

## PREMIERE CARACTERISATION MORHOMETRIQUE DE *Ditylenchus gigas* n.sp DANS LA REGION DE BISKRA

INESSE SAADI<sup>(1)</sup>, HALIMA BENBOUZA<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup>Faculty of Exact Sciences and Sciences of Nature and Life, Department of Agricultural Sciences, University of Biskra, BP 145 RP, Biskra, 07000, Algeria.

<sup>(2)</sup>Batna University 1 Hadj Lakhdar. Institute of Veterinary Sciences and Agronomic Sciences. Department of Agronomy  
halima.benbouza@univ-batna.dz

### RESUME

La protection des cultures menacées par le genre *Ditylenchus* requière une identification correcte et précise aussi bien des espèces que des races biologiques afin de mettre en place les stratégies adéquates de lutte intégrée. Par conséquent, les spécimens de nématodes doivent être identifiés en utilisant aussi bien des mesures morpho métriques que moléculaires. En Algérie, l'identification des espèces du genre *Ditylenchus* se base uniquement sur l'aspect d'observations morphologiques. Dans la présente étude, 8 critères biométriques couramment utilisés pour définir les espèces du genre *Ditylenchus* furent effectués pour déterminer l'espèce et la race de *Ditylenchus* présent sur les cultures de fève (*Vicia faba*) dans la région de Biskra.

Les résultats obtenus sur base des caractères morphologiques typiques pour l'identification de ce nématode constituent une preuve scientifique de l'existence de l'espèce *Ditylenchus gigas* n. sp. en Algérie. En effet, cette nouvelle espèce de nématodes, signalée comme race géante depuis plusieurs années, est décrite ici, pour la première fois en Algérie, comme *Ditylenchus gigas* n. sp. sur la base des résultats d'analyse de plusieurs populations collectées à partir des champs de fèves (*Vicia faba*) dans une région aride à l'Est Algérien (Biskra). Dès lors, cette identification et confirmation de l'existence de cette espèce impliquerait une nouvelle approche pour une lutte intégrée plus appropriée.

**MOTS CLES:** *Ditylenchus gigas*, *Vicia faba*, Nématodes, morpho-métriques, Algérie.

### 1 INTRODUCTION

Le nématode de la tige *Ditylenchus dipsaci* (Kühn, 1857) Filipjev, 1936 est parmi les phytonématodes qui représentent une grande importance économique. Le nématode de tige est considéré en Algérie et au niveau mondial comme un facteur limitant du développement des cultures de légumineuses et particulièrement celle de la fève (Esquibet, et al., 1998, Sellami et al., 1998, Esquibet et al., 2003, Saadi, 2008). C'est un endoparasite obligatoire présent dans les parties aériennes des plantes (tiges, feuilles et fleurs) mais qui attaque aussi les bulbes, les tubercules, et rhizomes d'environ 500 espèces végétales. Il se nourrit des tissus parenchymateux de la tige, provoquant un retard de croissance, de l'enflure et des déformations importantes des plantes (Sturhan and Brzeski, 1991). L'Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes (OEPP) a listé *D. dipsaci* comme un organisme de quarantaine A2 dans de nombreux pays de cette région (OEPP, 2009). Ce nématode résiste facilement à des températures sous zéro en hiver, et jusqu'à 55°C, sous le sol, en été, et voire même pendant des décennies. Il peut être isolé, même de la matière végétale complètement sec après humidification (Sturhan and Brzeski, 1991).

Le genre *Ditylenchus* est caractérisé par la présence d'une trentaine de races. Récemment, de nouvelles espèces ont été distinguées du complexe *D. dipsaci* (Sturhan and Brzeski, 1991, Subbotin et al., 2005) et ont donné lieu à des désignations de *D. gigas* (Vovlas et al., 2011, Chizhov et al., 2010). En effet, la race normale est diploïde et le nombre de chromosomes est de  $2n = 24$ , alors que la race géante, parasitant la fève, est tétraploïde à  $2n = 48-60$  (Sturhan and Brzeski, 1991, Vovlas et al., 2011, Tanhaet et al., 2013). De plus, les expériences de croisements avec des races de diploïdes *D. dipsaci* stricto sensu et la race géante ont montré que les hybrides F1 étaient stériles. Ces résultats ont conduit (Sturhan and Brzeski, 1991) à conclure que la race géante devrait donc être reconnue comme une espèce distincte.

De même, il a été souligné par de nombreux auteurs que *D. gigas* se compose d'un certain nombre de races et populations dont les préférences de l'hôte à différents stades de la spéciation à l'isolement reproductif biologiques offre des variances, ce qui représente un statut d'espèce différente (Sturhan and Brzeski, 1991). Les analyses phylogénétiques des séquences d'ADN r de gènes de différentes populations et de races, (Subbotin et al., 2005) ont confirmé que *Ditylenchus dipsaci* représenté un complexe d'espèces, qui

comprend au moins sept espèces, tandis que d'autres espèces ne sont pas encore correctement étudiées et décrites. En effet, l'utilisation de la PCR- polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) (Wendtet al 1993) l'analyse des séquences des transcrits interne d'espaceur (ITS) de l'ARN ribosomique ont aussi confirmé que la race géante de *D. dipsaci* est une espèce différente de la race normale (Subbotinet al., 2005). Les résultats de de l'analyse moléculaire des séquences d'ADNr incluant la région ITS1-5.8S-ITS2, le fragment D2-D3 du gène 28S et 18S, ont confirmé que l'ancienne race géante de *D. dipsaci* de *Vicia faba*, est une nouvelle espèce *D. gigas* n. sp. Différente de *D. dipsaci* sensu stricto (Tanhaet al., 2013).

Il est confirmé que seuls *D. dipsaci* sensu stricto et *Ditylenchus gigas* infectent les fèves, et ont une importance économique en tant que parasites des plantes (Sellamiet al., 1998, Subbotinet al., 2005). En effet, la race géante du nématode de la tige a été enregistrée comme une maladie grave de la fève dans plusieurs pays européens et africains riverains de la mer Méditerranée et en Iran en 2013 (Tanhaet al., 2013). En outre, plusieurs auteurs ont noté que la race géante est généralement plus dommageable, car elle provoque des symptômes plus sévères au champ de fèves que toutes les autres races de *D. dipsaci* et produit des graines plus infestées, et cela malgré qu'elle semble avoir une gamme d'hôtes limitée (Goodey, 1941, Hooper, 1971, Sikora and Greco, 1990, Sturhan and Brzeski, 1991, Vovlaset al., 2011, Tanhaet al., 2013).

En Algérie, la présence de ce nématode de tige a été signalée pour la première fois, sur base uniquement d'observations visuelles, par Debray et Maupas en 1896. Il est toujours considéré comme la plus redoutable sur fève et il est présent dans la quasi-totalité des parcelles de fève dans toutes les zones de production du pays, et demeure ainsi une menace sérieuse sur cette culture (Di vito et al., 1994, Sellami and Bousnina, 1996, Saadi, I 2008).

À l'heure actuelle, plusieurs stratégies de lutte contre les parasites *Ditylenchus* sont utilisées en combinant des diagnostics moléculaires précis et fiables, un système efficace de rotation des cultures, ainsi que les mesures de quarantaine (OEPP, 2008), ou encore application de pesticides nématicides (OEPP, 2008). En conséquence, la connaissance de la race biologique est souvent souhaitable surtout quand les mesures de rotation des cultures sont prises en considération. En plus, une détection précise et l'identification des espèces de *Ditylenchus* ainsi que la connaissance de la variabilité pathogénique des populations sur le terrain est cruciale pour le contrôle réglementaire de lutte, ainsi que pour la reproduction et le développement de cultivars résistants (Madaniet al., 2015). Dans la présente étude, notre objectif était de faire une caractérisation morpho-métrique sur des nématodes, isolés d'individus infectés, prélevés sur des régions à grande production de culture de fève (*Vicia faba*) afin de déterminer la race biologique de *D. dipsaci* présente, *D. dipsaci* sensu stricto ou bien *D. gigas*.

## 2 MATERIELS ET METHODES

### 2.1 Echantillonnage et extraction des populations de nématodes

Les prospections ont été faites sur plusieurs sites de cultures de fève dans la région de Biskra présentant les symptômes d'infection par les nématodes. Les symptômes au niveau des plantes consistaient en des nécroses de couleurs marron et rougeâtre par endroits, sur plusieurs plantes. Quand l'attaque était intense on a constaté un gonflement des tissus qui prennent un aspect spongieux. Des nécroses observées débutaient au niveau du collet, et s'étendaient sur toute la tige. Une altération de la coloration du feuillage et des fleurs malformations et distorsion des plants avec un raccourcissement des entre-nœuds, ont été aussi observés comme décrit par (Stuteville et al., 1990, Cauble and Esquibet, 1995). Les feuilles infestées ont souvent un aspect froissé, les froissements sont limités aux parties entre les nervures. Sur la base de ces symptômes observés sur terrain, des échantillons de plantes infectées ont été prélevés et analysés au laboratoire. Les tiges ont été lavées pour éliminer la terre et les débris adhérents. Ensuite, elles ont été coupées en pièces de ~2 cm avec une paire de ciseaux et placés dans le fond d'une boîte de pétri avec un peu d'eau. Par la suite, les tissus ont été déchirés à l'aide d'aiguilles montées et de pinces pour libérer les nématodes qui s'y trouvaient pour une observation immédiate de la présence des nématodes au binoculaire. Après 5-6 h, les nématodes qui ont émergé ont été utilisés pour des observations morphologiques et des mesures morphométriques (Figure 1).

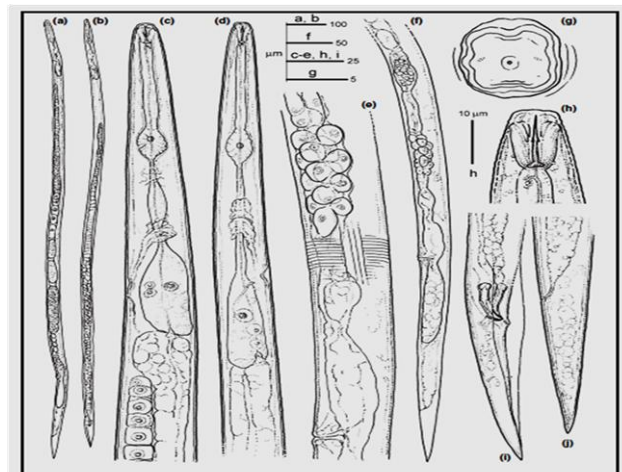


Figure 01 : Schemas des différentes parties de *Ditylenchus gigas*. n. sp, a. Femelle, b. Mâle. c. Appareil digestif (gland lobe), e. Appareil reproducteur femelle, f. Spermatheca (femelle), g: Vue de face coté tête, h. Stylet; i. Appareil reproducteur mâle (spicule), j. Vulve- anus femelle

## 2.2 L'examen morphologique

Pour le diagnostic et l'identification de la race de nématodes de tige, ces derniers ont été extraits des plantes infestées, et montés dans la gélose (Esser, 1986). Les spécimens adultes ont également été traités dans le glycérol dans des montages permanents, selon la méthode de einhorst (1966). L'examen morpho-diagnostic a été effectué grâce à un appareil photo 35 mm, monté sur un microscope composé (Reichart-Jung) équipé avec un contraste différentiel d'interférence (DIC) optique. Les mesures morphométriques ont été effectuées grâce à un logiciel fourni avec le microscope (Leica Application Suite (LAS)). Au total, nous avons réalisés 8 mesures morphométriques sur 20 nématodes femelles et 18 nématodes mâles pour chaque nématode (mâle et femelle).

## 3 RESULTATS ET DISCUSSIONS

### 3.1 Observations des symptômes sur les plantes de fève infectées sur les sites prospectés

Les spécimens de la race géante du nématode de la tige, prélevés dans la zone de Biskra, ont provoqués chez les plantes de fève échantillonnées plusieurs symptômes décrits dans la littérature comme étant ceux provoqués par *D. giga* à savoir: un gonflement important et la déformation des tissus de la tige avec des lésions ayant une couleur brun rougeâtre, et à des endroits cette couleur a viré au noir. Les lésions de la tige prenaient de l'ampleur et ont atteint des longueurs allant jusqu'à 8 cm, et souvent, elles ont atteint le bord d'un entre nœud. Les pétioles nécrosés étaient

également évident, mais ceci peut être confondu avec les symptômes induits par des agents pathogènes fongiques des feuilles. Nous avons, aussi, observés quelques infections graves tuent souvent les principales pousses, et stimulent la formation de barres secondaire, c'est ce qui a été aussi rapporté (Volvaset al., 2011).

### 3.2 Les résultats morpho métriques

#### 3.2.1 Les résultats des mesures morpho métriques sur des spécimens femelles

Le nombre de sujets analysés dans la région de Biskra est de 20 nématodes. La longueur totale pour les spécimens femelles étudiés est de  $1815.9 \pm 82.9 \mu\text{m}$  (Tableau 1). Ces moyennes sont relativement plus grandes que celles obtenues par (Volvas et al., 2011) sur des spécimens prélevés dans les trois régions du bassin méditerranéen (Italie, Liban et Espagne). Les caractéristiques morphologiques et morpho métriques (longueur totale et distance vulve queue) sont en accord aussi avec ceux publiés par (Tanha et al., 2013, Volvas et al., 2011). De même que pour la longueur du stylet qui est de  $12.2 \pm 0.4 \mu\text{m}$  (Figure 2(a, b, et h)).

Les distances du pharynx à la fin du gland lobe sont de l'ordre de  $240.2 \pm 3.2 \mu\text{m}$ . Ceux de la tête à l'anus sont de  $162 \pm 17.2 \mu\text{m}$ . Pour le kyste ovulaire, la distance de la vulve à l'anus est de  $230 \pm 21.1 \mu\text{m}$  (Figure 2.b). En ce qui concerne la longueur de la queue nous avons relevé  $88.2 \pm 6.5 \mu\text{m}$  chez les nématodes de Biskra (Figure 2 g).

Tableau 01: Les mesures morpho métriques (femelles et mâles) des nématodes extraits de *Vicia faba* cultivée dans la région de Biskra

Paramètres mesurés	Spécimen femelle	Spécimen mâle
Nombre d'individu	20	18
Longueur totale	$1815.9 \pm 82.9$ (1653-1927)	$1624.7 \pm 107.6$ (1462-1947)
Longueur stylet	$12.2 \pm 0.4$ (11.5-12.9)	$11.6 \pm 0.5$ (10.7-12.4)
Distance Vulve - queue	$84.2 \pm 1.0$ (81-87)	$73.4 \pm 8.1$ (62.3-85.7)
Pharynx ( gland lobe - queue)	$240.2 \pm 3.2$ (234-245)	$212.7 \pm 7.9$ (200-226)
Distance Vulve-anus	$230 \pm 21.1$ (201-264)	-
Distance vulve-queue(PUS)	$132 \pm 14.5$ (96-157)	-
Longueur queue	$88.2 \pm 6.5$ (76.1 – 98.7)	$82.2 \pm 6.7$ (72.6 – 91.2)
Longueur Spicule	-	$25.3 \pm 1.5$ (22.9- 27.7)
A	$42.2 \pm 2.2$ (38.6 – 46.0)	$42.2 \pm 2.2$ (39.2 – 46.8)
B	$8.1 \pm 0.4$ (7.3- 8.6)	$8.1 \pm 0.6$ (7.0 – 9.2)
b'	$7.5 \pm 0.3$ (6.9 – 8.1)	$7.6 \pm 0.6$ (6.7 – 8.9)
C	$20.7 \pm 1.8$ (17.7 - 24.1)	$19.9 \pm 2.1$ (16.4 – 23.5)
c'	$4.8 \pm 0.7$ (3.4 - 6.6)	$4.6 \pm 0.6$ (3.8 – 5.6)

a Toutes les mesures sont en  $\mu\text{m}$ , sauf indication contraire.

a= longueur du corps / largeur maximale du corps

b = longueur du corps / longueur œsophagienne

c = longueur du corps / longueur de la queue

#### 3.2.2 Les résultats morpho métriques des nématodes mâles

Le nombre de spécimens mâles étudiés était de 18 nématodes. La longueur totale moyenne des mâles mesurés est de  $1524.7 \pm 107.6 \mu\text{m}$ . Nous avons observés que tous les paramètres morphologiques mesurés dans le cadre de cette étude sont relativement semblables à ceux des spécimens femelles, à l'exception des paramètres du système reproducteur (spermatheque et vulve). Ces derniers

sont légèrement plus étroits que le reste du corps comme indiqués par d'autres auteurs (Tanhaet al, 2013, Vovlas et al2011). La longueur moyenne du stylet est de  $12.2 \pm 0.4 \mu\text{m}$  (Figure2. a,c, et h). Celle du pharynx à la fin du gland lobeestde l'ordre de  $212.7 \pm 7.9\mu\text{m}$ . La longueur du spiculeest de  $25.3 \pm 1.5$  (Tableau 1).

### 3.2.3 Synthèse des résultats morpho métriques

La race *D. gigas* n.sp., se distingue de tous les autres espèces de *Ditylenchus* par plusieurs caractéristiques morphologiques. Le caractère diagnostique majeur et discriminant est la longueur du corps (Vovlas, et al., 2011).

En effet, les résultats obtenus sur les longueurs de corps des nématodes étaient de  $1815.9 \pm 82.9 \mu\text{m}$  (1653-1927) pour les nématodes femelles et de  $1624.7 \pm 107.6 \mu\text{m}$  (1462-1947) pour les mâles, ce qui indique clairement des valeurs supérieures à celles citées par (Vovlas et al., 2011) pour *D. giga*. En fait, ces derniers, ont observés chez les nématodes prélevés à Noci, Bari en Italie avec des moyennes de la longueur du corps qui étaient de  $(1780 \pm 97.4 \mu\text{m})$  (1561-1932) pour les femelles et de  $1557 \pm 98.2 \mu\text{m}$  (1373-1716) pour les mâles. Un autre paramètre discriminatoire entre les deux espèces est la distance de la vulve- anus où les résultats obtenus par Tanha et al., (2013), étaient de  $217 \pm 21.0 \mu\text{m}$  (178-272) contre ceux de la population de nématodes femelle mesurés à Biskra avec  $230 \pm 21.1$  (201-264).

Aussi, pour la longueur du stylet, les résultats obtenus par (Vovlas et al., 2011) étaient de  $12.0 \pm 0.4 \mu\text{m}$  (11.5-13.0) pour les femelles et de  $11.6 \pm 0.4 \mu\text{m}$  (11.0-12.5) pour les mâles. Par contre, les nématodes issus de la région de Biskra, les valeurs ont varié de  $12.2 \pm 0.4 \mu\text{m}$  (11.5-12.9) pour les sujets femelles et de  $11.6 \pm 0.5 \mu\text{m}$  (10.7-12.4) pour les sujets mâles.

Pour la longueur de la queue nos résultats montrent des valeurs supérieures chez les spécimens femelles que celles obtenues par (Tanhaet al., 2013). En effet, les longueurs étaient de  $88.2 \pm 6.5 \mu\text{m}$  (76.1 – 98.7) pour les femelles, alors que celles des spécimens d'Iran elles étaient de  $86.4 \pm 9.4 \mu\text{m}$  (66 to 102  $\mu\text{m}$ ). Pour ce qui est des spécimens mâles les longueurs étaient presque identiques, avec  $82.2 \pm 6.7 \mu\text{m}$  (72.6 – 91.2  $\mu\text{m}$ ) et  $86.5 \pm 8.5 \mu\text{m}$  (71 to 95  $\mu\text{m}$ ), respectivement pour les spécimens de Biskra et l'Iran (Tanhaet al., 2013). De fortes similitudes ont été observées pour la longueur du spicule à partir des données cités par Vovlas et al., (2013), pour des nématodes prélevés au Liban avec  $25.5 \pm 0.8 \mu\text{m}$  (24.5-26.0), à Cordoba en Espagne avec  $25.0 \pm 1.0 \mu\text{m}$  (24-26), et en Italie avec  $24.8 \pm 0.8 \mu\text{m}$  (24-26), comparés à ceux des nématodes échantillonnés à Biskra avec  $25.3 \pm 1.5 \mu\text{m}$  (22.9-27.7). La comparaison des différentes valeurs de paramètres morphométriques, obtenus pour des nématodes mâles et femelles, cités par (Tanhaet al., 2013 et Vovlas et al., 2011) avec les nôtres démontrent bien que l'ensemble des caractères étudiés se rapprochent et définissent les individus recueillis sur *Vicia faba* à Biskra comme étant *Ditylenchus gigas* et non *Ditylenchus dipsaci* sensu stricto.



**Figure 02:** Les différentes mesures morphométriques réalisées sur les nématodes. a. Mesure du stylet de *D. gigas* b. Portion postérieure de la femelle, c. Metacorpustylet; d. Femelle *Ditylenchus gigas*, e. Organe postérieure reproducteur (spicule) male, f. Vulve, Spermatheca. g. Mesure de la queue, h. Metacorpustylet

## 4 CONCLUSION

La morphométrie multicritères est une des techniques de diagnostic ou d'analyses en nématologie pouvant conduire à l'identification précise et spécifique de la race de nématode. La description d'espèces de nématodes et particulièrement de la race géante de *Ditylenchus dipsaci* se base sur ces mesures morphométriques. Bien que la technique ne demande pas beaucoup de moyens (extraction et observation au binoculaire). En Algérie, le genre *Ditylenchus* est uniquement identifié en examinant la morphologie sommairement. Dans cette population locale étudiée du genre *Ditylenchus*, les nématodes adultes étaient considérablement plus importants que ceux couramment observés ce qui rend la reconnaissance des races une tâche très difficile,

Dans le cadre de cette étude, les résultats obtenus à partir de populations de *D. dipsaci* recueillies sur *V. faba* en région aride (Biskra) concordent avec ceux obtenus dans d'autres études sur des nématodes récoltés au sud de l'Italie, de l'Espagne et du Liban, (Vovlas et al., 2011) ainsi qu'en Iran (Tanha, et al., 2013). Néanmoins, il est incontournable de corroborer ces résultats morphométriques avec des analyses moléculaires des séquences d'ADNr incluant la région ITS1-5.8S-ITS2, le fragment D2-D3 du gène 28S et 18S.

## REFERENCES

- [1] Posey, C. J., Hsing, P. S. (1938). Hydraulic jump in trapezoidal channel, Engineering News Record. pp. 797-798.
- [2] Brzeski, M. W., 1991- *Ditylenchus Filipjev* 1936 (Nematoda: Anguinidae), Revu Nématol., Instytut warzywnictwa, 96-100 Keimiewice poland., vol.14 (1), pp9-59.
- [3] Castillo P , Vovlas N , Subbotin S , Trocoli A , 2003 . Un nouveau nématode cécidogène , *Meloidogyne baetica* n. sp. (Nematoda: Heteroderidae), parasitant l'olive sauvage dans le sud de l'Espagne . Phytopathologie 93 , 1093 - 102 .
- [4] Cauble.G.,Esquibet.M.,1995- Le nématodes des tiges en culture de légumineuses., Phytoma La défense des végétaux., N°476 Octobre.,pp.25-30
- [5] Chizhov VN, Borisov BA, Subbotin SA, 2010. A new stem nematode, *Ditylenchus weischeri* sp. n. (Nematoda: Tylenchida), a parasite of *Cirsium arvense* (L.) Scop. in the central region of the non-chernozem zone of Russia. Russian Journal of Nematology 18, 95-102.
- [6] Debray F , Maupas EF , 1896 . Le *Tylenchus* devastatrix Kühn et la maladie vermiculaire des fèves en Algérie . Algérie Agricole , 55 p.
- [7] Di vito M ;Greco N.; Halila H.M. ; Mabsoute L. ; Labdi M. ; Beniwal s Et solh, m.b.1994.Nematodes of cool season food legumes in North Africa Nematol. medit. 22 : 3-10;
- [8] Esquibet M., Grenier E., Plantard O., Abbad Andaloussi F., Caubel G. (2003): DNA polymorphism in the stem nematode *Ditylenchus dipsaci*: development of diagnostic markers for normal and giant races. Genome, 46: 1077-1083
- [9] ]Esquibet M., Bekal S., Castagnone-Sereno P., Gauthier J.P., Rivoal R., Caubel G. (1998): Differentiation of normal and giant *Vicia faba* populations of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci*: agreement between RAPD and phenotypic characteristics Hérédité 81 , 839 - 50 .
- [10] Esser RP , 1986 . A water agar en face view technique. Proceedings of the Helminthological Society of Washington 53, 254-.
- [11] Goodey T, 1941. Observations on a giant race of the stem eelworm *Anguillulina dipsaci*, attacking broad beans, *Vicia faba* L. Journal of Helminthology 19, 114-22.
- [12] Hooper DJ, 1971. Stem eelworm (*Ditylenchus dipsaci*), a seed and soil-borne pathogen of field beans (*Vicia faba*). Plant Pathology 20,25-7.
- [13] Hooper DJ , 1984 . Observations sur le nématode de la tige, *Ditylenchus dipsaci* , haricots attaquants, *Vicia faba*. Rapport de la station expérimentale de Rothamsted pour 1983 , 239 - 60 .
- [14] Madani, M. Tenuta, Vladimir N. Chizhov and Sergei A. Subbotin 2015 :Diagnosics of stem and bulb nematodes, *Ditylenchus weischeri* and *D. dipsaci* (Nematoda: Anguinidae), using PCR with species-specific primers, . Can. J. Plant Pathol., 2015. Vol. 37, No.2, 212-220, <http://dx.doi.org/10.1080/07060661.2015.1035754>
- [15] ]Mahfouz M. M. Abd-Elgawad ;2014 :Yield losses by Phytonematodes: challenges and opportunities with special reference to Egypt.Egypt. J. Agronomatol., Vol. 13, No.1, PP. 75-94 (2014)
- [16] OEPP,2009 Liste A1 et A2 des organismes nuisibles recommandés pour la réglementation en tant qu'organismes de quarantaine . En ligne [<http://www.eppo.org/QUARANTINE/quarantine.htm>].
- [17] Saadi, I (2008) Analyse des semences de fève (*Vicia faba*) infestées par *Ditylenchus dipsaci* (Nematode ; Anguinidae) et recherche d'une méthode de lutte contre ce nématode. Thèse de magister 72 P ENSA ,El Harrach Alger.
- [18] Sellami S.,Bousnina Z , et Bacha F., 1998. Nématofaune associée à la fève et plante -hôtes du nématode des tiges : *Ditylenchus dipsaci* Kuhn ( Filipjev). Dans ACTES: Sémin ppNat sur légumineuses alimentaires à Ain Temouchent. 211-218.
- [19] Sellami S., et Bousnina Z., 1996 : Distribution de *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn) Filipjev 1936 dans l'Est Algerien. Réhabilitation of Faba bean, Ed. Actes Rabat (Maroc). 202p
- [20] Sikora RA et Greco N, 1990: Nematode parasites of food legumes. Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. Wallingford, UK: CAB International, 181-235.
- [21] Sturhan D, Brzeski MW, 1991: Stem and bulb nematodes, *Ditylenchus* spp. In: NickleWR, ed. Manual of Agricultural Nematology. New York, USA: Marcel Dekker, 423-64.
- [22] Stuteville, D. L, and ErY\Tin, D. C. (eds.) 1990: Compendium of alfalfa disease, 2nd ed. APS press. St Paul, MN.
- [23] Subbotin SA, Madami M, Krall E, Sturhan D, Moens M, 2005: Molecular diagnostics, taxonomy and phylogeny of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* species complex based on the sequences of internal transcribed spacer-rDNA. Phytopathology 95, 1308-15
- [24] Tanha Maafi Z and Majd Taheri Z, First Report of the Giant Stem Nematode, *Ditylenchus gigas*, from Broad Bean in Ira PLANT DISEASE. July 2013, Volume 97, Number 7 Pages 1,005.3 - 1,005.3
- [25] Vovlas N, A. Troccoli, J. E. Palomares-Rius, F. De Luca, G. Liebanas, B. B. Landa, S. A. Subbotin and P. Castillo. 2011: *Ditylenchus gigas* n. sp. parasitizing broad bean: a new stem nematode singled out from the *Ditylenchus dipsaci* species complex using a polyphasic approach with molecular phylogeny.plant pathology doi:10.1111/j.1365-3059.2011.02430.x.
- [26] Wendt, Alexander and Michael Barnett (1993) "Dependent state formation and Third World militarization," Review of International Studies, 19, 321±347.