

# Isolement, identification et caractérisation de souches québécoises du nématode *Caenorhabditis elegans*

Nabil ABDUL KADER et Michel G. CÔTÉ

Institut National de la Recherche Scientifique INRS-Santé, 245, boulevard Hymus, Pointe-Claire (Québec), H9R 1G6, Canada.

Accepted for publication 10 August 1995.

**Résumé** – Quatre-vingt-treize souches du nématode libre du sol *Caenorhabditis elegans* ont été isolées à partir d'échantillons de sol et de matières organiques en décomposition provenant de différents sites du Québec. L'examen morphologique et des croisements avec la souche anglaise « standard » Bristol (N2) ont servi à l'identification des souches. Quelques caractéristiques biologiques (durée du développement œuf-adulte, viabilité, longueur, fécondité à quatre différentes températures) de six souches de *C. elegans* isolées de quatre régions du Québec ont été étudiées. Une étude préliminaire de la sensibilité de ces souches à quatre substances toxiques (la diphénylamine, le pentachlorophénol, le 4-chlorobiphényle et le 2,2'-dichlorobiphényle) a démontré l'existence de différences entre ces souches.

**Summary** – *Isolation, identification and characterization of some strains of Caenorhabditis elegans (Maupas, 1900) from Québec* – 93 strains of the free-living soil nematode, *Caenorhabditis elegans*, have been isolated from soil and organic decaying matter of different sites in Québec. Species were identified based on morphological characteristics and mating with the standard British laboratory strain Bristol (N2). The biological characteristics of six strains selected from four sites have been determined (egg-adult generation time, viability, length and fecundity at four different temperatures). Preliminary study of the sensitivity of these strains to four toxicants (diphenylamine, pentachlorophenol, 4-chlorobiphenyl and 2,2'-dichlorobiphenyl) brought out differences among them.

**Key-words** : *Caenorhabditis elegans*, Canada, fecundity, identification, nematode, Québec, temperature, viability, xenobiotics.

*Caenorhabditis elegans* est une espèce cosmopolite, identifiée dans différentes régions du globe : en Afrique, Algérie (Maupas 1900); en Europe, France (Nigon, 1949), Allemagne (Hirschmann, 1952), Angleterre (Fatt & Dougherty, 1963; Grewal & Richardson, 1991); en Amérique, aux États-Unis, Californie (Emmons *et al.*, 1983); Liao *et al.*, 1983), Wisconsin (Emmons, 1988), Colorado (Anderson & Coleman, 1982) et au Brésil (Risco-Briceno *et al.*, 1988). Par ailleurs, des souches isolées en Australie, à Hawaï (États-Unis), et à Vancouver (Canada) et la plupart des souches citées ci-dessus, ont été étudiées et comparées (Thomas & Wilson, 1991).

Dans la présente étude, nous nous sommes intéressés à la recherche de cette espèce au Québec, région aux conditions climatiques très particulières, à la détermination et la comparaison des caractéristiques des souches québécoises avec celles de souches isolées dans d'autres régions du globe et à leur utilisation comme modèle expérimental pour évaluer les effets des substances toxiques sur l'environnement.

## Matériel et méthodes

### EXTRACTION ET ÉLEVAGE DES NÉMATODES

Des échantillons de sol et de matières organiques en décomposition ont été prélevés dans différents sites de la

région montréalaise, de la Mauricie et de la région de la ville de Québec à l'aide d'une sonde (diamètre 2 cm, longueur 40 cm). L'extraction des nématodes à partir des échantillons a été réalisée par tamisage selon la méthode modifiée de Baerman (Flegg & Hooper, 1970). Les larves se sont déposées au fond de tubes à essai pendant 10-14 heures puis transférées sur des lames à cavités et observées au stéréomicroscope. Les larves présentant une queue effilée et dont la longueur de l'œsophage par rapport à la longueur totale est comprise entre 1/4 et 1/3 sont mises en élevage à 20 °C, sur milieu NGM ensemencé avec la souche OP50 d'*Escherichia coli* (Brenner, 1974).

### RECHERCHE ET IDENTIFICATION DE *C. ELEGANS*

Les nématodes adultes provenant des larves mentionnées ci-dessus ont été transférés et cultivés individuellement. Nous avons observé leurs descendants au microscope et maintenu en élevage les nématodes hermaphrodites autoféconds à vulve médiane présentant deux bulbes œsophagiens (un bulbe médian et un bulbe terminal avec valve) et deux gonades symétriques et réfléchies.

Les spécimens ayant une durée de développement œuf-adulte inférieure à 4 jours ont été croisés avec des mâles de la souche anglaise, Bristol (N2), originaire du « *Caenorhabditis* Genetics Center ». Dans les élevages

avec plus de 30 mâles hybrides, ces mâles ont été croisés avec des hermaphrodites de chacune des souches parentales.

Par ailleurs, des mâles, produits spontanément par certaines des souches que nous avons isolées, ont été maintenus par croisement avec des hermaphrodites de la souche dont ils provenaient. Nous avons examiné les bourses copulatrices au microscope et réalisé des croisements entre mâles de ces souches et hermaphrodites de la souche N2 et d'autres souches isolées localement. Des croisements entre mâles hybrides obtenus et hermaphrodites des souches parentales ont été également réalisés.

#### DÉTERMINATION DES CARACTÉRISTIQUES DES SOUCHES ISOLÉES

##### *Souches utilisées et conditions d'élevage*

Six souches québécoises (Nab 17, Nab 10, Basi 11, Basc 9, Basc 3 et Phil 3) isolées au cours de ce travail ainsi que la souche N2 ont été élevées en conditions monoxéniques. Cinq hermaphrodites adultes appartenant à une souche et contenant plusieurs œufs et embryons sont désinfectés pendant 2 min dans un mélange extemporané d'hypochlorite de sodium alcalin et de tampon M9 (1V/1V les concentrations finales de NaOCl et de NaOH sont 2,5 % et 0.8M respectivement), puis rincés dans du tampon M9 et transférés dans des boîtes de Petri contenant du NGM partiellement ensemencé avec la souche OP50 d'*E. coli*. Les nématodes sont déposés sur la partie non ensemencée du milieu. Après 16 à 24 heures d'incubation à 20 °C, la gélose ayant reçu les nématodes désinfectés est éliminée. Les larves nouvellement écloses, ayant migré vers le tapis bactérien, ont été transférées à l'âge adulte dans de nouvelles boîtes de Petri. Pour la caractérisation des souches, nous avons réalisé les cultures dans des boîtes de Petri de 60 ou de 35 mm de diamètre pour les élevages en milieux toxiques, renfermant respectivement 8,5 ml ou 5 ml de NGM et ensemencé, après 1-1,5 jour de solidification, soit avec 150 µl ou 100 µl d'une suspension bactérienne d'*E. coli*, OP50 cultivée à 37 °C ± 0,5 °C en incubateur, et âgée de 14-16 heures, soit avec une colonie bactérienne ayant servi à ensemencer 20 ml de milieu LB liquide. Les cultures des nématodes ont été réalisées après 1-1,5 jour de croissance bactérienne sur NGM.

##### *Détermination de la durée du développement œuf-adulte*

Quarante ou 60 embryons peu divisés ont été mis en culture à 20 °C et observés, chacun, une seule fois au bout d'une durée d'incubation comprise entre 54 et 72 heures. Dans chaque cas, les nombres d'adultes ayant des œufs, d'adultes sans œufs et de larves ont été déterminés et la durée du développement œuf-adulte avec œufs a été calculée.

##### *Détermination de la longueur des nématodes*

Des jeunes hermaphrodites élevés à 20 °C et ayant un ou deux œufs ont été tués en chauffant la gélose sur la

flamme d'une lampe à alcool. Ce traitement donne des nématodes à habitus rectiligne mesurés au stéréomicroscope à l'aide d'un micromètre oculaire.

##### *Reproduction*

Des jeunes adultes avec un ou deux œufs, issus de jeunes adultes âgés de 3-3,5 jours, ont été mis en élevage individuel à 20 °C et transférés sur des nouveaux milieux toutes les 12 heures et pendant 3 jours. Nous avons déterminé, immédiatement après le transfert, le nombre d'œufs pondus, et après 3-3,5 jours d'incubation, le nombre d'adultes présents dans chaque boîte.

Par ailleurs, nous avons transféré aux températures de 10 °C, 25 °C et 26 °C des œufs pondus à 20 °C par des jeunes adultes. Au bout de 10,5-11 jours d'incubation à 10 °C et de 2 jours d'incubation à 25 °C ou 26 °C, nous avons mis en élevage individuel et aux mêmes températures dix hermaphrodites adultes. Des transferts sur des nouveaux milieux ont été réalisés chaque jour pendant 2 jours pour les cultures à 25 °C et 26 °C et tous les 3 jours pendant 9 jours pour les cultures à 10 °C. Le nombre de survivants adultes après 3 jours d'incubation à 25 °C ou 26 °C et après 14 jours d'incubation à 10 °C est déterminé. De plus, en suivant cette méthode, les nombres de descendants adultes après trois générations d'élevage continu à 10 °C et cinq générations d'élevage continu à 26 °C ont été déterminées.

##### *Sensibilité de nématodes à des substances toxiques contaminants de l'environnement*

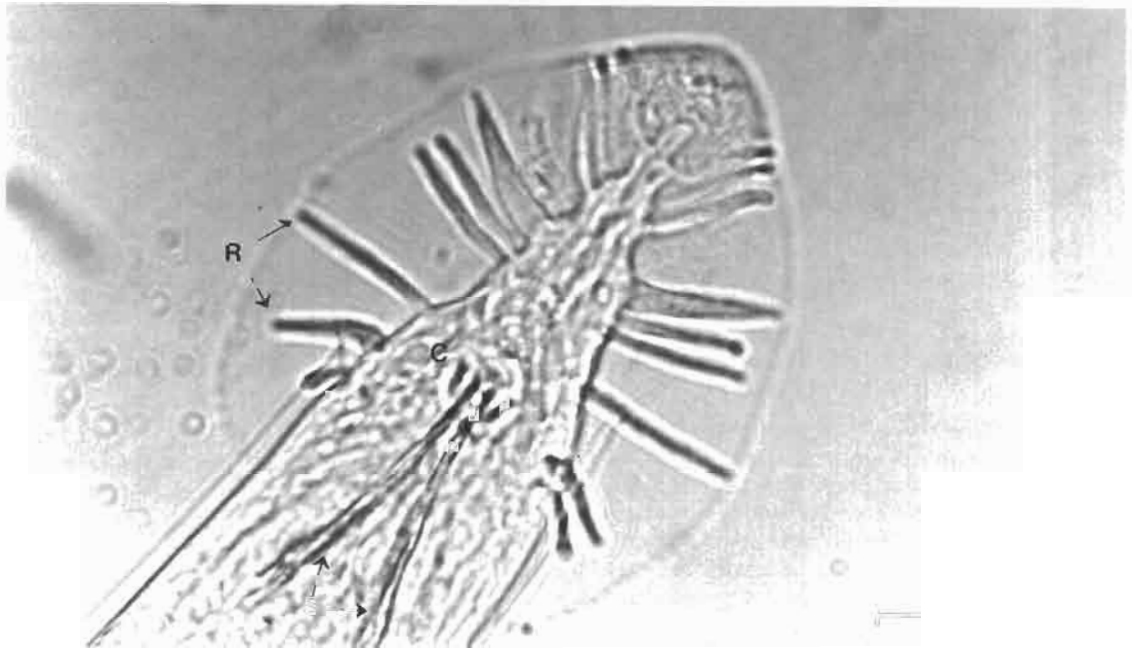
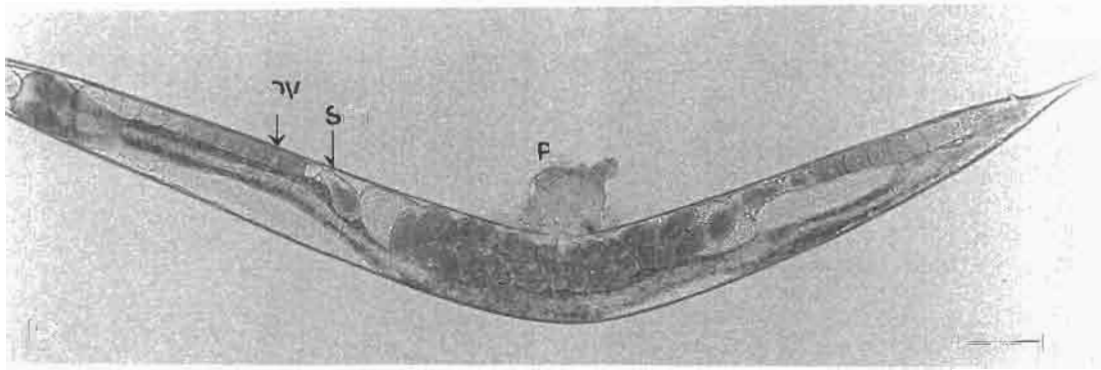
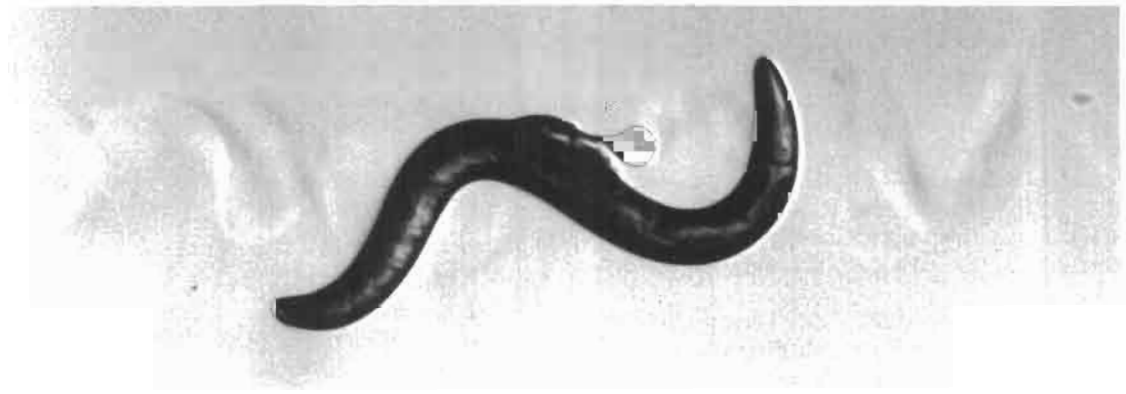
Des substances toxiques, contaminants prioritaires de l'environnement en Amérique du Nord et représentant un risque pour l'environnement et la santé humaine, ont été choisies pour tester la sensibilité des souches de *C. elegans*, selon la méthode suivante : des solutions de diphénylamine (Sigma) à 1 µg/µl d'éthanol, de pentachlorophénol (Aldrich) à 5 µg/µl d'éthanol, de 4-chlorobiphényle à 50 µg/µl de diméthylsulfoxyde, de 2,2'-dichlorobiphényle à 25 µg/µl de diméthylsulfoxyde (Chromatographic Specialities Inc.), de l'éthanol ou du diméthylsulfoxyde ont été incorporés dans différents milieux gélosés maintenus à 50 °C ± 1 °C. Après agitation, les milieux gélosés ont été versés dans des boîtes de Petri de 35 mm de diamètre. Cinquante embryons peu divisés ont été transférés sur chaque boîte de Petri, après 1-1,5 jour d'ensemencement. Deux répétitions ont été réalisées dans chaque cas. Après 4 jours d'incubation à 20 °C, les nombres des survivants adultes ont été déterminés.

## Résultats

### ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE SOUCHES QUÉBÉCOISES DE *C. ELEGANS*

Nous avons maintenu en culture 161 souches hermaphrodites autofécondes. Les croisements de 136 de ces souches avec des mâles de la souche N2 ont donné, dans 93 cas, des résultats positifs (présence de plus de





**Tableau 1.** Caractéristiques de souches de *Caenorhabditis elegans* isolées au Québec et de la souche anglaise Bristol (N2). Comparaison des résultats deux à deux par le test de Drunn (Q), le test de Student-Newman-Keuls (t) et le test comparaison de % (Z).

Souches	Durée du dévelop. œuf-adulte (h)	Longueur totale (µm)	Viabilité (%)	Fécondité
Nab 17	58,7 ± 0,6 (n = 60)	955 ± 16 (n = 32)	96,30 ± 0,78 (n = 2 270)	264,3 ± 13,9 (n = 20)
Nab 10	59,6 ± 0,5 (n = 40)	927 ± 13 (n = 35)	96,28 ± 0,78 (n = 2 285)	295,5 ± 15,2 (n = 20)
Basi 11	60,3 ± 0,7 (n = 60)	845 ± 14 (n = 32)	93,00 ± 1,08 (n = 2 157)	247,1 ± 13,9 (n = 10)
Basc 9	64,4 ± 0,8 (n = 40)	1 024 ± 13 (n = 38)	96,61 ± 0,74 (n = 2 272)	299,5 ± 17,5 (n = 10)
Basc 3	66,2 ± 0,7 (n = 40)	1 020 ± 20 (n = 31)	89,56 ± 1,32 (n = 2 078)	252,6 ± 14,9 (n = 19)
Phil 3	61,7 ± 0,2 (n = 60)	929 ± 16 (n = 34)	95,96 ± 0,89 (n = 1 881)	248,6 ± 20,7 (n = 18)
Bristol (N2)	63,3 ± 0,6 (n = 40)	1 037 ± 18 (n = 34)	n.d.	349,1 ± 18,6 (n = 20)
	(Q)	(Q)	(Z)	(t)
Nab 17-Nab 10	1,094 +	1,554 +	0,035 +	4,184
Nab 17-Basi 11	3,400	5,031	4,895	1,883 +
Nab 17-Basc 9	9,476	3,911	0,568+	3,854
Nab 17-Basc 3	11,258	3,527	8,748	1,552 +
Nab 17-Phil 3	5,444	1,467	0,566 +	2,048 +
Nab 17-N2	9,178	4,469	n.d.	11,373
Nab 10-Basi 11	1,947 +	3,589	4,872	5,300
Nab 10-Basc 9	7,652	5,628	0,602 +	0,438 +
Nab 10-Basc 3	9,278	5,145	8,701	5,682
Nab 10-Phil 3	3,775	0,077 +	0,534	6,121
Nab 10-N2	7,380	6,150	n.d.	7,188
Basi 11-Basc 9	6,435	9,154	5,430	4,969
Basi 11-Basc 3	8,217	8,519	3,973	0,595 +
Basi 11-Phil 3	2,044 +	3,639	4,075	0,162 +
Basi 11-N2	6,137	9,577	n.d.	11,169
Basc 9-Basc 3	1,627 +	0,204 +	9,256	5,093
Basc 9-Phil 3	4,607	5,507	1,106 +	5,472
Basc 9-N2	0,272 +	0,687 +	n.d.	5,431
Basc 3-Phil 3	6,389	5,035	7,684	0,512 +
Basc 3-N2	1,899 +	0,853 +	n.d.	12,778
Phil 3-N2	4,309	6,029	n.d.	13,117

**Tableau 2.** Évolution des taux (%) et nombre total de descendants adultes des hermaphrodites étudiés au cours de 3 jours de reproduction à 20 °C, sur milieu NGM ensemencé avec la souche OP50 d'Escherichia coli. Les hermaphrodites adultes ont été transférés toutes les 12 h dans de nouvelles boîtes de Petri.

	% de descendants adultes						Nombre total de descendants adultes produits n
	Jour 1		Jour 2		Jour 3		
	1 <sup>re</sup> moitié	2 <sup>e</sup> moitié	1 <sup>re</sup> moitié	2 <sup>e</sup> moitié	1 <sup>re</sup> moitié	2 <sup>e</sup> moitié	
Nab 17	20,97 ± 1,48	29,33 ± 1,66	30,74 ± 1,68	13,75 ± 1,25	4,46 ± 0,75	0,76 ± 0,32	5286
Nab 10	16,86 ± 1,34	26,69 ± 1,59	30,60 ± 1,66	21,51 ± 1,48	3,36 ± 0,65	1,01 ± 0,36	5910
Basi 11	19,55 ± 1,55	32,09 ± 1,82	32,17 ± 1,82	12,77 ± 1,30	3,02 ± 0,67	0,40 ± 0,25	2471
Basc 9	16,06 ± 1,32	29,75 ± 1,64	30,65 ± 1,65	19,93 ± 1,43	3,21 ± 0,63	0,40 ± 0,23	2995
Basc 3	19,57 ± 1,59	31,24 ± 1,86	25,30 ± 1,74	14,89 ± 1,43	5,44 ± 0,91	3,56 ± 0,74	4799
Phil 3	15,14 ± 1,52	29,43 ± 1,94	32,58 ± 1,99	18,48 ± 1,65	2,54 ± 0,67	1,83 ± 0,57	4475
N2	11,67 ± 0,75	22,16 ± 0,97	21,80 ± 0,97	25,29 ± 1,02	12,39 ± 0,77	6,69 ± 0,59	6982

**Tableau 3.** Nombres moyens de descendants adultes par hermaphrodites élevés à 10, 25, et 26 °C, sur milieu NGM ensemencé avec la souche OP50 d'Escherichia coli.

Souches	Températures				
	10 °C		25 °C	26 °C	
	F <sub>0</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>0</sub>	F <sub>0</sub>	F <sub>4</sub>
Nab 17	34,1 ± 12,74	49,7 ± 11,98	125,3 ± 10,60	48,6 ± 14,52	62,7 ± 9,60
Nab 10	64 ± 23,30	32* ± 7,26	111,9 ± 21,82	51,5 ± 11,42	28,4 ± 17,93
Basi 11	31,3 ± 11,70	15,2* ± 6,40	128 ± 17,26	65,4 ± 17,11	57,6 ± 6,93
Basc 9	56,1 ± 26,74	34,1* ± 9,98	115,4 ± 22,00	29,2 ± 14,04	0
Basc 3	35,8 ± 12,97	34,5 ± 13,30	64,4 ± 12,14	9,3 ± 3,31	0
Phil 3	43,8 ± 29,07	33,3 ± 9,86	117,7 ± 21,74	48,2 ± 14,71	6,2 ± 7,00
N2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Moyenne ± intervalle de confiance à 95 %; n = 10; n.d. = non déterminé.  
\* La valeur 15,2 est significativement inférieure ( $P \leq 0,01$ ) aux valeurs 32 et 34,1.



probablement, à des facteurs génétiques, étant donné que les cultures ont été réalisées dans les mêmes conditions pour toutes les souches (culture monoxénique standardisée sans contamination fongique ou bactérienne) et que les différences concernant, au moins, deux des caractéristiques déterminées (longueur réduite de la souche Basi 11 et sensibilité accrue de la souche Phil 3 aux diphénylamine, pentachlorophénol et 4-chlorobiphényle et des souches Nab 17 et Nab 10 au 2,2'-dichlorobiphényle) persistent après plus de 250 générations de culture individuelle au laboratoire (non publié).

La longueur réduite (845  $\mu\text{m}$ ) des nématodes Basi 11 est voisine de celle des deux souches mutantes naturelles (a [770  $\mu\text{m}$ ] et b [870  $\mu\text{m}$ ]) étudiées par Dion et Brun (1971) et mesurées par Ouazana (1975). Et elle est comparable à la longueur de la souche thermosensible Qbts qui est de 500 et 800  $\mu\text{m}$  respectivement à 20 °C et 13 °C (Abdul Kader & Brun, 1979).

Les températures limites de croissance et de reproduction de la plupart des souches québécoises étudiées dans ce travail sont 10 °C et 26 °C. Cela est similaire aux résultats obtenus par Lyons *et al.* (1975) qui démontrent que *C. elegans* ne peut tolérer des températures inférieures à 10 °C et aux résultats obtenus par Hirsch et Vanderslice (1976) et Byerly *et al.* (1976) qui montrent que la souche N2 ne peut pas se maintenir à des températures supérieures à 26,5 °C. Toutefois la fécondité, à 25 °C de la souche N2 (170 œufs/hermaphrodite) déterminée par Byerly *et al.* (1976) est supérieure à celle des souches québécoises étudiées. Les souches Basc 9 et Basc 3 se sont montrées plus sensibles à la chaleur que les autres souches étudiées. Toutefois, elles sont plus résistantes que la souche française Bergerac qui ne peut pas se maintenir à des températures supérieures à 24,5 °C (Brun, 1966; Abdul Kader & Brun, 1978).

Les résultats obtenus dans ce travail concernant la durée du développement, la longueur et la fécondité, à 20 °C, de la souche N2 sont très comparables à ceux déjà obtenus par d'autres auteurs travaillant chez cette même souche. En effet, la durée moyenne du développement œuf-adulte avec œuf (63,3 h) observée dans ce travail est très voisine de celle obtenue par Byerly *et al.* (1976), étant donné que ces auteurs ont trouvé que le début de la ponte a lieu à l'âge de 65 h et que la ponte commence 1-2 heures après l'apparition d'œufs dans l'hermaphrodite. La longueur moyenne (1037  $\mu\text{m}$ ) des nématodes de la souche N2 que nous avons mesurés est très voisine de celle (1060  $\mu\text{m}$ ) obtenue par Byerly *et al.* (1976) chez des nématodes âgés de 1-2 heures de plus. Quant à la fécondité moyenne (349  $\pm$  19 descendants adultes), elle est très comparable à la valeur (327  $\pm$  28) obtenue par Hodgkin et Barnes (1991) et ce en transférant les nématodes adultes une *vs* deux fois par jour (présente étude). Néanmoins une fécondité plus faible a été observée par Byerly *et al.* (1976) mais en transférant les nématodes adultes toutes les 4 heures.

Dans les tests de toxicité, la souche Phil 3 s'est montrée plus sensible que les autres souches à la diphénylamine, au pentachlorophénol et au 4-chlorobiphényle, alors que les souches Nab 17 et Nab 10 sont plus sensibles au 2-2'-dichlorobiphényle. Ainsi, la résistance au 2,2'-dichlorobiphényle pourrait dépendre de facteurs différents de ceux de la résistance aux trois autres molécules xénobiotiques. Des études sont en cours pour élucider les facteurs et les mécanismes de résistance.

## Conclusion

Le présent travail démontre pour la première fois que le nématode *C. elegans* est présent dans différentes régions du Québec et que des différences concernant certaines caractéristiques biologiques et physiologiques existent entre les souches étudiées.

## Remerciements

Nous remercions très sincèrement Mme le Professeur Andrée G. Roberge et MM. les Professeurs Gaston Chevalier et Sam Cooper pour leurs conseils; ainsi que Mmes Monique Julien et Diane Lacoste pour le soin qu'elles ont su mettre pour la présentation du manuscrit. La souche Bristol (N2) nous a été aimablement fournie par le *Caenorhabditis* Genetics Center de l'Université de Missouri, USA. Ce travail a été financé par l'Institut National de la Recherche Scientifique (fonds internes de recherche).

## Références

- ABDUL KADER, N. & BRUN, J. (1978). Induction, detection and isolation of temperature-sensitive lethal and/or sterile mutants in nematodes. I. The free-living nematode *Caenorhabditis elegans*. *Revue Nématol.*, 1 : 27-37.
- ABDUL KADER, N. & BRUN, J. (1979). A temperature-sensitive mutant of *Caenorhabditis elegans* var. Bergerac affecting morphological and embryonic development. *Genetica*, 51 : 81-92.
- ANDERSON, R. V., & COLEMAN, D. C. (1982). Nematode temperature responses. A niche dimension in populations of bacterial-feeding nematodes. *J. Nematol.*, 14 : 69-76.
- BARKER, D. M. (1994). Copulatory plugs and paternity assurance in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Anim. Behaviour*, 48 : 147-156.
- BRENNER, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77 : 71-94.
- BRUN, J. (1966). L'adaptation aux températures élevées chez un nématode : *Caenorhabditis elegans* Maupas 1900. I. L'adaptation et son évolution. *Annls. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, 6 : 127-158.
- BYERLY, L., CASSADA, R. C. & RUSSELL, R. L. (1976). The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. I. Wild-type growth and reproduction. *Dev. Biol.*, 51 : 23-33.
- DION, M. & BRUN, J. L. (1971). Genetic mapping of the free-living nematode *Caenorhabditis elegans* Maupas 1900, var. Bergerac. I. Study of two dwarf mutants. *Mol. gen. Genetics*, 112 : 133-151.



- DUSENBERY, D. B., SHERIDAN, R. E. & RUSSEL, R. L. (1975). Chemotaxis-defective mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 80 : 297-309.
- EMMONS, S. W., YESNER, L., RUAN, K. S. & KATZENBERG, D. (1983). Evidence for a transposon in *C. elegans*. *Cell*, 32 : 55-65.
- EMMONS, S. W. (1988). The genome. In : Wood, B. W. (Ed.). *The nematode Caenorhabditis elegans*. New York, USA, Cold Spring Harbor Monograph Series, 17 : 47-79.
- FATT, H. V. & DOUGHERTY, E. C. (1963). Genetic control of differential heat tolerance in two strains of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 141 : 266-267.
- FLEGG, J. J. M. & HOOPER, D. J. (1970). Extraction of free-living stages from soil. In : Southey, J. F. (Ed.). *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes*. London, UK, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food : 5-22.
- FRIEDMAN, P. A., PLATZER, E. G. & EBY, J. E. (1977). Species differentiation in *Caenorhabditis briggsae* and *Caenorhabditis elegans*. *J. Nematol.*, 9 : 197-203.
- GREWAL, P. S., RICHARDSON, P. N. & WRIGHT, D. J. (1990). Effects of killing, fixing and mounting methods on taxonomic characters of parthenogenetic adult female *Caenorhabditis elegans* (Nematoda : Rhabditidae). *Revue Nématol.*, 13 : 437-444.
- GREWAL, P. S. & RICHARDSON, P. N. (1991). Effects of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda : Rhabditidae) on yield and quality of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Ann. appl. Biol.*, 118 : 381-394.
- HIRSCHMANN, H. (1952). Die Nematoden der Wassergrenze mittelfränkischer Gewässer. *Zool. Jahrb., Syst.*, 81 : 313-407.
- HIRSH, D. & VANDERSLICE, R. (1976). Temperature-sensitive developmental mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.*, 49 : 220-235.
- HODGKIN, J. & BARNES, T. M. (1991). More is not better : brood size and population growth in a self-fertilizing nematode. *Proc. R. Soc. London, (Biol.)*, 246 : 19-24.
- LIAO, L. W., ROSENZWEIG, B., & HIRSH, D. (1983). Analysis of a transposable element in *C. elegans*. *Proc. natn. Acad. Sci. USA*, 80 : 3585-3589.
- LYONS, J. M., KEITH, A. D. & THOMASON, I. J. (1975). Temperature-induced phase transitions in nematode lipids and their influence on respiration. *J. Nematol.*, 7 : 98-104.
- MAUPAS, E. F. (1900). Modes et formes de reproduction des nématodes. *Archs Zool. exp. gén.*, 8 : 463-624.
- NIGON, V. (1949). Les modalités de reproduction et le déterminisme du sexe chez quelques nématodes libres. *Annls Sci. nat., Zool.*, 11 : 1-132.
- NIGON, V., & DOUGHERTY, E. C. (1949). Reproductive patterns and attempts at reciprocal crossing of *Rhabditis elegans* Maupas 1900, and *Rhabditis briggsae* Dougherty and Nigon, 1949. (Nematoda : Rhabditidae). *J. exp. Zool.*, 112 : 485-503.
- OUAZANA, R. (1975). *Étude génétique, physiologique et morphologique du nanisme dumpy chez le nématode hermaphrodite Caenorhabditis elegans variété Bergerac*. Thèse de Doctorat de 3<sup>e</sup> cycle, Université Claude Bernad-Lyon I, Lyon, France, 47 p.
- RISCO-BRICENO, S. H., DA SILVA, G. S., SANTOS, J. S. & DE MORAIS, A. L. (1988). Preliminary observations on two species of parasitic nematodes in *Mahanarva posticata* stal (Homoptera : Cercopidae) on sugarcane, in Alagoas State (Brazil). *Anais Soc. ent. Brasil*, 17 : 97-112.
- THOMAS, W. K. & WILSON, A. C. (1991). Mode and tempo of molecular evolution in the nematode *Caenorhabditis* : Cytochrome oxidase II and Calmodulin sequences. *Genetics*, 128 : 269-279.
- VAN DER KNAAP, E., RODRIGUEZ, R. J. & FRECKMAN, D. W. (1993). Differentiation of bacterial-feeding nematodes in soil ecological studies by means of arbitrarily-primed PCR. *Soil Biol. Biochem.*, 25 : 1141-1151.