

# Identificación del agente etiológico del “falso Orobanche” del tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) en Cuba

## Autor principal

Yunior Miguel Morán Gómez<sup>1</sup>.

## Otros autores

Osmani Chacón Chacón<sup>1</sup>, Rosario Domínguez Larrinaga<sup>1</sup>, Orlando Borrás Hidalgo<sup>2</sup>, Felipe Lidcay Herrera Isla<sup>3</sup>.

## Entidad ejecutora principal

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones del Tabaco (IIT).

## Entidades participantes

<sup>2</sup>Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB).

<sup>3</sup>Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas (UCLV).

## Autor para correspondencia

Dr. Yunior Miguel Morán Gómez.

Grupo de Mejoramiento Genético y Fitopatología.

Instituto de Investigaciones del Tabaco.

Carretera a Tumbadero, km 8 ½. San Antonio de los Baños. Artemisa.

Teléfono: 47 32 34 42 Fax: 47 32 34 45

E-mail: [biologia8@iitabaco.co.cu](mailto:biologia8@iitabaco.co.cu)

## Resumen

La enfermedad denominada “falso Orobanche” constituye uno de los factores que afecta la producción tabacalera en el centro y el oriente de Cuba. Los síntomas se presentan como tumoraciones o excrecencias de masas blanquecinas jugosas a nivel de las raíces de las plantas de tabaco, que pueden tener brotes por encima de la superficie del suelo y llegar a desarrollar clorofila. En los momentos iniciales comúnmente se confunden con las características que presenta la fase hipogea de la planta parásita *Orobanche ramosa* L. Puede afectar el desarrollo normal de las plantas produciendo enanismo y raquitismo. Aunque existe un consenso general en cuanto al papel que juegan las fitohormonas en el desarrollo de esta sintomatología, no se conoce cuál es el agente causal de esta enfermedad.

Con el objetivo de identificar al agente etiológico del “falso Orobanche” se confirmó por primera vez su naturaleza biótica y empleando pruebas de patogenicidad se determinó que se trata de un actinomiceto perteneciente al género *Nocardia*. Filogenéticamente, atendiendo a los porcentajes de identidad nucleotídica, se determinó que este agente se encuentra estrechamente relacionado con *N. carnea* y con *N. flavorosea*, con 99,7% y 99,8% de identidad con las secuencias del ARNr 16S, y con 97,4% y 96,9% de identidad con las secuencias del gen *secA1*, de estas especies respectivamente.

Es la primera vez que se informan y caracterizan en el mundo aislados del género *Nocardia* que afectan al cultivo del tabaco y es la segunda ocasión en que se comunica el hallazgo de un agente fitopatógeno dentro de este género. Constituye, además, el primer informe de la determinación del agente causal del “falso Orobanche” en el tabaco cubano y la primera vez que se comunica al mundo de un agente causante de esta enfermedad diferente de *Rhodococcus fascians*.

Los resultados del trabajo fueron publicados en revistas de alto factor de impacto como PHYTOPATHOLOGY y JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY, así como en una revista nacional. Se han presentado en eventos nacionales e internacionales y han obtenido premios (Premio MINAG 2010) y distinciones. Los resultados aquí presentados formaron parte de una tesis doctoral discutida en el 2012.

El conocimiento del agente etiológico de esta enfermedad ya permitió la evaluación de la respuesta defensiva de las especies del banco de germoplasma de tabaco frente a este agente, estudios de persistencia del agente en el suelo y la determinación de los factores del medio que inciden en su propagación, lo cual constituye un impacto tecnológico positivo para la cadena productiva del tabaco.

## **Comunicación Corta**

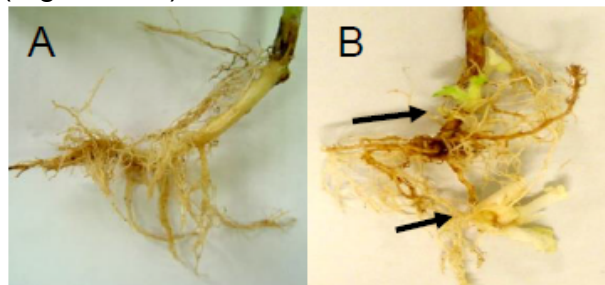
### **Introducción**

La enfermedad denominada “falso Orobanche” constituye uno de los factores que afecta la producción tabacalera en el centro y el oriente de Cuba. Los síntomas se presentan como tumoraciones o excrecencias de masas blanquecinas jugosas a nivel de las raíces de las plantas de tabaco, que pueden tener brotes por encima de la superficie del suelo y llegar a desarrollar clorofila. En los momentos iniciales comúnmente se confunden con las características que presenta la fase hipogea de la planta parásita *Orobanche ramosa* L. Puede afectar el desarrollo normal de las plantas produciendo enanismo y raquitismo. Aunque existe un consenso general en cuanto al papel que juegan las fitohormonas en el desarrollo de esta sintomatología, no se conoce cuál es el agente causal de esta enfermedad.

El objetivo de este trabajo es identificar al agente etiológico del “falso Orobanche” que afecta al tabaco cubano.

## Resultados y Discusión

**Estudios sobre la naturaleza del agente causal del “falso Orobanche”** Al cabo de 38 días las plantas que se trasplantaron en suelo esterilizado y se mantuvieron a 30 °C, se mantuvieron asintomáticas (Figura 1. A). Las que se trasplantaron en el suelo no esterilizado y que se mantuvieron a 30 °C) sí presentaron síntomas de la enfermedad (Figura 1. B).



**Figura 1.** Raíces de plantas de tabaco del cultivar ‘Habana-92’. **A:** Trasplantada en suelo estéril. **B:** Trasplantada en suelo no estéril. Con flechas se señalan los tumores y los rebrotes que proliferan por debajo del nivel del suelo.

El hecho de obtener tumoraciones y rebrotes solo en las plantas sembradas en el suelo no esterilizado indica una posible naturaleza biótica del agente etiológico. Las plantas sembradas en tierra no estéril y mantenidas a 18 °C, se mostraron asintomáticas durante todo el desarrollo del experimento. Al plantar nuevas plántulas del mismo cultivar en el mismo suelo que se mantuvo a 18 °C, pero esta vez incubadas a 30 °C, se comprobó manifestación de síntomas de la enfermedad a los 45 días.

Se podría esperar entonces que al disminuir la temperatura hasta 18 °C se incrementaran los síntomas del trastorno si este fuese ocasionado por un factor abiótico termolábil, pues la planta sería más susceptible mientras que el supuesto componente abiótico del suelo, implicado en la sintomatología, sería más estable. El hecho de que ocurriera lo contrario se puede explicar sobre la base de que el agente causal es un elemento biótico, cuya temperatura óptima de desarrollo es superior a los 18 °C. De esta forma la disminución de la temperatura impide que dicho agente se desarrolle y ocasione síntomas a la planta de tabaco. Fenómeno conocido como microbiostasis (Madigan y col., 2009).

Este resultado constituye una novedad científica pues se confirmó por primera vez la naturaleza biótica del agente causal del “falso Orobanche” del tabaco en Cuba.

## Determinación del agente causal de la enfermedad en plantas de tabaco

### **Primera prueba de patogenicidad**

A partir de los 25 días de la inoculación de las plantas de tabaco con las suspensiones celulares, obtenidas del lavado de las placas de las diferentes diluciones del aislamiento de los tumores, se observó, en algunas de ellas, la manifestación de síntomas del “falso Orobanche”. Las plantas testigos, no inoculadas, permanecieron asintomáticas durante todo el experimento. En general, los resultados permiten establecer que el

agente etiológico de esta enfermedad se aísla y se desarrolla en medios de cultivo artificiales, corroborando así la etiología biótica de la enfermedad.

### ***Segunda prueba de patogenicidad***

Para esta prueba, los aislados obtenidos de las diluciones que indujeron síntomas por cada localidad se agruparon atendiendo a la pigmentación de sus colonias (blanca, naranja y amarilla). Las plantas susceptibles se inocularon con las diferentes combinaciones de estos grupos. Se pudo apreciar que solo en las variantes donde se emplearon los aislados de pigmentación blanca en sus colonias por cada localidad, se encontraron plantas enfermas. Este resultado evidenció que dentro del grupo de aislados con pigmentación blanca, obtenidos de los diferentes territorios, se encuentra el agente causal de la enfermedad.

### ***Tercera prueba de patogenicidad***

En la prueba de patogenicidad realizada individualmente a cada uno de los aislados con colonias de color blanco en el medio D2 de todos los territorios, se pudo determinar que los aislados T42, Cab12, Tag09, Bay04, Yar17 y Jiq06, obtenidos de las localidades de Tamarindo, Cabaiguán, Taguasco, Bayamo, Yara y La Jíquima, respectivamente, poseen la capacidad para inducir la sintomatología descrita para esta enfermedad.

### ***Cuarta prueba de patogenicidad***

En todas las vitroplantas inoculadas con los aislados patogénicos puros se apreció la manifestación de los síntomas típicos del “falso Orobanche”. Las características de los organismos reaislados de este sistema *in vitro* coincidieron con las características de los organismos inoculados.

El haber encontrado a los aislados patogénicos asociados con las plantas enfermas examinadas, y nunca con las plantas sanas; el haberlos cultivado artificialmente; sumado a que su inoculación, de modo independiente, en plantas sanas provocó la manifestación de los mismos síntomas de la enfermedad y que en el sistema *in vitro* se comprobó que el agente inoculado y el reaislado eran el mismo, indican que estos aislados cumplen con los cuatro postulados de Koch según Agrios (2005), Fuentes y Blanco (2007) y Volcy (2008).

## **Identificación taxonómica del agente causal del “falso Orobanche”**

### ***Caracterización morfocultural y morfotintorial***

En el medio de cultivo D2 las colonias de los seis aislados patogénicos se apreciaron claramente a partir de las 96 h de crecidas. A los 15 días las colonias se apreciaron pequeñas ( $\varnothing$ : 2-3 mm), con el estroma anaranjado oscuro, cubiertas en su mayor extensión con hifas aéreas de color blanco. Las mismas presentaron un borde ancho filamentoso compacto y blanco que se extendió por encima del medio de cultivo.

Morfotintorialmente los seis aislados patogénicos resultaron Gram-positivos, con apariencia de largos bastones finos, ramificados y presencia de gránulos redondos. Se

observó también la presencia de elementos pleomórficos. Los aislados también resultaron ser bacterias parcialmente ácido-alcohol resistentes.

Las características morfotintoriales y macromorfológicas de los aislados patogénicos son muy similares entre ellos, y coinciden con las descritas para el género *Nocardia* Trevisan. Este género pertenece a la familia *Nocardiaceae* (Nocardioformes), un grupo dentro de *Corynebacterinae*, suborden dentro del orden *Actinomycetales* que pertenece a la subclase *Actinobacteridae* y a la clase *Actinobacteria*. Este grupo es referido como actinomicetos aerobios (Goodfellow y Lechavalier, 1989; Goodfellow, 1992; Stackebrandt y col., 1997; Conville y Witebsky, 2010).

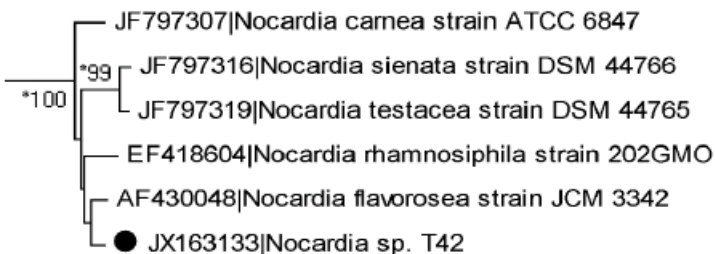
### **Caracterización fisiológica y bioquímica**

Los seis aislados patogénicos respondieron de manera idéntica a las pruebas fisiológicas y bioquímicas efectuadas. Todos crecieron a 35 °C pero no a 45 °C, ni a 18 °C. No hidrolizaron el almidón ni la gelatina, pero sí la esculina. No produjeron H<sub>2</sub>S. No utilizaron el citrato, pero sí redujeron los nitratos. No mostraron presencia de  $\beta$ -galactosidasa, pero sí de catalasa y ureasa. Produjeron ácido a partir de D-glucosa, Larabinosa, D-manosa, D-manitol, N-acetil-glucosamina, inositol y sacarosa, pero no a partir de D-sorbitol, L-ramnosa y D-melibiosa.

### **Caracterización molecular**

Tomando en consideración de que el aislado T42 se obtuvo de muestras pertenecientes a la localidad de Tamarindo, donde se informa la mayor incidencia de la enfermedad en el país, se designó a la secuencia nucleotídica del gen del ARNr de 16S de T42 (número de acceso al GenBank: JX163133) como representante de los seis aislados de Cuba en los restantes análisis bioinformáticos (las secuencias de los seis aislados resultaron idénticas).

En el árbol construido a partir del cálculo de las distancias filogenéticas de 29 secuencias nucleotídicas parciales del gen del ARNr de 16S de cepas tipo, de especies del género *Nocardia*, más la secuencia del aislado T42, se observó que el aislado cubano se situó en el interior de una rama del tronco evolutivo del género *Nocardia* (Figura 2).



**Figura 2.** Fragmento del árbol filogenético derivado de las secuencias parciales del gen del ARNr de 16S obtenido por un análisis de matrices de distancia. Se muestra la posición del aislado T42 (círculo oscuro). La topología del árbol fue inferida por el método de NJ basado en la comparación de 1 348 nt. En cada rama se muestran los valores de bootstrap (1 000 réplicas)  $\geq 50\%$ . Con asteriscos (\*) se indican las ramas del árbol que también se obtuvieron empleando el algoritmo ML. Antes de la línea vertical se muestra el número de acceso al GenBank de cada cepa o aislado empleado en la comparación.

De acuerdo con los cálculos del porcentaje de identidad de las secuencias parciales (1 348 nt) del gen del ARNr de 16S, el aislado T42 se encuentra estrechamente relacionado al 99,8% con *N. flavorosea* cepa JCM 3342 $\tau$  y al 99,7% con *N. carnea* cepa ATCC 6847 $\tau$ . Aunque el gen del ARNr de 16S es el más comúnmente evaluado para la identificación de las especies de *Nocardia* se ha visto que existe una limitada heterogeneidad interespecífica entre especies muy emparentadas y alta variabilidad intraespecífica dentro de muchas especies (Conville y Witebsky, 2010; Roth y col., 2003; Helal y col., 2011).

Para el caso de los actinomicetos, se informa el empleo con éxito del gen *secA1* para ubicar a los representantes de ese grupo (Zelazny y col., 2005; Conville y col., 2006; Kang y col., 2009; Kong y col., 2010). Atendiendo a los motivos ya expuestos, se designó a la secuencia nucleotídica parcial del gen *secA1* de T42 (número de acceso al GenBank: JX163132) en representación de este grupo de aislados para los siguientes análisis bioinformáticos.

La secuencia de T42 mostró alineamientos altamente significativos (valor  $e = 0.0$ ) con el gen *secA1* de los representantes del género *Nocardia* notificados en el GenBank. En el árbol construido a partir de las distancias filogenéticas de las secuencias del gen *secA1* de 29 cepas tipo y un aislado de *Nocardiaspp.*, más la secuencia de T42, se observó que, el aislado cubano compartió nuevamente el interior de una rama del tronco evolutivo del género *Nocardia* con representantes de las mismas cinco especies ya citadas.

De acuerdo con los cálculos de identidad de las secuencias parciales de 431 nt del gen *secA1*, el aislado T42 se encuentra más relacionado con *N. carnea* ATCC 6847 $\tau$  (97,4%) que con *N. flavorosea* DSM 44480 $\tau$  (96,9%). El aislado cubano presentó la mayor identidad en la secuencia de este gen (99,8%) con la cepa *Nocardia* sp. OAHPP1212 que se aisló a partir de muestras clínicas humanas (McTaggart y col. 2010). Hasta el momento no se le ha reconocido actividad fitopatógena. Los diferentes análisis filogenéticos coinciden en ubicar al aislado T42 dentro del género *Nocardia*, confirmando los resultados fenotípicos. Sin embargo, los altos porcentajes de identidad encontrados con las especies *N. flavorosea* y *N. carnea*, dan al aislado cubano casi la misma probabilidad de pertenecer a cualquiera de estas dos especies.

Los resultados obtenidos aquí indican que los aislados patogénicos cubanos causantes del “falso Orobanche” se encuentran muy alejados filogenéticamente de *R. fascians*, *S. turgidiscabies* y de *N. vaccinii*. El descubrimiento de aislados patogénicos pertenecientes al género *Nocardia* constituye una novedad, pues es la segunda mención de un miembro de este género que causa enfermedades en plantas, y constituye además, el primer informe de que ocasionan una enfermedad a la planta de tabaco. Es la primera vez que se demuestran los postulados de Koch para el agente causal del “falso Orobanche” en el cultivo del tabaco.

Los resultados del trabajo fueron publicados en revistas de alto factor de impacto como PHYTOPATHOLOGY y JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY, así como en la revista

CENTRO AGRÍCOLA editada en la UCLV. El trabajo se ha presentado en eventos nacionales e internacionales y ha obtenido premios (MINAG 2010) y distinciones científico-técnicas. Los resultados aquí presentados formaron parte de una tesis doctoral discutida en el 2012. El conocimiento del agente etiológico de esta enfermedad ya permitió la evaluación de la respuesta defensiva de las especies del banco de germoplasma de tabaco frente a este agente, estudios de persistencia del agente en el suelo y la determinación de los factores del medio que inciden en su propagación lo cual constituye un impacto tecnológico positivo para la cadena productiva del tabaco.

## **Bibliografía**

- Agrios GN (2005) Plant Pathology. ed. Dreibelbis D, Sonnack KD, Lilly T, Beattie L and DeCicco E, 922 pp. San Diego: Elsevier Academic Press.
- Alfonso P y Barroso MA (2001) Orobanche. 60 preguntas y respuestas. Folleto de compilación, Completamiento y Diseño Divulgativo. Estación Experimental del Tabaco. Cabaiguán pp 33.
- Aoki Y, Yoshida Y, Yoshida M, Kawaide H, Abe H and Natsume M (2005) Anthranilic acid, a spore germination inhibitor of phytopathogenic *Streptomyces* sp. B-9-1 causing root tumor of melon. *Actinomycetologica*, 19: 48– 54.
- Aoki Y, Yoshida M, Kawaide H, Abe H and Natsume M (2007) Isolation and characterization of a spore germination inhibitor from *Streptomyces* sp. CB-1-1, a Phytopathogen Causing Root Tumor of Melon. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71:986-992.
- Arcia AM y Suárez YY (1974) Falsa escobilla del tabaco. *Agronomía Tropical* 24 (5): 391-397.
- Bauer de ML (1987) Fitopatología. ed. Colegio de Postgraduados, 384 pp. México: Limusa S.A.
- Bernal A, Machado P, Cortegaza L, Carmona ER, Rivero O, Zayas CM, Nodarse O, Perez A, Santana I and Arencibia AD (2008) Priming and bioprimering integrated into the sugarcane micropropagation technology by Temporary Immersion Bioreactors (TIBS). *Sugar Tech* 10(1): 42-47.
- Bozukov K (1994) The “False broom-rape” a more and more growing danger. *Bulgarian Tobacco* 39(1):15-17.
- Brown JM and McNeil MM (2003) *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Actinomyces*, and other aerobic actinomycetes. In *Manual of clinical microbiology*, ed: PR Murray, EJ Baron, JH. Jorgensen, MA Pfaller and RH Tenover, p.370–398. Washington, DC: ASM Press.
- Brown-Elliott BA, Brown JM, Conville PS and Wallace RJ (2006) Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. Based on current molecular taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews* 19(2): 259–282.
- Carone, M (2003) Bacterias fitopatógenas, p 53-55. La Habana: CIDISIVAC. Chun J, Seong CN, Bae KS, Lee KJ, Kang SO, Goodfellow M and Hah YC (1998) *Nocardia flavorosea* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48:901–905.

- Clarridge JE (2004) Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 17:840–862.
- Cloud JL, Conville PS, Croft A, Harmsen D, Witebsky FG, and Carroll KC (2004) Evaluation of partial 16S ribosomal DNA sequencing for identification of *Nocardia* species by using the MicroSeq 500 system with an expanded database. *J. Clin. Microbiol.* 42:578–584.
- CNSV-MINAG (2001) Programa de defensa. Cultivo del tabaco, p.27. La Habana, Cuba: Agrinfor.
- CNSV-MINAG (2007) Lista Oficial de Cuarentena de la República de Cuba, p.18. La Habana, Cuba: Agrinfor.
- CNSV-MINAG (2010) Fasciaciones, proliferación de brotes y agallas. Comunicación de riesgo. Serie de la Oficina de Vigilancia. Centro Nacional de Sanidad Vegetal, p.7. La Habana, Cuba: Agrinfor.
- Conrath U, Pieterse CM and Mauch-Mani B (2002) Priming in plantpathogen interactions. *Trends Plant Sci* 7: 210–216.
- Conville PS, Brown JM, Steigerwalt AG, Lee JW, Byrer DE, Anderson VL, Dorman SE, Holland SM, Cahill B, Carroll KC and Witebsky FG (2003) *Nocardia veterana* as a pathogen in North American patients. *J. Clin. Microbiol.* 41:2560–68.
- Conville PS and Witebsky FG (2005) Multiple copies of the 16S rRNA gene in *Nocardiova* isolates and implications for sequence-based identification procedures. *J. Clin. Microbiol.* 43:2881-85.
- Conville PS, Zelazny AM and Witebsky FG (2006) Analysis of *secA1* gene sequences for identification of *Nocardia* species. *J. Clin. Microbiol.* 44:2760-66.
- Conville PS and Witebsky FG (2010) The Complexity of *Nocardia* Taxonomy: Implications for the Clinical Microbiology Laboratory. *Clinical Microbiology Newsletter* 32(16):119-125.
- Córdoba-Sellés MC, Martínez-Culebras P, García D and Jordá C (2009) *Rhodococcus fascians*: causal agent of false broomrape of tobacco in Guatemala. *Journal of Plant Pathology* 91(4, Supplement):112.
- Demaree JB and Smith NR (1952) *Nocardia vaccinii* n. sp. Causing galls on blueberry plants. *Phytopathology* 42:249-252.
- Eshraghi SS, Talebi M, Namaki S and Mirshafiey A (2009) *Nocardia*. *Journal of Chinese Clinical Medicine* 4(Supplement):48-66.
- Espino EM (2006) Manual práctico el supervisor agrícola del tabaco. Segunda edición, p.55. MINAG. La Habana, Cuba: Agrinfor.
- Espino EM (2009) Guía para el cultivo del tabaco. 2009-2010, p.64. MINAG, La Habana, Cuba: Agrinfor.



- Espino EM (2010) -Subdirección Técnico-Productiva del Instituto de Investigaciones del Tabaco- comunicación personal. Fecha 22 de enero de 2010.
- Everest GJ, Cook AE, Roes-Hill M and Meyers PR (2011) *Nocardia rhamnosiphila* sp. nov., isolated from soil. *Systematic and Applied Microbiology* 34: 508– 512.
- Felsenstein J (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17:368-376.
- Furuya N, Shimokusuzono F, Nakamura Y, Nishimura K, Takeshita M, Matsuyama N, Manabe K and Takanami Y (2004) Crown gall of tobacco caused by *Agrobacterium tumefaciens* biovar 1 in tobacco fields. *Journal of General Plant Pathology* 70:39-44.
- Fuentes C y Blanco JL (2007) Los postulados de Koch: revisión histórica y perspectiva actual. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 1(2):262-266.
- Gabrowska TI (1968) Virosis y falso Orobanche en tabaco. *Revista Agricultura (Academia de Ciencias de Cuba)* 2(2):66-76.
- Gabrowska TI (1976) False broomrape on tobacco, a disease new to Bulgaria. *Rastitelnozashchitna Nauka* (3):13-23.
- González A (1982) Distribution and intensity of infestation of false broomrape in the most important tobacco zones of Cuba. *Ciencias de la Agricultura* 11:15-24.
- Goodfellow M and Lechavalier MF (1989) Genus *Nocardia* Trevisan 1889. In: Williams ST, Sharpe ME, Holt JG (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol 4. Pp. 2350-2353. Baltimore, Williams and Wilkins Co.
- Goodfellow M (1992) The family Nocaridiaceae. In: *The prokaryotes*, ed: A Balows, HG Truper, M Dworkin, W Harden and KH Schleifer, p.1188–1213. New York, N.Y: Springer-Verlag.
- Hamilton J, Lowe R, and Skoog F (1972) False broomrape: A physiological disorder caused by growth-regulator imbalance. *Plant Physiol.* 50:303–304.
- Harrigan WF y McCance EM (1968) *Métodos de laboratorio en Microbiología*, p. 62- 80. España: León, Academia.
- Helal M, Kong F, Chen SCA, Bain M, Christen R and Sintchenko V (2011) Defining reference sequences for *Nocardia* species by similarity and clustering analyses of 16S rRNA gene sequence data. *PLoS ONE* 6(6): e19517.
- Hernández A, Ascanio MO, Morales M y Cabrera A (2006) Correlación de la nueva versión de clasificación genética de los suelos de Cuba con las clasificaciones internacionales (Soil Taxonomy FAO-UNESCO y Word Reference Base) y las clasificaciones nacionales (Clasificación de series de suelos y 2da clasificación genética de los suelos de Cuba), 62 pp. México: Universidad de Layasit.

- Holmes S (2003) Bootstrapping Phylogenetic Trees: Theory and Methods. *Statistical Science* 18(2): 241–255.
- Intra B, Mungsuntisuk I, Nihira T, Igarashi Y and Panbangred W (2011) Identification of actinomycetes from plant rhizospheric soils with inhibitory activity against *Colletotrichum* spp., the causative agent of anthracnose disease. *BMC Research Notes* 4:98.
- Janda M and Abbott S (2007) 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology* 45(9):2761–64.
- Joshi M and Loria R (2007) *Streptomyces turgidiscabies* possesses a functional cytokinin biosynthetic pathway and produces leafy galls. *Mol Plant Microbe interact.* 20(7):751-758.
- Jurado V, Boiron P, Kroppenstedt RM, Laurent F, Couble A, Laiz L, Klenk H-P, González JM, Saiz-Jimenez C, Mounié D, Bergeron E and Rodríguez-Nava V (2008) *Nocardia altamirensis* sp. nov., isolated from Altamira cave, Cantabria, Spain.
- International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58: 2210–14 Kaewkla O and Franco CM (2010) *Nocardia callitridis* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from a surface-sterilized root of an Australian native pine tree. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 1532-1536.
- Kageyama, A., Yazawa, K, Nishimura, K. and Mikami, Y (2004) *Nocardia testaceus* sp. nov. and *Nocardia senatus* sp. nov., isolated from patients in Japan. *Journal Microbiol. Immunol.* 48: 271-276.
- Kang Y, Takeda K, Yazawa K and Mikami Y (2009) Phylogenetic studies of *Gordonia* species based on *gyrB* and *secA1* gene analyses. *Mycopathologia* 167:95–105.
- Kim TU, Cho SH, Han JH, Min YS, Burm HL and BumSK (2012) Diversity and physiological properties of root endophytic Actinobacteria in native herbaceous plants of Korea. *The Journal of Microbiology* 50(1): 50–57.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.
- Kong F, Wang H, Zhang E, Sintchenko V, Xiao M, Sorrell TC, Chen X and Chen SCA (2010) *secA1* gene sequence polymorphisms for species identification of *Nocardia* species and recognition of intraspecies genetic diversity. *Journal of Clinical Microbiology* 48(11):3928–34.
- Lamm AS, Khare A, Conville P, Lau PC, Bergeron H and Rosazza JP (2009) *Nocardia iowensis* sp. nov., an organism rich in biocatalytically important enzymes and nitric oxide synthase. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59:2408–14.

- Larruskain J, Idigoras P, Marimón JM and Pérez-Trallero E (2011) Susceptibility of 186 *Nocardia* sp. isolates to 20 antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55(6): 2995–98.
- Lucas GB (1975) False Broomrape. In *Tobacco diseases*, ed: Parker HE & Sons, p. 589-592. NC 27526 USA: Fuquay-Varina.
- Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV and Clark DP (2009) Brock. *Biology of Microorganisms* (12th Edition) Pearson Benjamin Cummings, 1061 pp. San Francisco, CA
- Marcelli E (1950) Carattere endimico dei „tumeri radicali“ presumibilmente da *Bact. tumefaciens*, in campo di tabacco (nota preliminare). *Tabacco* 54:199–201.
- Martínez J, Romay Z, Rojas T y Guerra G (1985) *Manual Práctico de Microbiología*, pp. 212. La Habana: Pueblo y Educación.
- McTaggart LR, Richardson SE, Witkowska M and Zhang SX (2010) Phylogeny and identification of *Nocardia* species on the basis of multilocus sequence analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 48(12):4525–4533.
- Méndez R (1998) Característica, distribución y daños del falso Orobanche en el cultivo del tabaco. Tesis de Maestría. En Facultad de Ciencias Agropecuarias. UCLV “Marta Abreu”. 633.71 Men C.
- Miller C and Lucas G (1970) False broomrape, a destructive tobacco disease in Nicaragua. *Phytopathology* 60:1540 (Abstract).
- Mitra K, Frank J and Driessen AJM (2006) Co- and post-translational translocation through the protein-conducting channel: analogous mechanisms at work? *Nature Struct. Mol. Biol.* 13:957–964.
- MINAG (1998) *Instructivo técnico para el cultivo del tabaco*. Ed. Sedagri, 128 pp La Habana: Agrinfor.
- Moeinzadeh A, Sharif-Zadeh F, Ahmadzadeh M and Heidari-Tajabadi F (2010) Biopriming of sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed with *Pseudomonas fluorescens* for improvement of seed invigoration and seedling growth. *Australian Journal of Crop Science* 4(7): 564-570.
- Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant* 15:473-497.
- Murray PR, Niles AC and Heeren RL (1988) Modified Thayer-Martin medium for recovery of *Nocardia* species from contaminated specimens. *J. Clin Microbiol.* 26:1219-20.
- Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC and Tenover RH eds (1999) *Manual of Clinical Microbiology*, 7th edition, pp. 1773. Washington, D.C: ASM Press.

- Newman MA, Maxwell DJ, Molinaro A and Parrilli M (2007) Priming, induction and modulation of plant defence responses by bacterial lipopolysaccharides. *Journal of Endotoxin Research* 13 (2): 13-69.
- Nielsen L (1978) Some properties of the false broomrape causal agent and its persistence in soil and refrigerated and frozen tumour tissues. *Phytopathology* 68(7):1068-70.
- Öden S, Demirci M and Zorba T (2004) Some organic treatments against to False Broomrape disease on tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Ekoloji* 13(51):20-25.
- Osborne AR, Rapoport TA and van den Berg B (2005) Protein translocation by the Sec61/SecY channel. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21:529–550.
- Patel JB, Wallace RJ, Brown-Elliott Jr BA, Taylor T, Imperatrice C, Leonard DGB, Wilson RW, Mann L, Jost KC and Nachamkin I (2004) Sequence-based identification of aerobic actinomycetes. *J. Clin. Microbiol.* 42:2530–40.
- Pazos V y Casadesús L (1990) *Métodos básicos de microbiología*, ed: A. Voisin, p.39. La Habana. EMPES.
- Pérez-Martínez I, Zhao Y, Murillo J, Sundin GW and Ramos C (2008) Global genomic analysis of *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi* plasmids. *J Bacteriol.* 190(2):625-35.
- Petti CA (2007). Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Clin. Infect. Dis.* 44:1108–14.
- Putnam ML and Miller ML (2007) *Rhodococcus fascians* in herbaceous perennials. *Plant Dis.* 91:1064–76.
- Rodicio MR y Mendoza MC (2004) Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 22(4):238-245.
- Roth A, Andrees S, Kroppenstedt RM, Harmsen D and Mauch H. (2003) Phylogeny of the genus *Nocardia* based on reassessed 16S rRNA gene sequences reveals underspeciation and division of strains classified as *Nocardia asteroides* into three established species and two unnamed taxons. *J. Clin. Microbiol.* 41:851–856.
- Saitou N and Nei M (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Ed. ColdSpringHarbor Laboratory Press, Vol. 1, 2, 3. ColdSpringHarbor. NY.
- Schaad NW, Jones JB and Chun W (2001) *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. Third Edition. The American Phytopathological Society Press, 373 pp. St. Paul, Minnesota, USA.

- Schlaberg R, Huard RC and Della-Latta P (2008) *Nocardia cyriacigeorgica*, an emerging pathogen in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 46:265-273.
- Schmidt MG and Kiser KB (1999) SecA: the ubiquitous component of preprotein translocase in prokaryotes. *Microbes Infect.* 1:993–1004.
- Skok J (1967) Tumor and teratoma induction in tobacco plants by debudding. *PlantPhysiol.* 42(6):767-773.
- Stackebrandt E, Rainey FA and Ward-Rainey NL (1997) Proposal for a new hierarchic classification system. *Actinobacteria classis. Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 479-471.
- Swanepoel A (2001) The efficacy of various chemicals and biological agents in the control of false broomrape (*Agrobacterium tumefaciens*) in flue-cured tobacco. CORESTA Meet. Agro-Phyto Groups, Cape Town, abstr. AP19.
- Tamura K, Dudley J, Nei M and Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-99.
- Thompson J, Higgins D and Gibson T (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-80.
- Trotter A (1946) Sulla presenza di tumori radicali nelle coltivazioni di tabacco di pieno campo. *Ric Ossvz Divulg Fitopat Campania Mezzogiorno (Portici)* 10:65–80.
- Uçkay I, Bouchuiguir-Wafa K, Ninet B, Emonet S, Assal M, Harbarth S, Schrenzel J (2010) Posttraumatic ankle arthritis due to a novel *Nocardia* species. *Infection* 38(5): 407-412.
- Van Loon, LC (2007) Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* 119:243–254.
- Van Luin A, Manson WL, van der Molen L, van der Heide and van Son WJ (2008) An intra-renal abscess as presenting symptom of an infection with *Nocardia farcinica* in a patient after renal transplantation. *Transpl Infect dis.* 10(3): 214-217.
- Volcy C (2008) Génesis y evolución de los postulados de Koch y su relación con la fitopatología. Una revisión. *Agronomía Colombiana* 26(1):107-115.
- Von Heijne G (1998) Life and death of a signal peptide. *Nature* 396:111–112. Vrontou E and Economou A (2004) Structure and function of SecA, the preprotein translocase nanomotor. *Biochim BiophysActa* 1694:67–80.
- Watanabe K, Shinagawa M, Amishima M, Iida S, Yazawa K, Kageyama A, Ando A and Mikami Y (2006) First Clinical Isolates of *Nocardia carnei*, *Nocardia elegans*, *Nocardia paucivorans*, *Nocardia puris* and *Nocardia takedensis* in Japan. *Jpn. J. Med. Mycol.* 47: 85-89.

- Weisburg WG, M. S. Barns, A. Pelletier and JD Lane (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173:697-703.
- Xing K, Qin S, Fei SM, Lin Q, Bian GK, Miao Q, Wang Y, Cao CL, Tang SK, Jiang JH and Li WJ (2011) *Nocardia endophytica* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the oil-seed plant *Jatropha curcas* L. *Int J Syst Evol Microbiol.* 61(8): 1854-58
- Yoshida M and Yamaguchi T (2004) Histological observation and presence of pathogens in diseased roots of melon with root tumor caused by *Streptomyces* sp. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 70(3):76-183.
- Zelazny AM, Calhoun LB, Li L, Shea YR and Fischer SH (2005) Identification of *Mycobacterium* species by *secA1* sequences. *J. Clin. Microbiol.* 43:1051–58.
- Zhang Z, Schwartz S, Wagner L and Miller W (2000) A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* 7(1-2):203-214.
- Zhao GZ, Li J, Zhu WY, Klenk HP, Xu LH and Li WJ (2011) *Nocardia artemisiae* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from a surface-sterilized stem of *Artemisia annua* L. *Int J Syst Evol Microbiol.* 61(12):2933-37