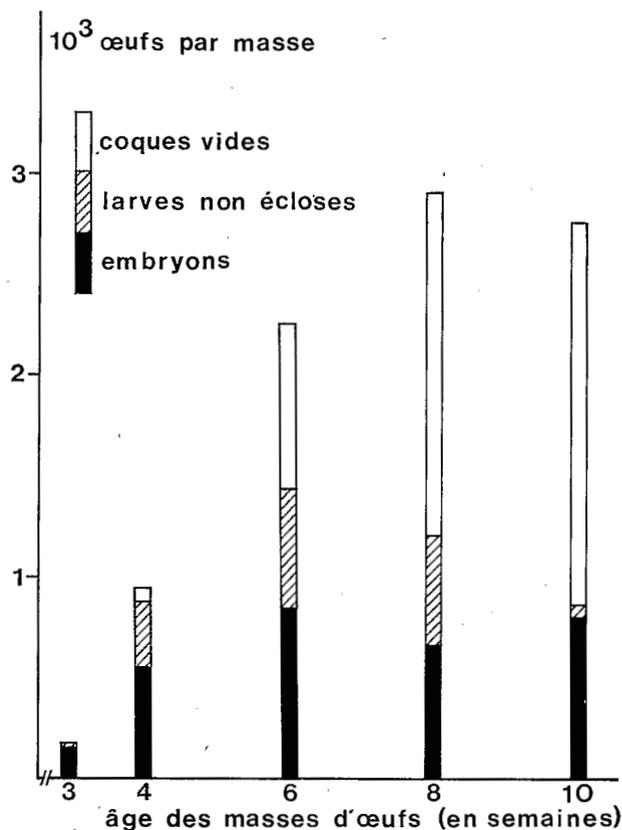


Fig. 1. Composition des masses d'œufs de *M. incognita* récoltées sur tomate de 3 à 10 semaines après l'inoculation.

Composition of *M. incognita* egg masses collected on tomato plants from 3 to 10 weeks after inoculation.

Evolution de la diapause

Le comptage des œufs vivants restant dans les masses d'œufs après la fin de l'éclosion permet en effet de calculer les pourcentages d'œufs en diapause qui sont consignés au tableau 1. On peut constater que, dès le début de la ponte, des œufs en diapause apparaissent. Leur nombre croît avec le temps, ainsi que leur pourcentage par rapport aux œufs pleins, pour atteindre la grande majorité de ceux-ci au bout de dix semaines. Si l'on considère le pourcentage d'œufs en diapause parmi le total des œufs pondus (évalué en dissociant les masses d'œufs), on voit que ce pourcentage reste constant jusqu'à six semaines et augmente ensuite pour atteindre le quart des œufs pondus après dix

semaines. La proportion d'œufs en diapause augmente donc bien avec l'âge des femelles et peut même constituer la majeure partie des œufs pleins en fin de ponte, mais cette diapause apparaît dès le début de la ponte.

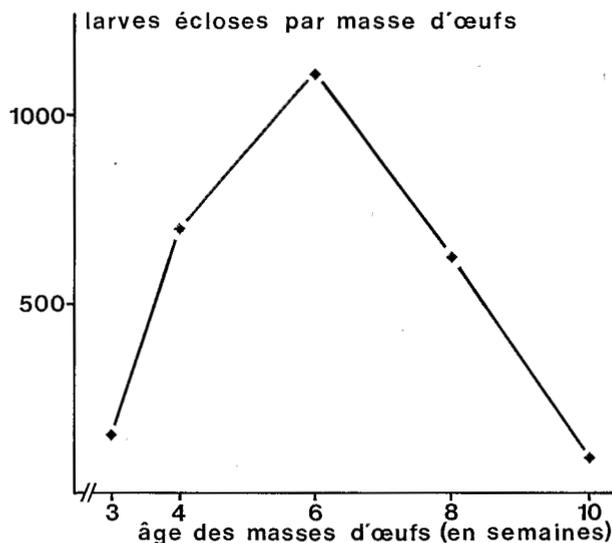


Fig. 2. Pouvoir d'éclosion *in vitro* des masses d'œufs de *M. incognita* récoltées sur tomate de 3 à 10 semaines après l'inoculation.

In vitro hatching power of *M. incognita* egg masses collected on tomato plant from 3 to 10 weeks after inoculation.

Influence des basses températures

PROCÉDURE

Des lots de cinq masses d'œufs âgées de huit semaines sont prélevés au hasard dans un ensemble homogène provenant de l'élevage en serre et déposés sur des tamis de nylon recouverts d'une pellicule d'eau déminéralisée. L'ensemble est conservé à 4°, l'eau étant renouvelée toutes les semaines.

Au bout de zéro (témoin), une demi, une, deux, trois, quatre, huit, douze et seize semaines, quatre lots de cinq pontes sont transférés dans une étuve à 28°, les larves écloses étant comptées chaque jour dans l'eau sous-jacente qui est renouvelée. Vingt et un jours après ce transfert l'éclosion est terminée et le pourcentage de diapause est calculé.

tamis (t) et pénétré dans le compartiment inférieur. L'arrosage est alors interrompu dans le compartiment supérieur où les masses d'œufs vont se développer dans un sol très sec. La plante est alimentée en eau par arrosage du seul compartiment inférieur.

En B (Fig. 4) la plantule de tomate est repiquée et inoculée dans un tube rempli du même mélange. Deux semaines après l'inoculation la base du tube est plongée dans un récipient contenant de l'eau maintenue à niveau constant. L'eau monte dans le tube par capillarité et les masses d'œufs se développent dans un sol pratiquement saturé d'eau.

Quatre dispositifs de chaque type ont été installés dans une enceinte à 28° avec treize heures quotidiennes d'éclairage à 6.000 Lux. Six semaines après l'inoculation, les plants de tomates ont été déterrés et les masses d'œufs prélevées sur leurs racines préalablement lavées avec précaution. Dix masses d'œufs ont été prélevées sur chaque plante pour mesurer leur éclosion journalière et calculer leur pourcentage de diapause.

RÉSULTATS

Contrairement aux données habituelles de la littérature (*in* Franklin, 1978), les masses d'œufs formées dans le sol sec étaient translucides, sans forme définie, avec une gangue gélatineuse molle et dilatée. Au contraire les masses d'œufs développées dans le sol saturé d'eau étaient subsphériques, de couleur brun foncé et leur gangue gélatineuse était dure et contractée (Fig. 5).

Le tableau 2 donne les résultats des comptages d'éclosion et de diapause de ces deux lots de masses d'œufs. On voit que, si les nombres d'œufs pleins ne diffèrent pas significativement, l'éclosion et la diapause, en nombre et en pourcentage, diffèrent au seuil $\alpha = 0,05$. La ponte en sol humide augmente donc le nombre et le pourcentage des œufs considérés comme étant en diapause.

Nutrition de la plante

Afin de préciser le rôle de la nutrition de l'hôte dans le développement du parasite, l'expérience suivante a été réalisée.

Tableau 2

Influence de l'humidité du sol pendant la ponte sur la production, l'éclosion et la diapause des œufs de *M. incognita* (les traitements affectés de la même lettre ne diffèrent pas au seuil $\alpha = 0,05$)

Influence of soil moisture during egg laying on production, hatching and diapause of M. incognita eggs (treatments bearing the same letter do not differ at the level $\alpha = .05$)

	Nombre d'œufs pleins	Eclosion		Diapause	
		Nombre	%	Nombre	%
A. Sol sec	449 a	1 190 a	82 a	178 a	14 a
B. Sol humide	708 a	939 b	55 b	629 b	37 b

PROCÉDURE

Des plantules de tomates, repiquées dans des pots de plastique et inoculées avec *M. incognita*, ont été cultivées dans les conditions suivantes :

A : culture sur sol + terreau ; arrosage à l'eau (témoin).

B : culture sur sol + terreau ; arrosage à l'eau ; défoliation à partir du 28^{ème} jour après l'inoculation.

C : culture sur sable siliceux pur, arrosé avec une solution nutritive minérale pendant vingt jours. Le 21^{ème} jour : lessivage du sol, puis arrosage journalier avec de l'eau déminéralisée.

Huit semaines après l'inoculation, les plants ont été déterrés et les masses d'œufs récoltées pour mesure de l'éclosion et de la diapause.

RÉSULTATS

On peut voir, au tableau 3, que le sevrage des plants de tomate au 21^{ème} jour, s'il diminue le nombre des œufs pleins à la huitième semaine, ne modifie pas le pourcentage de diapause. Par contre la défoliation augmente le nombre et le pourcentage des œufs considérés comme étant en diapause. Bien que non significatif, ce résultat peut être regardé comme une tendance, étant donné la sévérité des tests non paramétriques utilisés.

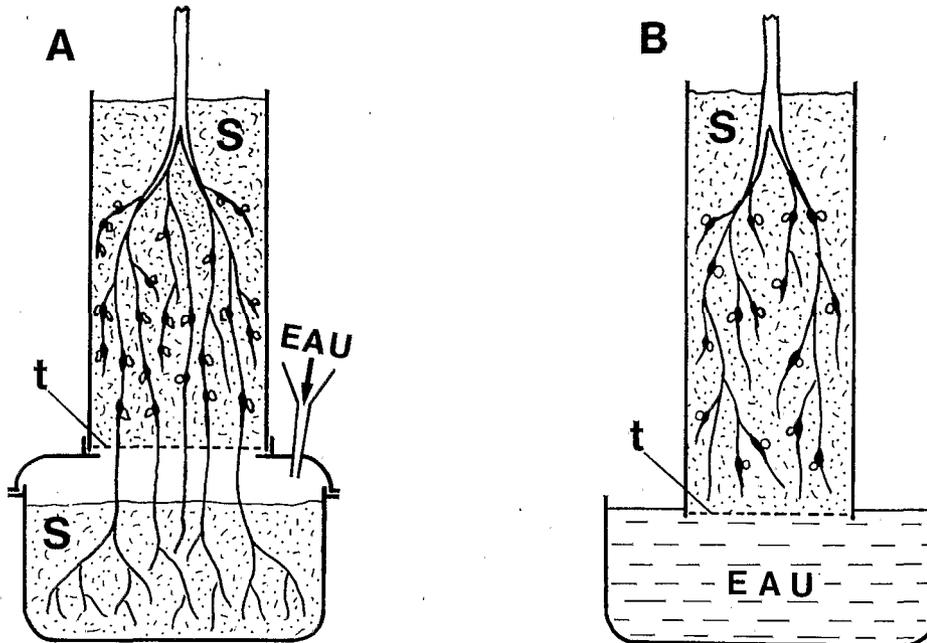


Fig. 4 : Dispositifs permettant aux femelles de *Meloidogyne* de pondre dans un sol sec (A) ou subsaturé d'eau (B). S : sol; t : tamis.

Devices allowing *Meloidogyne* females to lay eggs in dry (A) or water subsaturated (B) soils. S : soil; t : sieve.

Anoxie

L'effet des basses températures est à rapprocher de celui du séjour des masses d'œufs dans un sol saturé d'eau. Au cours d'une expérience identique à la précédente, mais où l'anoxie remplace le froid, il avait été constaté (de Guiran, 1979a : Fig. 6) que la privation d'oxygène résultant de la saturation en eau du sol bloque tout d'abord des larves au stade L₁, puis, si elle se prolonge, augmente le nombre d'œufs considérés comme étant en diapause (embryons indifférenciés).

Humidité du sol pendant la ponte

Dans l'expérience précédente les masses d'œufs avaient été introduites dans le sol saturé d'eau après avoir été récoltées sur les racines où elles s'étaient formées dans des conditions normales. Cette expérience ne renseignait pas sur l'effet de l'humidité du sol pendant la formation de la masse d'œufs. Or, l'attention de

l'auteur avait été attirée par le fait que, dans des élevages en pots, les premières masses d'œufs se formaient au fond du pot, où le sol est généralement plus humide, et que ces masses d'œufs étaient de couleur brun foncé. L'expérience suivante a donc été mise en place pour observer l'effet des valeurs extrêmes de l'humidité du sol sur les masses d'œufs pendant la ponte.

PROCÉDURE

Dans ce but les dispositifs schématisés à la figure 4 ont été réalisés. En A le récipient de culture comprend deux compartiments superposés, remplis d'un mélange de sol et de terreau et séparés par un espace vide d'un cm. Dans le compartiment supérieur, fermé à la base par un tamis de 1,5 mm d'ouverture (t), on repique un pied de tomate âgé de deux semaines; 2.000 larves écloses depuis 24 heures sont déposées le lendemain au voisinage de la plante qui est arrosée normalement pendant deux semaines. Après ce laps de temps les racines ont suffisamment poussé pour avoir traversé le

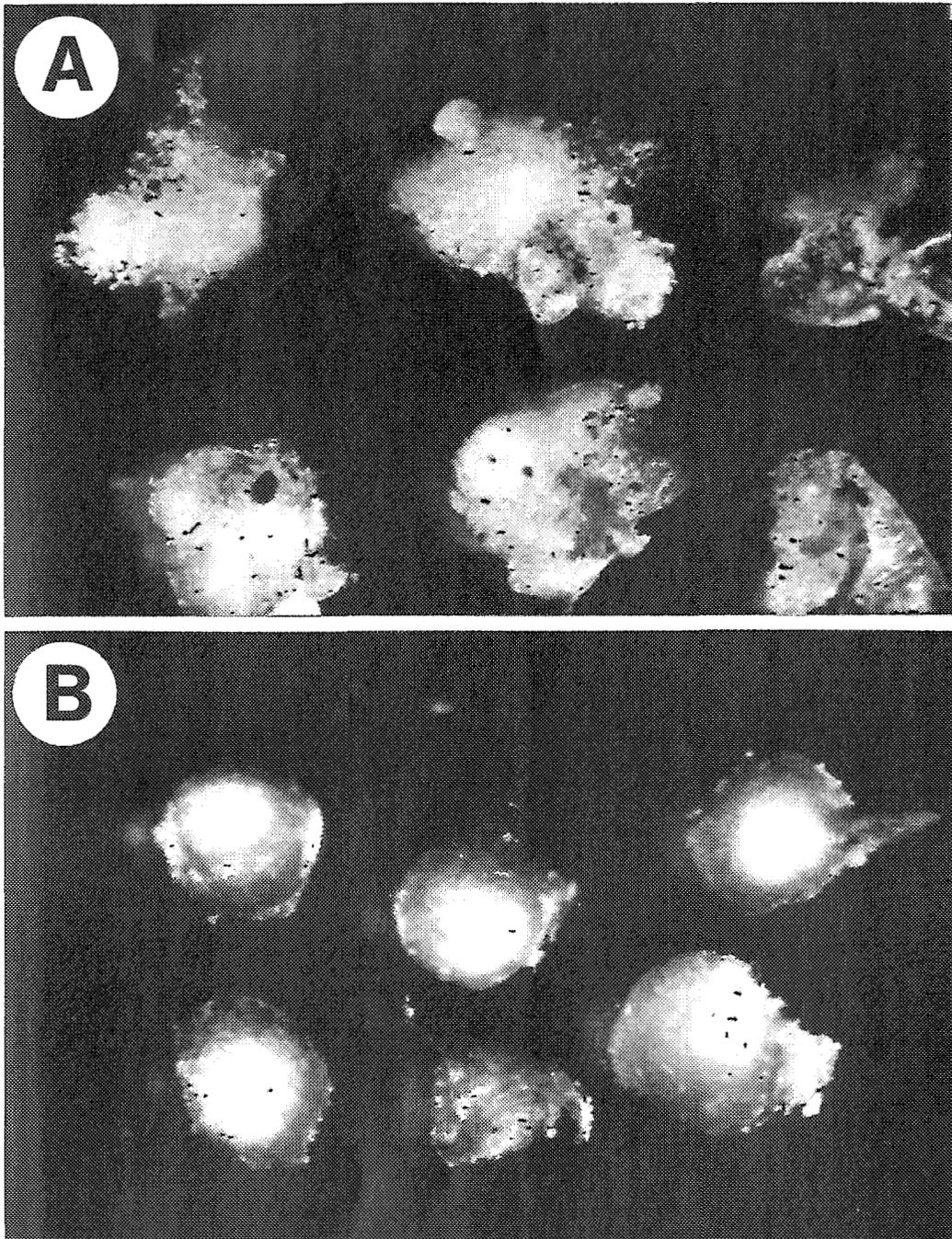


Fig. 5 : Aspect des masses d'œufs de *M. incognita* produites en sol sec (A) ou subsaturé d'eau (B).
Aspect of M. incognita egg masses laid in dry (A) or water subsaturated (B) soils.

Tableau 3

Influence d'un stress nutritif infligé à la plante hôte sur la production, l'éclosion et la diapause des œufs de *M. incognita* (les traitements affectés de la même lettre ne diffèrent pas au seuil $\alpha = 0,05$)

Influence of a nutritive stress on the production, hatch and diapause of M. incognita eggs (treatments bearing the same letter do not differ at the level $\alpha = .05$)

	Nombre d'œufs pleins	Éclosion		Diapause	
		Nombre	%	Nombre	%
A. Sol	1 719 a	1 264 a	73 a	396 ab	23 ab
B. Sol + défoliation	1 539 ab	861 a	56 ab	604 a	39 a
C. Sable + eau	045 b	843 a	81 b	165 b	16 b

Discussion générale

Le pouvoir de multiplication des femelles de *M. incognita* correspond donc bien à celui qu'avait indiqué Tyler (1938) pour l'espèce, inconnue, avec laquelle elle avait travaillé, mais qui appartenait très probablement à l'une des espèces dites « polyphages » de *Meloidogyne* (*arenaria*, *incognita*, *javanica*, voire *hapla*). Le total des œufs pondus avoisine en effet 3.000 par femelle dans des conditions non optimales, la faible contenance des récipients de cultures (500 cm³) ne permettant pas à la plante de prendre tout son développement.

Il est intéressant de noter que les masses d'œufs récoltées dix semaines après l'inoculation ne laissent éclore qu'une faible proportion des œufs « pleins » qu'elles contiennent. La grande majorité des œufs restants sont vivants et bloqués au stade embryonnaire. Ces œufs sont considérés comme étant en diapause (de Guiran, 1979b). Leur proportion à un moment donné, par rapport aux œufs non encore éclos, comme par rapport au total des œufs déjà pondus par une femelle, croît donc bien avec l'âge de cette femelle. Mais il faut souligner que ces œufs en diapause apparaissent dès le tout début de la ponte. Le blocage précoce du développement des œufs n'exige donc pas un stress ou la senescence maternelle, bien que ces conditions le favorisent.

Un stress nutritif appliqué pendant la ponte n'a pas le même effet selon sa nature : une déficience minérale globale reste sans effet, tandis que la défoliation de l'hôte accroît le pourcentage de diapause. Or, il en est de même pour la différenciation sexuelle qui est peu affectée par une déficience minérale (Davide & Triantaphyllou, 1967), tandis que la défoliation masculinise les larves (Triantaphyllou, 1960), de même que la suppression du saccharose en culture monoxène (McClure & Viglierchio, 1966). Il semble donc qu'un déséquilibre glucidique de l'hôte, provoqué entre autre par sa défoliation, entraîne chez le parasite des réactions (masculinisation et induction de diapause), assimilables d'une manière générale à des réactions de défense.

De même les stress physiques diffèrent dans leurs effets sur la diapause des œufs qui n'est pas affectée par la sécheresse du sol, mais augmentée par sa saturation en eau, que ces contraintes soient appliquées pendant la ponte ou *in vitro* sur les masses d'œufs séparées de la femelle. *Des séjours plus ou moins longs dans du sol ou dans des solutions de polyéthylène-glycol 20.000 à pF 4,2 n'ont en effet nullement modifié le pourcentage de diapause des masses d'œufs ainsi traitées.*

Les valeurs extrêmes de l'humidité du sol, lorsqu'elles agissent pendant la ponte, ont en outre un effet sur la gangue gélatineuse (« matrix ») des masses d'œufs. Il faut distinguer ici deux phénomènes : la contraction de la gangue et son tannage aboutissant à une coloration brune. La gangue reste dilatée dans le sol sec et se contracte dans le sol humide pour des raisons probablement mécaniques. Dans le dispositif expérimental utilisé, l'alimentation en eau de la femelle se fait normalement à travers la plante grâce à l'arrosage d'une partie des racines non infectée; ceci permet à la femelle de produire une gangue gélatineuse dilatée qui ressemble à celle que l'on observe dans les cultures monoxènes sur racines excisées et qui prend son plein développement dans les espaces laissés libres entre les particules de sol agglomérées par la sécheresse. Dans le sol saturé il n'y a pas de cohésion entre les particules qui peuvent exercer de ce fait une pression plus uniforme sur les masses d'œufs, aboutissant à leur forme ramassée et subsphérique. Quant

au tannage de la gangue, il est manifestement favorisé par l'humidité régnant autour de la masse d'œufs (ce tannage se produit également dans les cultures monoxènes) et sans doute par l'activité microbienne plus intense dans les sols humides. Si ce brunissement ainsi provoqué s'accompagne d'une augmentation du pourcentage de diapause, il semble que les deux phénomènes soient simplement deux effets d'une cause externe (saturation en eau du sol) et non, comme l'indique Ishibashi (1969), qu'ils soient liés à l'état de la femelle. L'expérience relatée plus haut a montré que l'on peut faire produire indifféremment à des femelles des masses d'œufs blanches ou brunes en modifiant simplement l'humidité du sol.

Enfin, le froid, appliqué à cette souche tropicale dans un but purement expérimental, a montré un effet à peu près similaire à celui de l'anoxie résultant de la saturation en eau du sol, c'est-à-dire une augmentation du nombre d'œufs en diapause. Ceci est à rapprocher des observations de Vrain (1978) qui constate un déficit de développement de 47 à 66 % chez les œufs de *M. incognita* conservés à 10 et 12°. Il se pourrait, comme le souligne cet auteur, que ces œufs soient dans un « stade de repos ». Cependant il reste, comme indiqué précédemment (de Guiran, 1979b), à trouver le moyen de lever artificiellement cette diapause pour obtenir à volonté la reprise du développement des œufs, bloqué au stade embryonnaire.

REMERCIEMENTS

L'auteur tient à exprimer ses remerciements à K. Stawiecki et à L. Bonnel pour la part importante qu'ils ont prise dans la réalisation de ce travail.

Accepté pour publication le 1^{er} octobre 1979.

RÉFÉRENCES

- DAVIDE, R. G. & TRIANTAPHYLLOU, A. C. (1967). Influence of the environment on development and sex differentiation of root-knot nematodes. II. Effect of host nutrition. *Nematologica*, 13 : 111-117.
- DUNN, O. J. (1964). Multiple comparisons using rank sums. *Technometrics*, 6 : 241-252.
- FRANKLIN, M. T. (1978). *Meloidogyne*. In : Southey, J. F. (Ed.) *Plant Nematology*, London H.M.S.O., Edit. Min. Agric. Food Tech. Bull. : 98-124.
- GUIRAN, G. de (1979a). Survie des nématodes dans les sols secs et saturés d'eau : œufs et larves de *Meloidogyne incognita*. *Revue Nématol.*, 2 : 65-77.
- GUIRAN, G. de (1979b). A necessary diapause in root-knot nematodes. Observation on its distribution and inheritance in *Meloidogyne incognita*. *Revue Nématol.*, 2 : 223-231.
- GUIRAN, G. de & BONNEL, L. (1979). Influence de la matière organique du sol sur l'infection de la tomate par *Meloidogyne incognita* et sur la multiplication et la conservation du parasite. *Meded. Fac. Landbouwwet. Riksuniv. Gent*, 44 : 289-297.
- ISHIBASHI, N. (1969). Studies on the propagation of the root-knot nematodes *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, 1949. *Rev. Pl. Prot. Res.*, 2 : 125-128.
- MCCLURE, M. A. & VIGLIERCHIO, D. R. (1966). The influence of host nutrition and intensity of infection on the sex ratio and development of *Meloidogyne incognita* in sterile agar culture of excised cucumber roots. *Nematologica*, 12 : 248-258.
- TRIANANTAPHYLLOU, A. C. (1960). Sex determination in *Meloidogyne incognita* Chitwood, 1949 and intersexuality in *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949. *Annls. Inst. phytopath. Benaki, N. S.*, 3 : 12-31.
- TYLER, J. (1938). Egg output of the root-knot nematode. *Proc. helminth. Soc. Wash.*, 5 : 49-54.
- VRAIN, T. C. (1978). Influence of low temperature on development of *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* eggs in egg masses. *J. Nematol.*, 10 : 311-313.