

- da en lotes tabacaleros de Chicoana (Salta). *In: XXI Congreso Argentino de la Ciencias del Suelo* (San Luis). 589pp.
5. Diez J., Toncovich M.E. & Rodríguez M.B.. 2010. Dinámica del fósforo y el potasio en suelos fertilizados bajo cultivo de tabaco Virginia en Chicoana (Salta). *In: XXII Congreso Argentino de la Ciencias del Suelo*. 447pp.
 6. Hudson B.D. 1994. Soil organic matter and available water capacity. *Journal of Soil and Water Conservation* 49 (2): 189-194.
 7. InfoStat. 2008. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
 8. Karaivazoglou NA, DK Papakosta & S Divanidis. 2005. Effect of chloride in irrigation water and form of nitrogen fertilizer on Virginia (flue-cured) tobacco. *Field Crop Research* 92, 61-74.
 9. Nadir A., Osinaga R., Zapater M.A. & Mattalia M.C.. 2004. Diagnóstico para el programa de desarrollo para pequeños productores tabacaleros. Administración Fondo especial del tabaco, Secretaría de la producción. Salta, Argentina. 80 pp.
 10. Pierik R., Voesehek L., Kroon H., and Visser E.J.W.. 2004. Density - induced plant size reduction and size inequalities in ethylene - sensing and ethylene - insensitive tobacco. *Plant Biology* 6: 201-205.
 11. Quiroga I.R. & Corvalán E.R.. 1988. Análisis químico de suelos y de aguas. 1º Curso para auxiliares de laboratorio – Zona Norte. EEA Salta. 101pp.
 12. Salehzade H., Mogaddam A.F., Bernosi I, hiyas M., and Amini R.. 2009. The effect of irrigation regimes on yield and chemicals quality of oriental tobacco in West Azerbaijan. *Biological Sciences* 4 (5): 632-636.
 13. Sifola M.I., and Postiglione L. 2003. The effect of nitrogen fertilization on nitrogen use efficiency of irrigated and non-irrigated tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Plant and Soil* 252: 313-323.
 14. Tso T.C. 1990. Production, Physiology, and Biochemistry of Tobacco Plant. Institute of International Development & Education in Agricultural and Life Sciences (Maryland, USA). 753pp.

Herramientas moleculares para la caracterización de *Rhizoctonia* spp. causales de patologías en tabaco Tipo Virginia, en Salta y Jujuy (Argentina)

Guadalupe Mercado Cárdenas¹, Marta Galván² y Marcela Rodriguero³

1- Sanidad Vegetal, INTA EEA Salta, Argentina. 2- CONICET-Biotecnología, INTA EEA Salta, Argentina. 3- Laboratorio de Genética Evolutiva, Departamento de Ecología, Genética y Evolución, FAUBA, Buenos Aires, Argentina.
Correo-e: gmercado@correo.inta.gov.ar

INTRODUCCIÓN

Desde fines de los años noventa el cultivo de tabaco se encuentra afectado por una enfermedad que se manifiesta con síntomas como: marchitamiento de la parte aérea de la planta, amarillamiento y posterior necrosis de los tejidos que puede terminar con la muerte de la planta. Coincidente con los síntomas en la parte aérea, en el sistema radicular se observa escaso desarrollo, presencia

de raíces con podredumbre, y muchas veces necrosis total o parcial del cuello de la planta. En las campañas 2008/09/10 en las provincias de Salta y Jujuy se relevaron 80 lotes comerciales de tabaco en cada ciclo de producción, diagnosticándose *Rhizoctonia solani* como agente causal de la podredumbre radicular, como la enfermedad con mayor prevalencia e incidencia, siendo este patógeno uno de los responsables del complejo del amarillamiento en tabaco (3, 10).

En sus comienzos esta enfermedad se manifestaba en forma aislada, pero en los últimos años se diseminó por toda la zona tabacalera transformándose en uno de los problemas fitosanitarios más importantes de este sector productivo, por lo cual surge la necesidad de implementar medidas de manejo para mitigar esta dolencia.

Uno de los pilares más importantes para el manejo de una enfermedad, es el diagnóstico correcto del agente causal y su caracterización. El sistema de clasificación para los aislamientos de *R. solani* está basado en la capacidad de anastomosis o fusión de las hifas, siendo el criterio más usado para separarlo en grupos relativamente homogéneos. Se ha clasificado a este hongo en 14 grupos de anastomosis y varios subgrupos (5). En tabaco los grupos de anastomosis AG1, AG2.2, AG4 y AG5 causan damping off en plantines bajo almácigo y en plantas jóvenes posterior al trasplante al campo y podredumbre radicular en planta adulta (14, 8). Mientras que AG2.2 y AG3 producen la mancha foliar o target spot (17, 12, 18).

Por otra parte, es importante tener en consideración que muchos aislamientos de *R. solani* de otros hospedantes causan tizón de plántulas y podredumbre radicular en tabaco, por lo cual es de interés un análisis que incluya aislamientos de otros hospedantes que se incluyen en rotaciones de la región para determinar si los aislados de *Rhizoctonia* de esos hospedantes pueden ser patógenas de tabaco (16). La técnica de rutina utilizada en fitopatología en las últimas décadas para la determinación de grupos de anastomosis es la reacción de anastomosis hifal que consiste en enfrentar el aislamiento desconocido con un tester (patrón de AG conocido), existiendo diferentes terminologías según que autor se tome para su estudio (2). Recientemente los marcadores moleculares y estudios de secuenciación de ADN demostraron ser herramientas de gran utilidad para la caracterización de aislamientos en

AG permitiendo una caracterización más rápida y precisa que los tests de anastomosis convencionales ya que estos últimos pueden dar falsos positivos (15). Entre los métodos moleculares más utilizados para la clasificación de *Rhizoctonia* spp. se destaca el análisis de secuencias ITS o espaciadores internos transcritos (internal transcribed spacers). Los ITS son regiones de ADN no codificantes que separan las regiones que codifican las unidades de ADN ribosómico. Estas regiones muestran mayor polimorfismo de secuencia que las regiones codificantes y por lo tanto son útiles como fuente de marcadores genéticos y se utilizaron para estudios filogenético en *Rhizoctonia* spp. (15, 19, 7).

El objetivo de este trabajo fue caracterizar aislamientos de *Rhizoctonia* spp. colectados en diferentes lotes comerciales de tabaco desde suelo y plantas que presentaban las sintomatologías descritas en las provincias de Salta y Jujuy empleando marcadores ITS-rDNA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

En las campañas 2009/10/11 se realizaron muestreos aleatorios de 80 lotes de cultivo de tabaco georeferenciados en diferentes localidades de las provincias de Salta y Jujuy. En los lotes se extrajeron plantas con síntomas de la enfermedad y muestras de suelo (rizósfera). Las plantas se procesaron por técnicas de aislamientos de rutina en Agar Papa Glucosado (APG) pH=5 para obtener aislamientos del patógeno. Para las muestras de suelo se utilizó el método de cebo cuali-cuantitativo para *Rhizoctonia* spp. (1). Posteriormente se transfirieron puntas hifales a nuevas placas con medio, las cuales se incubaron cinco días en oscuridad a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. De estas se tomaron discos de 1cm de diámetro y se depositaron en tubos de 1,5 ml con glicerol al 50% y se llevaron a -20°C para su conservación. Además se realizaron aisla-

mientos provenientes de otros hospedantes (poroto, sorgo, maní y garbanzo).

Prueba de patogenicidad

Para cada aislamiento se realizó una prueba de patogenicidad empleando plantines de 8 semanas de la variedad susceptible K326. Las plantas se mantuvieron en cámara de crecimiento con control de temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y 12 h de fotoperíodo. Por cada aislamiento fueron inoculadas 10 plantas, depositando en la base del cuello y en hoja granos de trigo colonizados. Plantas sin el patógeno se utilizaron como control. Las plantas se asperjaron con agua destilada estéril y se mantuvieron cubiertas con bolsas de polietileno a fin de simular una cámara húmeda. A las 24 h se removieron las bolsas y las plantas fueron llevadas a invernadero. A los cinco días se evaluó la severidad (% de tejido afectado) para mancha en hoja y *damping off*, empleando a escala, 0 (sin infección), 1 (1-25%), 2 (26-50%), 3 (51-75%) y 4 (76-100%).

Amplificación y secuenciación de regiones ITS-rDNA

La extracción de ADN se realizó a partir de micelio empleando el protocolo con bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB). A partir del ADN extraído se amplificaron las regiones ITS-rDNA mediante PCR utilizando los primers ITS1 e ITS4. Dichos primers fueron utilizados por diferentes autores para la identificación molecular de grupos de anastomosis en *Rhizoctonia* spp (15, 16, 17).

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 10 μl , utilizando 50 ng de ADN genómico, 3 mM Cl_2Mg , 0,2 μM de cada primer (forward y reverse), 20 mM de Tris-HCl, 50 mM de ClK, 0,2 mM de dNTP y 0,4 U de Taq polimerasa. Los ciclos de amplificación consistieron en una desnaturalización inicial de 1 min a 94°C seguida de 30 ciclos de 15 seg a 94°C , 15 seg a 58°C y 15 s a 72°C , con una extensión final de 7 min a 72°C . Los fragmentos amplificados se separaron mediante

electroforésis en geles de agarosa 1,5% teñidos con GelRed™. Se realizó la purificación de los productos de PCR para su posterior secuenciación empleando el kit QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen).

Análisis de datos

Los fragmentos secuenciados se analizaron utilizando el programa BioEdit y se depositaron en el GenBank (Cuadro 1). Las secuencias se compararon con secuencias de *R. solani* de diferentes grupos de anastomosis disponibles en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information). A partir del análisis de las secuencias se generó un árbol de Neighbour Joining (NJ) utilizando el programa PAUP v. 4.0 y se visualizó empleando TreeView v. 1.6.6. El análisis incluyó un total de 107 taxa. El soporte de los grupos fue evaluado mediante bootstrap con 1000 repeticiones, indicándose únicamente los valores superiores a 50.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir del relevamiento en los diferentes lotes comerciales tabacaleros de Salta y Jujuy, se obtuvo un total de 110 aislamientos que forman parte de la colección de hongos conservada en el Laboratorio de Sanidad Vegetal del INTA, Estación Experimental Agropecuaria Salta. Del total de aislamientos obtenidos se destinaron 49 para el análisis filogenético (Cuadro 1).

Para todos los aislamientos se obtuvieron patrones de bandas amplificadas entre los 650 y 800 pb (Figura 1).

La técnica de análisis de secuencias ITS resultó una herramienta de utilidad para la identificación de la mayoría de los aislamientos de *Rhizoctonia* analizados como fue reportado en otros estudios (11, 12, 13).

En el árbol de Neighbour Joining construido a partir de las secuencias ITS-rDNA se observó que el 61% de los aislamientos analizados fueron identificados como *Rhizoctonia solani* AG2, AG4 y AG6 (Figura 2). El resto de los

Cuadro 1. Aislamientos de *Rhizoctonia* spp. de Salta y Jujuy (Argentina) caracterizados empleando secuencias ITS (internal transcribed sequences).

AG ^a	Aislamiento	Síntomas/Origen/ Hospedante ^b	Localidad/provincia	Severidad ^c	N° GenBank
AG2-1	Rs66	MH/hoja/ <i>N. tabacum</i>	Cerrillos/Salta	3.1	JQ616852
AG2-1	Rs67	MH/hoja/ <i>N. tabacum</i>	Cerrillos/Salta	0.0	JQ616853
AG2-1	Rs59	MH/hoja/ <i>N. tabacum</i>	La Silleta/Salta	4.2	JQ616867
AG2-1	RS59b	MH/hoja/ <i>N. tabacum</i>	La Silleta/Salta	4.2	JQ616874
AG2-1	RS68	MH/hoja/ <i>N. tabacum</i>	Cerrillos/Salta	3.1	JQ616870
AG2-1	RS69	MH/hoja/ <i>N. tabacum</i>	Cerrillos/Salta	1.1	JQ616871
AG2-1	RS70	MH/hoja/ <i>N. tabacum</i>	Cerrillos/Salta	1.2	JQ616872
AG2-1	RS59c	MH/hoja/ <i>N. tabacum</i>	La Silleta/Salta	4.2	-
AG2-1	RS25	PR/raíz/ <i>N. tabacum</i>	La Merced/Salta	0.1	JQ616864
AG2-1	Rs25b	PR/raíz/ <i>N. tabacum</i>	La Merced/Salta	1.1	JQ616849
AG2-1	RS36	PR/raíz/ <i>N. tabacum</i>	La Merced/Salta	0.0	JQ616865
AG2-1	RS36b	PR/raíz/ <i>N. tabacum</i>	La Merced/Salta	0.1	JQ616854
AG2-1	RS58	DO/raíz/ <i>N. tabacum</i>	La Silleta/Salta	2.4	JQ616866
AG4-HGI	RS46	PR/raíz/ <i>N. tabacum</i>	Rosario de Lerma/Salta	0.1	JQ616862
AG4-HGI	RS46b	PR/raíz/ <i>N. tabacum</i>	Rosario de Lerma/Salta	0.1	JQ616868
AG4-HGI	RS47	PR/raíz/ <i>N. tabacum</i>	Rosario de Lerma/Salta	1.4	JQ616860
AG4-HGI	Rs47b	PR/raíz/ <i>N. tabacum</i>	Rosario de Lerma/Salta	1.4	JQ616855
AG4-HGI	RS79	PR/raíz/ <i>N. tabacum</i>	El Carmen/Jujuy	1.0	JQ616856
AG4-HGI	RS80	PR/raíz/ <i>N. tabacum</i>	El Carmen/Jujuy	0.0	JQ616857
AG4-HGI	RS44	PR/raíz/ <i>N. tabacum</i>	Rosario de Lerma/Salta	0.4	-
AG4-HGI	RS60	-/suelo/-	Cerrillos/Salta	1.0	JQ616850
AG4-HGI	RS61	-/suelo/-	Cerrillos/Salta	1.0	JQ616848
AG4-HGI	RS63	-/suelo/-	Cerrillos/Salta	1.1	JQ616851
AG4-HGI	RS12	caja/ <i>Arachis hypogaea</i>	Las Lajitas/Salta	0.0	JQ616861
AG4-HGIII	RS74	DO/raíz/ <i>N. tabacum</i>	Coronel Moldes/Salta	0.1	JQ616869
AG4-HGIII	Rs75	DO/raíz/ <i>N. tabacum</i>	Coronel Moldes/Salta	0.0	JQ616859
AG4-HGIII	RS81	RR/raíz/ <i>Sorghum</i> sp.	Guachipas/Salta	1.0	JQ616858
AG4-HGIII	RS72	-/suelo/-	Rosario de Lerma/Salta	1.1	JQ616873
AG4	RS49	RR/raíz/ <i>Cicer arietinum</i>	Cerrillos/Salta	1.2	JQ616863
AG6	Rs77	PR/raíz/ <i>N. tabacum</i>	Ovejería/Jujuy	0.0	-
NI	RS1	DO/raíz/ <i>N. tabacum</i>	Cerrillos/Salta	0.1	-
NI	RS6	DO/raíz/ <i>N. tabacum</i>	La Caldera/Salta	0.0	-
NI	RS6b	DO/raíz/ <i>N. tabacum</i>	La Caldera/Salta	0.0	-
NI	RS10	DO/raíz/ <i>N. tabacum</i>	Puesto Viejo/Jujuy	0.0	-
NI	RS26	PR/raíz/ <i>N. tabacum</i>	Monterrico/Jujuy	0.0	-
NI	RS53	PR/raíz/ <i>N. tabacum</i>	Cerrillos/Salta	2.2	-
NI	RS53b	PR/raíz/ <i>N. tabacum</i>	Cerrillos/Salta	2.3	-
NI	RS54	PR/raíz/ <i>N. tabacum</i>	Rosario de Lerma/Salta	2.4	-
NI	Rs73	PR/raíz/ <i>N. tabacum</i>	Rosario de Lerma/Salta	0.1	-
NI	RS57	-/semilla/ <i>Phaseolus vulgaris</i>	Cerrillos/Salta	1.4	-
NI	RS12b	caja/ <i>Arachis hypogaea</i>	Las Lajitas/Salta	0.0	-
NI	RS22a	-/suelo/-	Los Lapachos/Jujuy	0.0	-
NI	Rs22b	-/suelo/-	Los Lapachos/Jujuy	0.0	-
NI	RS34	-/suelo/-	Monterrico/Jujuy	0.1	-
NI	RS35	-/suelo/-	Los Lapachos/Jujuy	0.0	-
NI	RS65	-/suelo/-	Cerrillos/Salta	0.0	-
NI	RS71	-/suelo/-	Rosario de Lerma/Salta	2.0	-
NI	Rs71b	-/suelo/-	Rosario de Lerma/Salta	2.0	-
NI	Rs56	-/semilla/ <i>Phaseolus vulgaris</i>	Cerrillos/Salta	1.0	-

^a AG: Grupos de anastomosis determinados a partir de las secuencias ITS. NI: especies de *Rhizoctonia* no identificadas.

^b MH: mancha en hoja (leaf spot), PR: podredumbre radicular (sore shine), DO: damping off.

^c Para mancha en hoja y damping off, escala 0-4 (0, sin infección; 1, 1-25%; 2, 26-50%; 3, 51-75%; and 4, 76-100%).

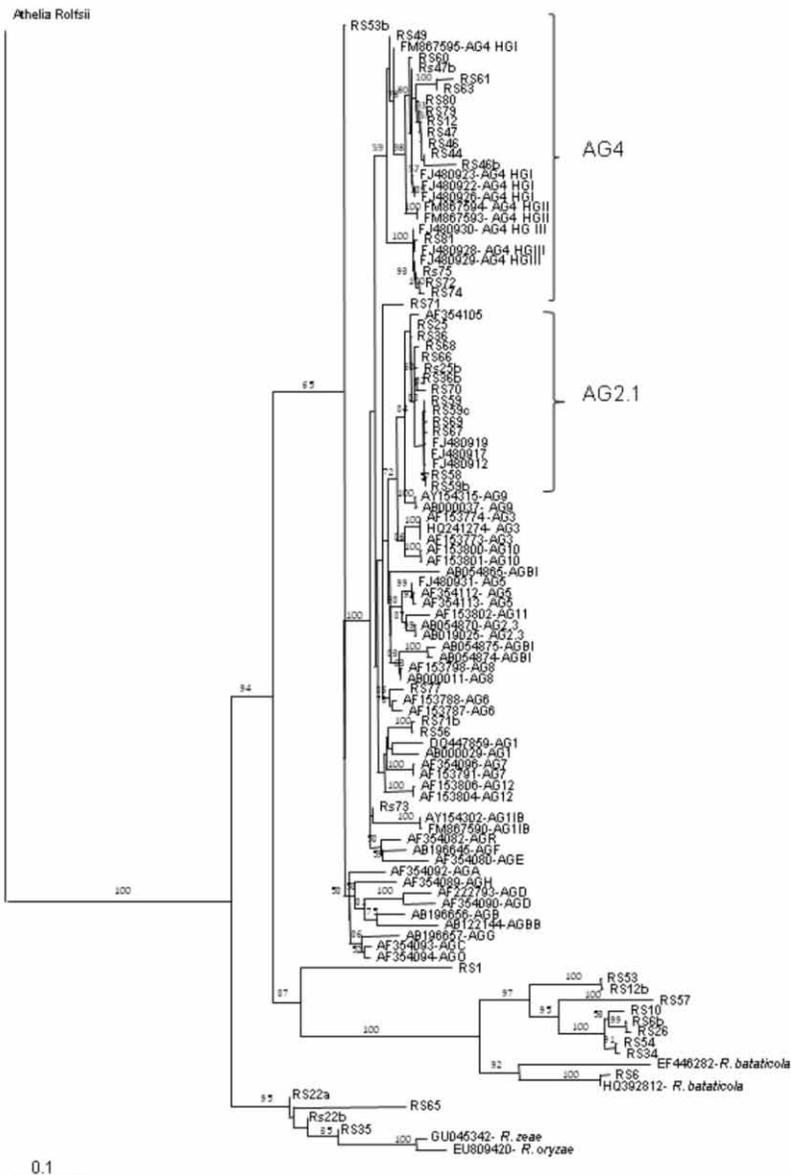


Figura 2. Arbol de Neighbour Joining de 49 aislamientos de *Rhizoctonia* spp. de Salta y Jujuy.

aislamientos correspondieron a *Rhizoctonia* spp. En la provincia de Salta se identificaron aislamientos pertenecientes a los grupos AG2.1, AG4-HGI, AG4-HGIII. Mientras que en la provincia de Jujuy los grupos fueron AG4-HGI y AG6. En ambas provincias se identificaron aislamientos de *Rhizoctonia* spp. Se observó asociación entre enfermedad y grupo de anastomosis. Los aislamientos pertenecientes al grupo AG2.1 causaron

mancha en hoja y damping off en almácigo y podredumbre radicular en plantación. Estos aislamientos fueron los que mostraron mayor severidad en la prueba de patogenicidad (Cuadro 1). Este representó el primer reporte a nivel mundial del grupo AG2.1 causando mancha en hoja en tabaco (18) ya que sólo existen referencias de esta enfermedad causada por el grupo AG3 (6, 8, 19). Los aislamientos pertenecientes al grupo AG4-HGI causaron podredumbre radicular

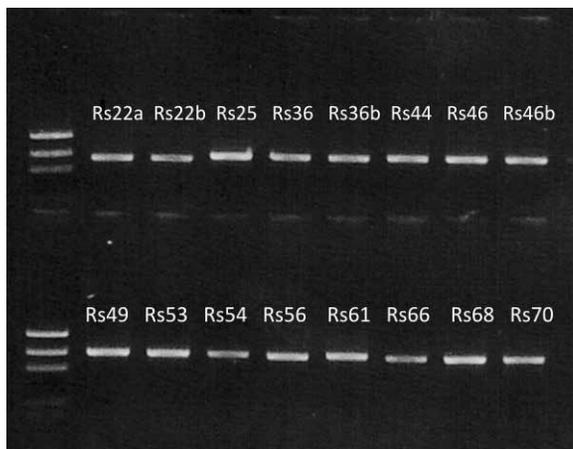


Figura 1. Amplificación de secuencias ITS-rDNA a partir de ADN de aislamientos de *Rhizoctonia* spp. de Salta y Jujuy.

mientras que los del grupo AG4-HGIII se encontraron asociados a damping off. Resultados similares fueron reportados por (13) sin embargo este sería el primer reporte de AG4-HGIII infectando tabaco.

El 64% de los aislamientos obtenidos a partir de muestras de suelo mostraron resultados positivos en las pruebas de patogenicidad con baja virulencia. De los mismos el 43% correspondió al grupo AG4-HGI, el 14% a AG4-HGIII y el resto a *Rhizoctonia* spp. Estos resultados indican que se estaría trasladando inóculo desde almacigo al campo ya que AG4-HGIII se lo encontró asociado a damping off.

El grupo de anastomosis que mostró los mayores valores de virulencia para mancha foliar fue AG2.1. Además se observó mayor severidad en los aislamientos provenientes de hoja y menor en los de raíz.

Para damping off AG4-HGI fue el grupo más virulento de los aislamientos obtenidos a partir de raíz. (13) a partir del análisis de 19 aislamientos provenientes de Turquía reportó altos niveles de virulencia para damping off en todos los grupos de anastomosis encontrados (AG2.1, AG4-HGI y AG4-HG-II). Del total de los aislamientos identificados como *Rhizoctonia* spp. el 53% resultó virulento para mancha en hoja y damping off, mostrando mayores valores para esta última.

Los aislamientos Rs81, Rs49 y Rs56 obtenidos a partir de otros hospedantes (sorgo, garbanzo y poroto) resultaron virulentos para plantas de tabaco, mientras que Rs12 y Rs12b obtenido de maní no mostraron virulencia. Cabe mencionar que los tres primeros aislamientos virulentos corresponden a rotaciones en lotes de tabaco en el Valle de Lerma, mostrando el amplio rango de hospedante del patógeno.

CONCLUSIÓN

Estos resultados representan el primer análisis molecular del patógeno en el noroeste argentino y revelan la existencia de gran variabilidad en los aislamientos analizados. Los mismos representan una importante herramienta para el manejo integrado de enfermedades, dado que los grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani* difieren en su sensibilidad a fungicidas (20) y pueden tener diferente rango de hospedante.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Alfenas A., Valverde Zauza E., Gomeide Mizubuti E., Ferreira A., Murilo Zerbini F., Pereira F., Rogeiro de Olivera J., Grassi de Freitas L., Maffia L., Pereira O., Alfenas Zerbini P., Gonçalves Mafia R., Gonçalves R., D'Arc de Lima Oliveira R., & Dos Santos Neves W. 2007. Métodos em Fitopatologia. Editora Universidade de Viçosa. p. 382.
2. Carling D.E. 1996. Grouping in *Rhizoctonia solani* by hyphal anastomosis reaction. In: *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. (B. Sneh, S. Jabaji-Hare, S. Neate, and G. Dijst, eds). Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers. pp. 37-47.
3. Gimenez Monge J.L., Mercado Cárdenas G.E., Ortega A., Lacci F., Arzeno J.L.. 2009. Un enfoque integral del amarillamiento en tabaco. Panorama Agropecuario de Salta y Jujuy. 10(52): 4-7.
4. Godoy-Lutz G., Kuninaga S., Steadman J.R.,

- and Powers K.. 2008. Phylogenetic analysis of *Rhizoctonia solani* subgroups associated with web blight symptoms on common bean based on ITS-5.8s rDNA. *Journal of General Plant Pathology* 74: 32-40.
5. González-Hernández D. 2002. Estado actual de la taxonomía de *Rhizoctonia solani* Kühn. *Revista mexicana de Fitopatología Volumen* 20 (2): 200-205.
 6. González M., Merardo P., Metraux J.P., González-García V., Bolton M., Borrás-Hidalgo O. 2011. Tobacco Leaf spot and root rot caused by *Rhizoctonia solani* Kühn. *Molecular Plant Pathology* 12(3): 209-216.
 7. Gurkanli C, Ozkoc I., and Islam G. 2009. Molecular and conventional identification and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* isolates from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) in Samsun, Turkey. *Journal of Phytopathology* 157: 686-696.
 8. Gutierrez W.A., Shew H.D., and Melton T.A. 1997. Sources of inoculum and management for *Rhizoctonia solani* damping-off on Tobacco transplants under greenhouse conditions. *Plant Disease* 81: 604-606.
 9. Mercado Cárdenas, G., Aciar M. y Sanchez C. 2011. Análisis espacial con aplicación de transectas de la distribución de una enfermedad radicular y su relación con variables de suelo en el cultivo de tabaco en Salta (Argentina). *In: Actas del Primer Seminario Nacional de Cartografía Digital, San Luis, formato digital.*
 10. Mercado Cárdenas G. E., Alfaro R., Gimenez Monge J. L. 2010. Prevalencia e incidencia de las enfermedades radiculares y virales de *Nicotiana tabacum* en las provincias de Salta y Jujuy, Argentina. *In: Actas del XXI Congreso Peruano de Fitopatología, Tarapoto, p.8.*
 11. Mercado Cárdenas G., Galván M., Barrera V., and Carmona M. 2012. First report of target spot of tobacco caused by *RRhizoctonia solani* (AG-2.1). *Plant Disease* 96(3): 456.
 12. Meyer J.C., Van Wyk R.J., and Phillips A.J. 1990. *Rhizoctonia* leaf spot of tobacco in South Africa. *Plant Pathology* 39: 206-207.
 13. Nerey Y., Pannecoucq J., Hernandez H. P., Diaz M., Espinosa R., De Vos S., Van Beneden S., Herrera L., Höfte M. 2010. *Rhizoctonia* spp. causing root and hypocotyl rot in *Phaseolus vulgaris* in Cuba. *Journal of Phytopathology* 158: 236-243.
 14. Nicoletti R., and Lahoz E. 1995. Recovery of *Rhizoctonia solani* AG-5 from tobacco in Italy. *Plant Disease* 79: 540.
 15. Sharon M., Kuninaga S., Hyakumachi M., and Sneh B. 2006. The advancing identification and classification of *Rhizoctonia* spp. using molecular and biotechnological methods compared with the classical anastomosis grouping. *Mycoscience* 47: 299-316
 16. Shew H.D., and Lucas G.B. 1991. Compendium of Tobacco Diseases. The American Phytopathological Society. p. 68.
 17. Shew H.D., and Main C.E. 1985. *Rhizoctonia* Leaf Spot of Flue-Cured Tobacco in North Carolina. *Plant Disease* 69: 901-903.
 18. Shew H.D., and Melton, T.A. 1995. Target spot of tobacco. *Plant Disease* 79: 6-11.
 19. Stodart B. J., Harvey P. R., Neat S. M., Melanson D. L., and Scott E. S. 2007. Genetic variation and pathogenicity of anastomosis group 2 isolates of *Rhizoctonia solani* in Australia. *Mycological Research* 111: 891-900.
 20. Woodhall J.W., Lees A.K., Edwards S.G., and Jenkinson P. 2007. Characterisation of *Rhizoctonia solani* from potato in Great Britain. *Plant Pathology* 56: 286-295.