

甘蔗宿根矮化病研究进展

徐景升, 许莉萍, 阙友雄, 高三基, 陈如凯*

(福建农林大学农业部甘蔗生理生态与遗传改良重点开放实验室, 福州 350002)

摘要:综述了近年来甘蔗宿根矮化病的检测、传播、防治及其致病菌 *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* 的分类归属和致病机理等方面的研究进展,并探讨了研究策略。

关键词: 甘蔗; RSD (Ratoon stunting disease); *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*

中图分类号: S435.661 文献标识码: A 文章编号: 1005-3395(2008)02-0184-05

Advances in the Ratoon Stunting Disease of Sugarcane

XU Jing-sheng, XU Li-ping, QUE You-xiong, GAO San-ji, CHEN Ru-kai*

(Key Lab of Eco-physiology & Genetics Improvement for Sugarcane, Ministry of Agriculture,
Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: The recent advances in detection, spread and prevention of sugarcane ratoon stunting disease (RSD), the taxonomy and the pathogenic mechanism of its causal organism, *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* were reviewed. Then the future research strategy for RSD was discussed.

Key words: Sugarcane; RSD (Ratoon stunting disease); *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*

甘蔗宿根矮化病(Ratoon stuning disease, RSD)是甘蔗重要病害之一,其病原为棒状杆菌属细菌,寄生于蔗株的维管束中。受害甘蔗发育阻滞,宿根发株少,生长不良,叶缘枯死,严重影响甘蔗产量和品质。有关此病的研究主要集中在病原菌的归属、致病机理、检测技术以及传播与防治等方面。本文对其研究进展进行了综述,并探讨了可能的研究策略。

1 甘蔗宿根矮化病致病菌的归属

1944 年,澳大利亚糖业试验站管理局(The Bureau of Sugar Experiment Station, BSES)病理学家首次在 Q.28 品种上发现了甘蔗宿根矮化病。其致病菌为 *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx),寄生于甘蔗(*Saccharum officinarum*)木质部导管内,革兰氏阳性,菌体大小为(0.25~0.5) μm × (1~4) μm,呈直或微弯的细长棒状,有的中部或一端膨大,内有间

体^[1]。

Lxx 很难培养,在该病菌发现后的 30 多年里,纯培养一直不成功,以致曾一度认为甘蔗 RSD 是由病毒引起的,直到 20 世纪 70 年代才发现该菌与感病植株相关^[2]。1980 年,该菌纯培养获得成功并被确认为致病菌^[1]。1984 年,Davis 等^[3]根据形态性状将其与狗牙根矮化病致病菌 *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* (Cxc)一起成立新属,即 *Clavibacter* 属,并将其命名为 *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* (Cxx)。2000 年,Evtushenko 等^[4]发现该菌在形态学、细胞壁糖分组成、必须培养基成分以及包括氧化酶反应等一系列生理特性上,与 *Clavibacter* 的其他菌种并不相同,因此将其从 *Clavibacter* 划分出来,列入 *Leifsonia* 属,并更名为 *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*。Young 等^[5]用 BOXPCR、ERICPCR、16S 和 23S RNA 基因间隔区(internal transcribed spacer, ITS)序列的单链构象多态性及 16S rDNA 序列分析等方法,分

析了来自9个国家的105个Lxx分离物,对该菌及其近缘属进行了细致的分子遗传进化分析,结果表明Lxx没有其他亚种,支持Evtushenko的分类提法。Brumbley等^[6]比较了澳大利亚Lxx分离物与巴西分离物的基因组长达11 kb的核酸序列,完全相同。本实验室分析了Lxx福州分离物的rDNA的ITS区,也没有发现差异。

2 Lxx致病机理

RSD的致病机理研究尚处于起步阶段,目前知之甚少。Lxx专性寄生于甘蔗木质部导管内,可以侵染甘蔗属所有已知的品种,但是不侵染其他植物^[7]。将其接种到其他17种植物(品种)中,虽然可以存活,但菌量远低于甘蔗,且基本没有矮化现象^[8]。Roach等^[9-10]调查了澳大利亚甘蔗属及相关育种材料,发现*S. officinarum*的带菌量远低于*S. spontaneum*。Magarey等^[11]对甘蔗起源中心新几内亚进行了调查,发现Lxx在自然状态下并不侵染*S. officinarum*。因此推测Lxx的天然寄主是*S. spontaneum*,那么RSD发生在首次人工杂交品种大面积应用后可能并非巧合。

根据其引起植株变矮、生长不良等症状推测,Lxx可能阻碍寄主养分供应或与寄主争夺营养物质。解剖学证据表明,Lxx专性寄生于甘蔗木质部导管内,产生胶状物质堵塞导管,从而阻断水分和无机营养的运输;另外,分支多且跨节间导管少的品种抗性较强,可能是因为限制了病菌对未发病部位的侵染。

1992年,Lxx单菌落分离成功^[12],为该病菌生物学特性和基因组学研究清除了障碍。2004年,Monteiro等^[13]以巴西Lxx的CTCB07株系为模板,进行了全基因组测序。其基因组大小为2.6 Mb,包含2 351个开放读码框,其中307个为假基因,GC含量为68%。该病菌基因组全序列的测定以及生物信息学的发展,为从基因组水平研究其致病机制奠定了基础。

Lxx基因组的假基因比例高达13%,在目前已知基因组全序列的植物病菌中最高^[13],意味着Lxx对甘蔗专性寄生及适应过程中发生了基因组衰退^[14]。这些假基因包含大量的ABC转运蛋白基因($n=30$)、光合酶、鞭毛、两个ABC甘氨酸和甜菜碱转运子以及类胡萝卜素生物合成相关基因,据此推测Lxx曾经以自在生命形式存在。在Lxx基因组

中有横向基因转移现象,出现基因岛,GC含量、密码子偏性和二碱基指纹发生改变。目前发现3个基因岛包含可能的致病基因,一个是果胶酶基因,另一个是纤维素酶基因,这些基因可能参与细胞壁降解,使菌体从甘蔗中得到足够的养分,但是目前还没有解剖学证据;第三个基因岛与*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*的Pat-1相似,可能与植物枯萎有关^[15]。另外还发现了ABA合成酶基因和活性氧类基因,ABA合成酶基因可能与植株矮化有关,活性氧类基因与防卫反应有关。2007年,Sutcliffe^[16]等发现了41个脂蛋白类似基因,其功能涉及到ABC转运系统可溶性结合蛋白、电子传递、信号调控、脂蛋白酶及其他未知功能,认为这些基因与Lxx的致病性密切相关。

2002年,Brumbley等^[17]建立了Lxx的遗传转化和插入突变技术体系,2004年使用转座子突变技术得到了712个Lxx突变体,然后接种健康甘蔗,利用蒸发结合酶免疫吸附法(evaporative-binding enzyme immunosorbent assay, EB-EIA)鉴定,找到了3个失去致病能力的突变菌株,并在转座子插入位点附近找到两个操纵子,其编码基因疑与致病性有关^[6]。

3 甘蔗RSD检测技术研究

甘蔗感染RSD后,其外观表现为植株矮化、蔗茎变细、分蘖减少、生长迟滞等症状,随宿根年限增加而加重。同时,由于发病程度不同,感病田块植株高矮不齐。但是这些症状易与水肥不足、管理粗放等造成的生长不良相混淆,所以从蔗株外观上判断是否发病比较困难。随着RSD研究的深入,其检测技术不断提高完善,经历了从内部症状观察—显微镜法—血清学检测—以DNA为基础的分子检测等阶段。

3.1 内部症状观察法

RSD病原菌确认以前,主要采用剖茎方法和接种法进行检测。剖茎法意即用锋利的刀片将感病甘蔗茎纵向剖开,观察近基部节部维管束上是否有橘红色的小圆点或逗点。这种方法准确性很差,对许多品种不适用,只是一种粗略的田间检测方法。另外,感病的幼嫩植株的生长点出呈淡粉色。但是这些症状有时不会表现出来,而有些品种即使没有感病,也会出现类似症状。另外一种方法为接种法,即用受试样品的汁液接种易感甘蔗品种,观察

是否出现病症。这种检测方法十分耗时,检测效率非常低。

3.2 显微镜法

Lxx 能够引起寄主诱导反应,在碱诱导下寄主后生木质部自发产生红色荧光(alkaline-induced metaxylem autofluorescence, AIMA)^[18-19],可使用暗视野显微镜(dark-field microscopy)观测,该法灵敏度和准确性都很差。RSD 病原菌确认后,使用相差显微镜(phase contrast microscope, PCM)可以直接检查蔗汁中的病原菌^[20-22]。PCM 法比 AIMA 法好一些,且能定量检测带菌量,但该方法操作繁琐,检测灵敏度低。

3.3 血清学检测

1980 年,该菌纯培养获得成功^[3],一方面使得利用免疫技术获得抗体成为可能,另一方面可以分离到无其他杂菌干扰的 DNA,促进了免疫学检测和以 DNA 为基础的检测方法的发展。免疫学检测方法主要有滤膜荧光抗体直接计数法(fluorescent antibody direct-count on filters, FADCF)^[8,23],斑点印迹酶免疫法(dot blot enzyme immunoassays, DB-EIA)^[21], EB-EIA^[21,24-25]和组织印迹酶免疫法(tissue blot enzyme immunoassays, TB-EIA)^[21]等。这些方法得到广泛的应用,但是不同方法在准确率、灵敏度上差异较大^[8,21,26]。

Hoy 等^[21]对 AIMA、镜检、DB-EIA、EB-EIA 和 TB-EIA 等 5 种检测方法的准确率、假阳性率和假阴性率进行了细致的比较研究,结果表明 AIMA 准确率最低(85%),假阳性率高达 24%,假阴性率较低(7%);镜检法准确率较高(93%),假阳性率和假阴性率较低,分别为 7% 和 6%;DB-EIA 和 EB-EIA 的假阴性率均很高,达到 21%,且 DB-EIA 的假阳性率达 11%,准确率分别为 87% 和 91%,显著低于 TB-EIA,但两种方法间准确率差异不显著;TB-EIA 检测准确率最高(96%),假阳性率很低(5%)、假阴性率最低(3%),是这 5 种检测方法中灵敏度与准确率最好的方法。受免疫学方法自身缺陷限制,这些免疫学方法的灵敏度不高。同镜检法一样,免疫学检测必须在 RSD 病菌滴度达到 $10^4 \sim 10^5$ CFU ml⁻¹ 才能够检测出来,在早期选取蔗茎留种时,检测结果不可靠。血清学检测用的是多克隆抗体,灵敏度受到影响。

3.4 以 DNA 为基础的检测方法

3.4.1 PCR 检测

原核生物的 16S 和 23S 核糖体 RNA 基因很保守,但是其间隔区却具有很高的多态性,在细菌分类和鉴定上具有重要作用。Lopes^[27]和 Fegan^[28]报道了利用 PCR 扩增 16S 和 23S 的 *ITS* 基因检测出 RSD 致病菌。但是他们使用的引物是以 16S 和 23S 的保守序列设计的,该对引物在扩增 Lxx 的同时,也可以扩增 *C. xyli* subsp. *cynodontis*。1998 年, Pan 等^[29]对甘蔗 RSD 病原细菌 Lxx 的 16S-23S 核糖体 DNA 的 *ITS* 进行测序并向 NCBI 数据库提交了序列(AF056003),开发出了 Lxx 的特异 PCR 引物,PCR 产物长度为 438 bp。同年, Fegan 等^[30]开发出 Cxx 和 Cxc 的特异引物,可以利用 MutiPCR 进行检测,PCR 产物长度分别为 278 bp 和 446 bp,能够有效地区分 Cxx 和 Cxc。邓展云^[22]、沈万宽^[31]等报道了我国甘蔗 RSD 致病菌的 PCR 检测。周凌云^[32]用巢式 PCR 检测致病菌,使检测的准确度进一步提高。2007 年, Grisham 等^[33]利用 Real Time PCR 检测甘蔗 RSD 致病菌,由于可以定量检测致病菌,能够对品种易感性进行分级。PCR 方法检测灵敏度比血清学方法大大提高,从 1 pg 的基因组 DNA 中即可以检测出致病菌。

3.4.2 Southern 杂交

Chung 等^[34]用 *EcoRI* 酶切 Lxx 基因组,经过筛选得到 10 个探针, Southern 杂交结果表明,可以区分 Cxx 和 Cxc,灵敏度达到 0.75 pg。Pan 等^[35]利用组织斑点 DNA 杂交技术(Tissue blot DNA hybridization)检测甘蔗 RSD 病原细菌 Lxx,也获得了较理想的效果。Taylor 等^[36]利用 RAPD 筛选到两个特异引物,其扩增片断长度分别为 800 bp 和 1 000 bp,将其标记后杂交,可以检测出来。杂交检测结果可信度更高,但操作繁琐,检测效率低。

4 RSD 传播与防治

RSD 在甘蔗种植国家和地区广泛传播,巴西、印度、美国、南非等甘蔗生产国和地区均有报道。我国广东于 1986 年首次确诊甘蔗 RSD^[37],随后在广东^[38]、福建^[39]、广西^[40]等甘蔗主产区开展大规模普查工作,发现 RSD 普遍发生。RSD 可造成甘蔗大量减产,平均产量损失为 15% ~ 20%,严重时可达 60% 以上^[41-42]。

RSD 主要通过收获机械和带病蔗种传播^[43-44]。1996 年, Comstock 等^[45]用 6 个抗性不同的甘蔗品种,用手工收割,证明了 RSD 按照收获的顺序传

播,带病蔗茎做为蔗种,引发下一轮收获传播。

RSD 控制方法的发现先于 RSD 致病菌的确认。目前广泛使用的方法是温汤处理^[46],即下种前用 50℃ 热水浸种 2 h。澳大利亚的甘蔗生产服务部门使用该方法为蔗农提供无菌种苗,将发病率控制在 5% 以下^[47]。该方法简单有效,但是有些品种的腋芽对温度敏感,温汤处理后引起出苗率下降,且人力物力消耗较大。

5 展望

RSD 的致病机制的阐明对于甘蔗生产至关重要。根据目前的研究情况和生物技术的发展情况,本文认为应该从以下几个方面开展 RSD 致病机制研究:(1)利用基因芯片技术从转录组水平研究基因的表达式。以 *S. spontaneum* 为试验材料,通过研究不同条件下寄主和 Lxx 互作后基因表达差异,有希望找到病原菌与寄主互作的关键基因。(2)应用标记置换技术^[48]创制突变菌株。转座子突变属于随机突变,效率低且耗时,而使用标记置换技术可以大大提高突变效率。(3)利用蛋白质组学技术^[49]研究突变对蛋白质产物的影响,对于失去侵染能力的突变,研究其蛋白质组表达变化将使寄主识别与侵染明朗化。(4)利用代谢组学技术研究其代谢变化。该病菌专性寄生于木质部导管内,通过比较感病植株和健康植株木质部导管中液体组成差异,能够找到关键的功能型 ABC 转运子。

参考文献

- [1] Davis M J, Gillaspie A G Jr, Harris R W, et al. Ratoon stunting disease of sugarcane: Isolation of the causal bacterium [J]. Science, 1980, 210: 1365–1367.
- [2] Young A J, Brumbley S M. Ratoon stunting disease: History, management and current research [M]// Rao G P, Sauntally A S, Rott P. Sugarcane Pathology. Volume III: Bacterial and Nematode Diseases. Enfield, NH: Science Publishers, Inc., 2004: 97–124.
- [3] Davis M J, Gillaspie A G Jr, Vidaver A K, et al. *Clavibacter*: A new genus containing some phytopathogenic coryneformbacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov. pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease [J]. Inter J Syst Bacteriol, 1984, 34: 107–117.
- [4] Evtushenko L, Dorofeeva L, Subbotin J, et al. *Leifsonia poae*, gen. nov., sp. nov., isolated from nematode galls on *Poa annua*, and reclassification of '*Corynebacterium aquaticum*' Leifson 1962 as *Leifsonia aquatica* (ex Leifson 1962) gen. nov., nom. rev., comb. nov. and *Clavibacter xyli* Davis et al. 1984 with two subspecies as *Leifsonia xyli* (Davis et al. 1984) gen. nov., comb. nov. [J]. Intern J

- Syst Evolut Microbiol, 2000, 50: 371–380.
- [5] Young A J, Petrasovits L A, Croft B J, et al. Genetic uniformity of international isolates of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, causal agent of ratoon stunting disease of sugarcane (*Saccharum* interspecific hybrids) [J]. Austr Plant Pathol, 2006, 35: 503–511.
- [6] Brumbley S M, Petrasovits L A, Murphy R M, et al. Establishment of a functional genomics platform for *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* [J]. Mol Plant-Microbe Interact, 2004, 17: 175–183.
- [7] Rao G P, Singh M, Singh H N. Alternative hosts of sugarcane diseases [J]. Sugar Cane, 1990(Suppl): 8–26.
- [8] Mills L, Leaman T M, Taghavi S M, et al. *Leifsonia*-like bacteria are endophytes of grasses in eastern Australia [J]. Austr Plant Pathol, 2001, 30: 145–151.
- [9] Roach B T. Assessment of varietal susceptibility to ratoon stunting disease of sugarcane [J]. Proc Austr Soc Sugar Cane Techn, 1988, 10: 171–177.
- [10] Roach B T, Jackson P A. Screening sugarcane clones for resistance to ratoon stunting disease [J]. Sugar Cane, 1992, 2: 2–12.
- [11] Magarey R C, Suma S, Irawan K L S, et al. Diseases and pests encountered during a survey of *Saccharum* germplasm 'in the wild' in Papua New Guinea [J]. Proc Aust Soc Sugar Cane Techn, 2002, 24: 219–227.
- [12] Teakle D S, Ryan C C. The effect of high temperature on the sugar cane ratoon stunting bacterium, *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, *in vitro* and *in vivo* [J]. Sugar Cane, 1992, 6: 5–6.
- [13] Monteiro-Vitorello C B, Camargo L E A, van Sluys M A, et al. The genome sequence of the gram-positive sugarcane pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* [J]. Mol Plant-Microbe Interact, 2004, 17: 827–836.
- [14] Cole S T, Eiglmeier K, Parkhill J, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus [J]. Nature, 2001, 409: 1007–1011.
- [15] Dreier J, Meletzus D, Eichenlaub R. Characterization of the plasmid encoded virulence region *Pat-1* of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* [J]. Mol Plant-Microbe Interact, 1997, 10: 195–206.
- [16] Sutcliffe I C, Hutchings M I. Putative lipoproteins identified by bioinformatic genome analysis of *Leifsonia xyli* ssp. *xyli*, the causative agent of sugarcane ratoon stunting disease [J]. Mol Plant Pathol, 2007, 8(1): 121–128.
- [17] Brumbley S M, Petrasovits L A, Birch R G, et al. Transformation and transposon mutagenesis of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, causal organism of ratoon stunting disease of sugarcane [J]. Mol Plant-Microbe Interact, 2002, 15(3): 262–268.
- [18] Damann K E Jr. Alkaline-induced metaxylem autofluorescence: A diagnostic symptom of ratoon stunting disease of sugarcane [J]. Phytopathology, 1988, 78: 233–236.
- [19] Damann K E, Hollier C A. Distribution and incidence of ratoon stunting disease in Louisiana sugarcane [J]. Plant Disease, 1991, 75(6): 568–571.
- [20] Roach B T. Sampling and diagnostic procedures for testing sugarcane resistance to ratoon stunting disease by phase contrast

- microscopy [J]. Proc Aust Soc Sugar Cane Techn, 1990, 12: 111–119.
- [21] Hoy J W, Grisham M P, Damann K E. Spread and increase of ratoon stunting disease of sugarcane and comparison of disease detection methods [J]. Plant Disease, 1999, 83(12): 1170–1175.
- [22] Deng Z Y(邓展云), Wang B H(王伯辉), Liu H B(刘海斌), et al. Occurrence and pathogen detection of sugarcane ratoon stunting disease in Guangxi Province [J]. Sugar Crops China(中国糖料), 2004(3): 35–38.(in Chinese)
- [23] Davis M J. Direct-count techniques for enumerating *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* which cause ratoon stunting disease of sugarcane [J]. Phytopathology, 1985, 75: 1226–1231.
- [24] Croft B J, Greet A D, Leaman T M, et al. RSD diagnosis and varietal resistance screening in sugarcane using the EB-EIA technique [J]. Aust Soc Sugar Cane Techn, 1994, 16: 143–151.
- [25] Croft B J. A method for rating sugarcane cultivars for resistance to ratoon stunting disease based on an enzyme-linked immunoassay [J]. Aust Plant Pathol, 2002, 31(1): 63–66.
- [26] Harrison N A, Davis M J. Comparison of serological techniques for diagnosis of ratoon stunting disease [J]. Sugar Cane, 1990(Suppl.): 5–9.
- [27] Lopes S A, Damann K E. PCR amplification of DNA from bacterial pathogens of sugarcane [J]. Phytopathology, 1993, 83: 1398–1401.
- [28] Fegan M, Smith G R, Roberts S E, et al. Detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* in ratoon stunting disease: A DNA-based approach [C]// Proceedings of the 4th International Society of Sugar Cane Technologists. Brisbane, Australia: Pathology Workshop, 1994: 51.
- [29] Pan Y B, Grisham M P, Burner D M, et al. A polymerase chain reaction protocol for the detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, the causal bacterium of ratoon stunting disease [J]. Plant Disease, 1998, 82: 285–290.
- [30] Fegan M, Croft B J, Teakle D S, et al. Sensitive and specific detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, causative agent of ratoon stunting disease of sugarcane, with a polymerase chain reaction-based assay [J]. Plant Pathol, 1998, 47: 495–504.
- [31] Shen W K(沈万宽), Zhou G H(周国辉), Deng H H(邓海华), et al. Detection of sugarcane ratoon stunting disease pathogen with polymerase chain reaction (PCR) and nucleotide sequence analysis [J]. Chin Agri Sci Bull(中国农学通报), 2006, 22(12): 413–416.(in Chinese)
- [32] Zhou L Y(周凌云), Zhou G H(周国辉). PCR techniques for detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* infecting sugarcane [J]. J Guangxi Agri Biol Sci(广西农业生物科学), 2006(2): 172–174.(in Chinese)
- [33] Grisham M P, Pan Y B, Richard E P. Early detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in sugarcane leaves by real-time polymerase chain reaction [J]. Plant Disease, 2007, 91(4): 430–434.
- [34] Chung C H, Lin C P, Chen C T. Development and application of cloned DNA probes for *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, the causal agent of sugarcane ratoon stunting [J]. J Phytopathol, 1994, 141: 293–301.
- [35] Pan Y B, Grisham M P, Burner D M, et al. Detecting *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* by tissue blot DNA hybridisation [J]. Sugar Cane, 1998, 3: 3–8.
- [36] Taylor P W J, Petrasovits L A, van der Velde R, et al. Development of PCR-based markers for detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in fibrovascular fluid of infected sugarcane plants [J]. Austr Plant Pathol, 2003, 32: 367–375.
- [37] 伍承芳, 黄孟群. 我国大陆发现甘蔗宿根矮化病 [J]. 甘蔗糖业, 1986(7): 29–30.
- [38] 黄孟群, 肖镇杰. 广东宿根矮化病研究报告 [J]. 甘蔗糖业, 1987(6): 39–40.
- [39] Zhen J X(郑加协), Gan Y H(甘勇辉). Occurrence and diagnosis of ratoon stunting disease of sugarcane in Fujian [J]. Sugarcane Canesugar(甘蔗糖业), 1998(5): 20–24.(in Chinese)
- [40] 邓展云, 王伯辉, 刘海斌, 等. 广西甘蔗宿根矮化病研究初报 [J]. 广西蔗糖, 2003(3): 8–11.(in Chinese)
- [41] Bailey R A, Bechet G R. Further evidence of the effects of ratoon stunting disease on production under irrigated and rainfed conditions [J]. Proc South Afr Sugar Techn Assoc, 1997, 71: 97–101.
- [42] Roach B T. Observations on the incidence, effects and control of ratoon stunting disease [J]. Proc Interl Soc Sugar Cane Techn, 1987, 9: 109–116.
- [43] Grisham M P. Effect of ratoon stunting disease on yield of sugarcane grown in multiple three-year plantings [J]. Phytopathology, 1991, 81: 337–340.
- [44] Taylor P W J, Ryan C C, Birch R G. Harvester transmission of leaf scald and ratoon stunting disease [J]. Sugar Cane, 1988, 4: 11–14.
- [45] Comstock J C, Shine J M, Davis M J, et al. Relationship between resistance to *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* colonization in sugarcane and spread of ratoon stunting disease in the field [J]. Plant Disease, 1996, 80(6): 704–708.
- [46] Damann K E. Effect of sugarcane cultivar susceptibility on spread of ratoon stunting disease by the mechanical harvester [J]. Plant Disease, 1992, 76: 1148–1149.
- [47] Damann K E, Benda G I A. Evaluation of commercial heat treatment methods for control of ratoon stunting disease of sugarcane [J]. Plant Disease, 1983, 67: 966–967.
- [48] He S Y, Collmer A. Molecular cloning, nucleotide sequence, and marker exchange mutagenesis of the exo-poly-alpha-D-galacturonosidase-encoding *pehX* gene of *Erwinia chrysanthemi* EC16 [J]. J Bacteriol, 1990, 172: 4988–4995.
- [49] Padliya N D, Cooper B. Mass spectrometry-based proteomics for the detection of plant pathogens [J]. Proteomics, 2006, 6: 4069–4075.