

TÉCNICA DE DIAGNÓSTICO MÁS FACTIBLE PARA LA DETECCIÓN DE *LEIFSONIA Xyli* SUBSP. *Xyli* EN CUBA

The most feasible diagnostic technique for the detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in Cuba

 Javier Delgado Padrón^{1*},  Iliana Miranda Cabrera²,  Yaquelin Puchades Izaguirre¹

¹Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA). Carretera CUJAE Km 1 ½. Boyeros, C.P. 19390. La Habana, Cuba.

²Departamento de Sanidad Vegetal. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Carretera de Jamaica y Autopista Nacional, Apartado 10, San José de las Lajas C.P. 32700, Mayabeque, Cuba.

RESUMEN: El objetivo de este trabajo fue identificar la técnica de diagnóstico más factible para la detección de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Davis) Evtushenko en la caña de azúcar en Cuba. Se realizó una revisión sistemática de artículos publicados en internet, incluidos en revistas indexadas con revisión por pares, en el periodo del 2000 al 2023, utilizando como palabras clave “diagnóstico de enfermedades en caña de azúcar”, “*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*”, “raquitismo de los retoños” y la traducción en inglés. El criterio de inclusión fue tomar artículos que, al menos, usaran una técnica de diagnóstico para la detección de la bacteria y mostraran datos de su sensibilidad y/o especificidad con los cuales se realizó un meta-análisis. Se confeccionó un gráfico de forest plot según razones de odds ratio e intervalo de confianza al 95 %. Fueron identificadas 12 técnicas para el diagnóstico del raquitismo de los retoños. La mayor precisión se obtiene con las técnicas serológica (ELISA) y las moleculares (HANr y LAMP), muy similares a estas están TBIA y DOT BLOT; mientras que, IFI y IFM tuvieron un intervalo de confianza más amplio. Se identificó la TBIA como la técnica de diagnóstico más factible para la detección de *L. xyli* subsp. *xyli* en la caña de azúcar en Cuba.

Palabras clave: Caña de azúcar, *Saccharum* spp., raquitismo de los retoños, diagnóstico vegetal, TBIA.

ABSTRACT: The objective of this work was to identify the most feasible diagnostic technique to detect *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Davis) Evtushenko in sugarcane in Cuba. A systematic review of papers published online included in peer-reviewed indexed journals was carried out from 2000 to 2023. The keywords used were “diagnosis of diseases in sugarcane”, “*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*”, “ratoon stunting disease” and their Spanish translation. The inclusion criterion was to take those papers that at least used one diagnostic technique for the bacterium detection that showed data on its sensitivity and/or specificity, with which a meta-analysis was carried out. A forest plot was created according to odds ratios and 95 % confidence intervals. Twelve techniques were identified for the diagnosis of ratoon stunting disease. The greatest accuracy is obtained with serological (ELISA) and molecular (HANr and LAMP) techniques; TBIA and DOT BLOT are very similar to them, while IFA and IFM had a wider confidence interval. TBIA was identified as the most feasible diagnostic technique to detect *L. xyli* subsp. *xyli* in sugarcane in Cuba.

Key words: Sugar cane, *Saccharum* spp., ratoon stunting disease, vegetable diagnosis, TBIA.

INTRODUCCIÓN

El raquitismo de los retoños (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Davis) Evtushenko) se observó por primera vez en Australia, en el distrito de Mackay (Queensland), durante el verano de 1944-1945 al producirse, sin causa aparente, la pérdida del vigor del cultivar 'Q28' y actualmente la enfermedad está presente en casi todos los países donde se cultiva caña de azúcar (1). En Cuba, se encuentra dentro del inventario de enfermedades bacterianas informadas desde 1953 (2) y está ampliamente diseminada en las plantaciones comerciales del territorio nacional.

La bacteria coloniza y se multiplica en los haces vasculares de la planta de la caña de azúcar; mientras se extiende sistémicamente a otros órganos (3). La disminución de rendimiento agroindustrial, en áreas afectadas, oscila entre 15 y 30 % según la susceptibilidad del cultivar, número de cosechas efectuadas y condiciones agroclimáticas adversas (4). Además reduce el contenido de sacarosa, afecta el crecimiento de las plantas lo que se manifiesta en la disminución de la altura, diámetro y peso de los tallos, y un acortamiento de los entrenudos. Se produce retardo en la brotación y reduce el número de tallos por plantón (5).

*Autor para correspondencia: javier.delgado@inica.azcuba.cu

Recibido: 09/04/2025

Aceptado: 18/09/2025

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener conflicto de intereses

Contribución de los autores: Conceptualización, Curación de datos, Investigación, Validación, Visualización, Redacción: revisión y edición: Javier Delgado Padrón. Conceptualización, Análisis formal, Investigación, Validación, Redacción: revisión y edición: Iliana Miranda Cabrera. Investigación Validación, Redacción: revisión y edición: Yaquelin Puchades Izaguirre.



Este artículo se encuentra bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial (CC BY-NC 4.0).
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



En los haces fibrovasculares de la base de los nudos, cuando se hacen cortes longitudinales de un tallo maduro, pueden aparecer coloraciones rojo naranja, en forma de pequeños puntos y rayas (6, 7). En los brotes jóvenes del plantón de uno a dos meses de edad, se presenta una coloración rosada-salmón de los tejidos de los nudos superiores y del punto de crecimiento (8). No existe relación entre la sintomatología interna y externa en las plantas enfermas con raquitismo de los retoños, ambas manifestaciones se pueden presentar juntas o independientes.

En tal sentido, Magarey (9) señaló la ausencia de síntomas externos, además del retraso del crecimiento de las plantas. Frecuentemente, el efecto de la enfermedad se descarta porque los síntomas pueden confundirse con los ocasionados por déficit hídricos o nutricionales, atenciones culturales inadecuadas o presencia de otros agentes nocivos, por lo que es difícil diagnosticar el raquitismo de los retoños por las características fenotípicas de las plantaciones cañeras.

Sobre la base de las consideraciones anteriores se hace necesario la realización de diagnósticos en el laboratorio, a través de técnicas sensibles, rápidas y altamente específicas, que permitan la identificación de las plantas infectadas con la bacteria. Entre las técnicas descritas se encuentran la microscopia de contraste de fase (10); las serológicas: Ensayo Inmuno Enzimático de Fase Sólida (DOT BLOT) (11), Ensayo Inmuno Absorbente Ligado a Enzimas (ELISA) e Inmuno Impresión Directa de Tejidos (TBIA) (12) y las moleculares como Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (13), Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa en Tiempo Real (qPCR) (8) y Amplificación Isotérmica de Ácidos Nucleicos (LAMP) (14, 15, 16).

En Cuba se utilizaron, en el diagnóstico del raquitismo de los retoños, la microscopia de contraste de fase (17); técnicas serológicas por Inmuno Impresión Directa de Tejidos (TBIA) (18) y Ensayo Inmuno Enzimático de Fase Sólida (DOT BLOT) (19); y las moleculares como Hibridación de Ácidos Nucleicos no Radiactiva (HANnr) y la Reacción en Cadena de la Polimerasa: variantes Simple (PCR) y Anidada (nPCR) (20). Sin embargo, los estudios de dispersión de la enfermedad no han sido sistemáticos.

En los bancos de semilla se utiliza la tinción de los vasos de xilema para determinar la calidad del material a utilizar en las nuevas plantaciones, pero no se realiza ningún análisis de laboratorio para detectar la presencia de *L. xyli* subsp. *xyli*. Es evidente entonces, la posible propagación de la enfermedad mediante los propágulos de caña de azúcar y la necesidad de contrastar la sensibilidad de detección de las técnicas. Por ello, el objetivo de este trabajo es identificar la técnica de diagnóstico más factible para la detección de *L. xyli* subsp. *xyli* en la caña de azúcar en Cuba.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó una revisión sistemática en las bases de datos Google académico (<http://scholar.google.es>), Scopus (<https://www.scopus.com/home.uri>), Science Direct (<https://www.sciencedirect.com>) y Scielo (<https://www.scielo.org>), utilizando como palabras clave “diagnóstico de enfermedades en caña de azúcar”, “*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*”, “raquitismo de los retoños” y la traducción en inglés

“diagnosis of diseases in sugarcane”, “ratoon stunting disease” y “RSD”. La búsqueda abarcó el periodo del 2000 hasta el 2023. Se excluyeron los artículos que no incluían valores de sensibilidad y/o especificidad de una técnica de diagnóstico en comparación con otra.

Con los artículos científicos consultados se conformó una base de datos en Microsoft Excel 2013 que incluyó, para cada uno de estos, año de publicación, autores, país donde se realizó el estudio, revista, técnica de diagnóstico utilizada en la detección del raquitismo de los retoños, número de muestras analizadas por una técnica, número de muestras analizadas por otra técnica y cantidad de muestras con reacción positiva a la bacteria por una u otra técnica, respectivamente.

Se realizó un meta-análisis para el cual se empleó la función *metabin* de la librería meta de Rstudio versión 1.4.1106 del 2021. Se realizó gráfico de forest plot según razones de odds ratio e intervalo de confianza al 95 %, se graficó el error estándar según intervalo [-2,2].

RESULTADOS

La revisión sistemática de la literatura científica, sobre el raquitismo de los retoños, permitió consultar 518 artículos, en los cuales 120 utilizaron, al menos, una técnica de diagnóstico para la detección de la enfermedad y 24 hacían comparaciones de los resultados por, al menos, dos de estas.

Se identificaron 12 técnicas de diagnóstico para la detección de la bacteria (Fig. 1) y dentro de estas las más utilizadas son: PCR (37 %), nPCR (11 %) y TBIA (10 %) y las menos empleadas: IFI (Microscopia de inmunofluorescencia), IFM (Inmunofluorescencia indirecta) y, solamente en un artículo, se utilizó la HANnr. Sin embargo, las técnicas moleculares se realizan principalmente para investigaciones muy puntuales donde se analizan pocas muestras; mientras que, para estudios más amplios, conducentes a la liberación sistemática del material de los cultivares utilizados como semilla, se utilizan las técnicas serológicas (21).

El estadístico de heterogeneidad alcanzó significación estadística ($I^2 = 85 \%$, $p < 0,01$), por lo que las técnicas de diagnóstico difieren entre sí. Según el odds ratio, las técnicas presentan valores similares con la cual se comparan, a excepción de EB EIA y Microscopia de Contraste de Fases. La mayor precisión se obtiene con las técnicas serológica (ELISA) y las moleculares (HANnr y LAMP), muy similares a estas están TBIA y DOT BLOT; mientras que, IFI y IFM tuvieron un intervalo de confianza más amplio.

No hubo diferencias estadísticas significativas (intervalos inclusivos) entre las técnicas analizadas ELISA, HANnr y LAMP. Estas son más precisas para el diagnóstico del raquitismo de los retoños en la caña de azúcar (proporcionan menos falsos negativos).

La técnica de diagnóstico por microscopia de contraste de fases presentó el peor comportamiento, en comparación con el resto de las técnicas, al aportar mayor cantidad de muestras con resultados considerados como falsos negativos con respecto a los verdaderos positivos. Similar comportamiento mostraron EB EIA y la PCR, aunque esta última con mejores resultados. Las otras aportaron mayor número de verdaderos positivos (Figura 2).

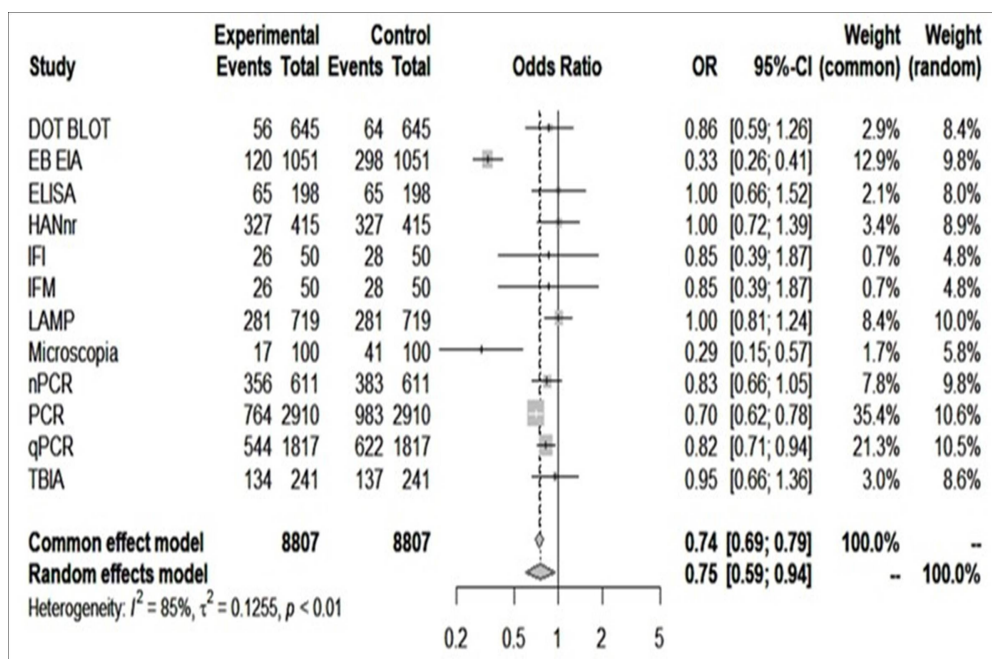


Figura 1. Diagrama Forest-plot que compara técnicas de diagnóstico para la detección de *L. xyli* subsp. *xyli* en artículos publicados entre 2000 y 2023 / Forest-plot diagram comparing diagnostic techniques to detect *L. xyli* subsp. *xyli* in journal papers published between 2000 and 2023.

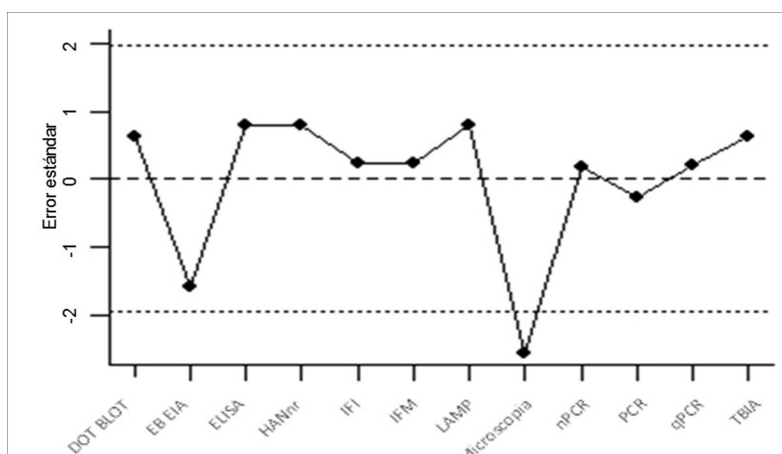


Figura 2. Diagnóstico de influencia de cada técnica utilizada en la detección del raquitismo de los retoños en la caña de azúcar, según intervalo [-2,2]. / Diagnosis of the influence of each technique used in the detection of ratoon stunting disease in sugarcane, according to interval [-2,2].

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y que ELISA necesita equipamientos para su desarrollo se propone, para las condiciones de Cuba, a la Inmuno Impresión Directa de Tejidos (TBIA) como la técnica de diagnóstico más factible para la detección de *L. xyli* subsp. *xyli* en la caña de azúcar.

DISCUSIÓN

Las técnicas basadas en la microscopía y la serología no tienen la sensibilidad suficiente para detectar bajas concentraciones bacterianas en los tejidos vegetales analizados (22); por consiguiente, se tienen que emplear técnicas basadas en el reconocimiento de la molécula de ADN.

Para Hoy *et al.* (23) la microscopía de contraste de fase puede detectar el agente causal del raquitismo de los retoños directamente de los jugos de la caña de azúcar.

Esta técnica puede determinar el número del agente patógeno cuantitativamente, pero su sensibilidad todavía no es satisfactoria y el procedimiento es tedioso y complicado. Ghai *et al.* (24) observaron, al comparar los resultados del diagnóstico del raquitismo de los retoños de la IFI y IFM con la LAMP, que son semejantes. Estas técnicas no se utilizan de forma rutinaria porque requieren mucho tiempo para su ejecución, son caras y necesitan la producción de antiseros policlonales.

La PCR tiene alta confiabilidad y especificidad para la detección de *L. xyli* subsp. *xyli* (25). Sin embargo, algunas sustancias presentes en los tejidos de las plantas (polisacáridos, proteínas, compuestos fenólicos y otros metabolitos secundarios) pueden interferir en la amplificación del ADN lo que conlleva a que aumente el número de muestras en las cuales se detecten tanto, falsos negativos como positivos (26).

Los polisacáridos y polifenoles pueden contaminar e inhibir la extracción del ADN u oxidar este durante el proceso de lisis (27). Esta situación provoca la aparición de muchos falsos negativos en el diagnóstico de la bacteria cuando se utilizan técnicas moleculares. En este mismo sentido, Angulo *et al.* (28) plantearon que varios tipos de metabolitos secundarios (flavonoides, terpenos, polifenoles, quinonas y alcaloides) secretados por las plantas y otros componentes en sus tejidos pueden interferir con la calidad de la extracción y purificación del ADN, lo cual disminuye la eficacia de acoplamiento e inhibición de la Taq polimerasa en la PCR.

Según lo planteado por Iglesia *et al.* (14) la HANr presenta ventajas tecnológicas y económicas evidentes sobre los ensayos de PCR, en cuanto a la facilidad de manipulación, la disminución de los riesgos de contaminación, el costo inferior de infraestructura y la posibilidad de procesar un mayor número de muestras. Esta última no puede detectar concentraciones muy bajas de la bacteria en plantas utilizadas como semilla, por lo que se puede comprometer la salud de las futuras plantaciones (29). Además, nPCR es más específica y sensible, lo que disminuye los porcentajes de falsos negativos en el diagnóstico del raquitismo de los retoños; es rápida en su ejecución y no requiere el equipo sofisticado; también permite conservar las muestras por un período más largo antes de procesarla.

Cuando Wu *et al.* (30), compararon las técnicas de diagnóstico PCR, qPCR y LAMP; determinaron que esta última tiene mayor simplicidad en su ejecución, es más rápida y muy específica. La LAMP se informó ampliamente en la literatura, como una técnica de diagnóstico en la detección de agentes patógenos en las plantas comparable, en cuanto la sensibilidad y especificidad, a la qPCR y nPCR (31).

La baja sensibilidad de la qPCR pudiera ser debido a la pérdida de ADN de *L. xyli* subsp. *xyli* durante la extracción del ácido nucleico y la purificación, la presencia los inhibidores de la polimerización del ADN, o ambos (32). No obstante, también la sensibilidad extrema de la LAMP pudiera dar falsos positivos (33).

La qPCR solo se puede realizar en laboratorios especializados de diagnósticos, esta técnica es complicada en su ejecución y necesitan mucho tiempo para procesar las muestras; sin embargo, proporciona la cuantificación de los agentes patógenos; por lo que es una medida indirecta de la magnitud de la infección en una plantación de caña de azúcar (11). En contraste, la LAMP es un método semi-cuantitativo; sin embargo, Burman *et al.* (15) observaron correlación positiva con la cantidad de ADN de *L. xyli* subsp. *xyli* en el jugo de las muestras, con las concentraciones bacterianas en las plantas estudiadas.

La LAMP es superior a la PCR y EB-EIA en su simplicidad y rapidez de ejecución que permite un diagnóstico exacto y eficaz. La PCR necesita tiempo en la electroforesis en gel de agarosa y requiere de equipos que son caros en el mercado. Es más sensible que EB EIA por lo que presentará menos falsos negativos (25).

Por otro lado, las técnicas de diagnósticos serológicas todavía se prefieren para la detección de agentes patógenos,

ya que se pueden analizar grandes cantidades de muestras por campo de manera rentable (34). Se emplean para la detección rápida, tanto cualitativa como cuantitativa, de agentes patógenos en plantas. Las mismas se basan en la especificidad y alta afinidad de las interacciones entre un anticuerpo y un antígeno (35).

La PCR requiere de instrumentos más costosos y el análisis de las muestras se demora mucho tiempo; mientras que, el ELISA necesita de concentraciones más altas de *L. xyli* subsp. *xyli* en el jugo de caña de azúcar infectada para su detección. Los ensayos que requieren una diana molecular, necesitan de la extracción del ADN genómico. En el desarrollo del diagnóstico por PCR es necesario el empleo de inhibidores de esta técnica debido a su existencia en los tejidos vegetales (polisacáridos, proteínas, compuestos fenólicos y otros metabolitos secundarios de las plantas), que tienden a interferir en la reacción. Estas sustancias son difíciles de detectar y eliminar del procedimiento de extracción de ADN genómico. Requieren de equipos de alto costo, lo que restringe su aplicación en países de escasos recursos (36).

En Jamaica, Falloon *et al.* (37) utilizaron TBIA para la detección del raquitismo de los retoños y la confirmación de las muestras dudosas por esta técnica la analizaron mediante nPCR. Mientras que, ELISA y TBIA son utilizadas en la detección de *L. xyli* subsp. *xyli* en los propágulos destinados a semilla agámica en la propagación de la caña de azúcar. Parameswari *et al.* (12), al comparar estas determinaron que la primera era más sensible, por lo que la segunda da más falsos negativos.

El DOT-BLOT se emplea en Brasil para determinar la distribución de *L. xyli* subsp. *xyli* en las plantaciones cañeras (38); mientras que, en Argentina se utiliza la técnica TBIA para el diagnóstico del raquitismo de los retoños en la semilla agámica de la caña de azúcar (39).

Las tecnologías moleculares se consideran más sensibles y específicas que la investigación microscópica y los ensayos serológicos, son más costosas, requieren mayor habilidad y mano de obra. Con frecuencia, también implican procedimientos de bioensayo complejos y requieren equipo adicional, en particular para la preparación de muestras, por lo que no son completamente adecuadas para su aplicación en la explotación (15, 36).

CONCLUSIONES

Se identificó la Inmuno Impresión Directa de Tejidos (TBIA) como la técnica de diagnóstico más factible para la detección de *L. xyli* subsp. *xyli* en la caña de azúcar en Cuba.

REFERENCIAS

1. CABI. CABI Compendium. CABI Digital Library. 2021. Disponible desde <https://doi.org/10.1079/cabicompndium.13712> [Acceso 8 de diciembre 2023].
2. Chinea A, Zayas E, Bruner S. Inventario de enfermedades de la caña de azúcar en Cuba: tercera etapa. Cuba & Caña. 2019; 22 (3): 8-14.
3. Rodríguez JP, Cicarelli M, de Andrade AB, Larissa F, Appezzato B, Aranha LE. Histopathology of the shoot apex of sugarcane colonized by *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. Phytopathology. 2022; 112 (10): 2062-2071.

4. García FHS, Daneluzzi GS, Mazzafera P, de Almeida M, Nyheim O, Azevedo RA, *et al.* Ratoon Stunting Disease (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*) affects source-sink relationship in sugarcane by decreasing sugar partitioning to tillers. 2021; 116. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101723>.
5. Riaz M. The Fiji sugar industry: Sustainability challenges and the way forward. Sugar Technology. 2022; 24 (3): 662-678. <https://doi.org/10.1007/s12355-022-01132-4>.
6. Nilima K, Singh A. A review on major diseases of sugarcane (*Saccharum officinarum*) and their management in India. International Journal of Creative Research Thoughts. 2024; 12 (5): 828-841.
7. Wijayanti KS, Hidayah N, Yulianti T, Windiastika G, Supriyono. PCR detection of ratoon stunting disease in sugarcane nursery. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 2025; 1439: 1-6. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1439/1/012005>.
8. Magarey RC, McHardie R, Hession M, Cripps G, Burgess D, Spannagle *et al.* Incidence and economic effects of ratoon stunting disease on the Queensland sugarcane industry. Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technologists. 2021; 42: 520-526.
9. Magarey R. Field guide diseases of Australian sugarcane. Australia. Sugar Research Australia Limited. 2022. 114 pp.
10. Young AJ, Kawamata A, Ensbey MA, Lambley E, Nock CJ. Efficient Diagnosis of Ratoon Stunting Disease of Sugarcane by Quantitative PCR on Pooled Leaf Sheath Biopsies. Plant Disease. 2016; 100 (12): 2349-2545.
11. Andreato C, Gazaffi R, Aguiar MM, Aranha LE, Urashima AS. Effect of thermotherapy, *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* titres, sugarcane genotype and diagnostic techniques on ratoon stunt control in Brazil. Journal of Applied Microbiology. 2022; 133: 1676-1687.
12. Parameswari B, Nithya K, Viswanathan R. Sugarcane: Ratoon stunting and Grassy shoot. In: Khan MR, Haque Z, Ahmad F (Eds). Diseases of nationally important field crops. New Delhi. Today & Tomorrow's Printers and Publishers. 2021. p 235-244.
13. Racedo J, Noguera AS, Castagnaro AP, Perera MF. Biotechnological strategies adopted for sugarcane disease management in Tucumán, Argentina. Plants. 2023; 12: 1-10.
14. Burman S, Mason MG, Hintzsche J, Zou Y, Gibbs L, MacGillcuddy L, *et al.* Changing the diagnostic paradigm for sugarcane: development of a mill-based diagnostic for ratoon stunting disease in crude cane juice. Frontier in Plant Science. 2023; 14: 1-13.
15. Chakraborty M, Bhuiyan SA, Strachan S, Saha S, Mahmudunnabi RC, Nguyen NT, *et al.* A novel *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* quantitative LAMP-based diagnostic correlated with sugarcane ratoon stunting disease rating. Crop & Pasture Science. 2024a; 75: 1-11. <https://doi.org/10.1071/CP24053>.
16. Strachan S, Chakraborty M, Sallam M, Bhuiyan SA, Ford R, Nguyen NT. Maximising affordability of real-time colorimetric LAMP assays. Micromachines. 2023; 14 (2101): 1-20. <https://doi.org/10.3390/mi14112101>
17. Chinea A, Pérez G, Matos M. Resistencia genética al raquitismo de los retoños en caña de azúcar Cuba & Caña. 2003; 6 (1): 29-34.
18. Hernández A, Pérez JM, Puchades Y, Casañas D, Delgado J. *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* en plantaciones comerciales de caña de azúcar. Agrotecnia de Cuba, 2023; 47 (2): 36-45.
19. Guillen D, Hernández R, Rodríguez L, Gómez R. Detección de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* en Caña de Azúcar (*Saccharum* spp.), saneamiento mediante técnicas biotecnológicas. BioTecnología. 2007; 11 (2): 8-17.
20. Iglesia A, Díaz M, Ramos R. Validación de técnicas para el diagnóstico del raquitismo en los retoños de la caña de azúcar en Cuba. Revista Asociación de Técnicos Azucareros de Cuba. 2011; (3): 18-23.
21. Romina P, Funes C, Joya CM, Lobo JA, Chaves S, Monachesi MA, *et al.* Panorama sanitario del cultivo de la caña de azúcar en Tucumán durante la campaña 2021/2022. Reporte Agroindustrial. 2022; 265: 10 p.
22. Abdalla MME. Detection of the Bacteria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Davis) Using Lateral Flow Immunoassay Test and Modified Culture Media for Improving the diagnosis of Sugarcane Ratoon Stunt Disease. [Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas]. Universidad de Gezira. Sudan. 2020. 52 pp.
23. Hoy JW, Grisham MP, Damann KE. Spread and increase of ratoon stunting disease of sugarcane and comparison of disease detection methods. Plant Disease. 1999; 83 (12): 1170-1175.
24. Ghai M, Singh V, Martin LA, McFarlane SA, Van Antwerpen Y, Rutherford RS. A rapid and visual loop-mediated isothermal amplification assay to detect *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* targeting a transposase gene. Letters in Applied Microbiology. 2014; 59: 648-657.
25. Houllou LM, Torres DCBA, Medeiros MJL, Dantas PVP, Soares AB, Souza RA, *et al.* Electrotherapy treatment for ratoon stunting disease (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*) elimination in sugarcane micropropagation. International Jour. Current Research. 2015; 7: 19888-19892.
26. Schori M, Appel M, Kitko A, Showalter AM. Engineered DNA polymerase improves PCR results for plastid DNA. Applications in Plant Sciences. 2015; 1: 1-7.
27. Suazo T, Miranda S, Rivers E, Lacayo M, Tenorio D. Evaluación de metodologías de extracción de ADN de plantas recalcitrantes. Revista Torreón Universitario. 2020; 9 (24): 45-57. <https://doi.org/10.5377/torreon.v9i24.9723>.
28. Angulo L, Molina EA, Figueroa R, Parada F. Optimización de un protocolo para aislamiento de ADN en tejido foliar de cacao (*Theobroma cacao* L.) para la amplificación con marcadores moleculares. Revista Científica ECOCIENCIA. 2023; 10 (4): 68-87.
29. Duarte V, Carrer R, Gomes M. Comparison of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* molecular detection in heat-treated sugarcane sets. Pesquisa Agropecuaria Tropical. 2019; 49: 1-7.
30. Wu Q, Pan YB, Zhou D, Grisham MP, Gao S, Su Y, *et al.* A comparative study of three detection techniques for *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, the causal pathogen of sugarcane Ratoon stunting disease.

- BioMed research international. 2018; 1-11. <https://doi.org/10.1155/2018/2786458>.
31. Serena S, Loconsole G, Ligorio A, Pantazis AK, Papadakis G, Gizeli E, *et al.* A colorimetric LAMP detection of *Xylella fastidiosa* in crude alkaline sap of olive trees in apulia as a field-based tool for disease containment. Agriculture. 2023; 13 (2): 448.
32. Sidstedt M, Rådström P, Hedman J. PCR inhibition in qPCR, nPCR and MPS-mechanisms and solutions. Analytical bioanalytical Chemistry. 2020; 412: 1-16.
33. Bao Y, Jiang Y, Xiong E, Tian T, Zhang Z, Lv J, *et al.* CUT-LAMP: contamination-free loop-mediated isothermal amplification based on the CRISPR/Cas9 cleavage. ACS Sensors. 2020; 5: 1082-1091. <https://doi.org/10.1021/acssensors.0c00034>.
34. Urashima AS, Silva MF, Coraini NF, Gazaffi R. Temporal incidence of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in sugarcane propagating materials of Brazilian cultivars. Crop Protection. 2020; 128: 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.104976>.
35. Strachan S, Shamsul A, Thompson N, Nguyen NT, Ford R, Muhammad JA. Latent potential of current plant diagnostics for detection of sugarcane diseases. Current Research in Biotechnology. 2022; 4: 475-492.
36. Chakraborty M, Soda M, Strachan S, Ngo CN, Bhuiyan SA, Ford R. Ratoon Stunting Disease of Sugarcane: A Review Emphasizing. Phytopathology. 2024; 114: 7-20. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-23-0181-RVW>.
37. Falloon T, Henry E, Davis MJ, Fernandez E, Girard JC, Rott P, *et al.* First report of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, causal agent of ratoon stunting of sugarcane, in Jamaica. Plant Disease. 2006; 90 (2): 245-245.
38. Urashima AS, Silva MF, Correa JJ, Moraes MC, Singh AV, Smith EC, *et al.* Prevalence and severity of ratoon stunt in commercial Brazilian sugarcane fields. Plant Disease. 2017; 101 (5): 815-821. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-07-16-1030-RE>.
39. Bertani RP, Funes C, Joya CM, Lobo JA, Chaves S, Monachesi MA, *et al.* Panorama sanitario del cultivo de la caña de azúcar en Tucumán durante la campaña 2021/2022. Reporte Agroindustrial. 2022; 265: 1-10.