

内生细菌对香茅草产柠檬醛的影响

Effects of endophytic bacteria on citral production in *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf

柳倩^{1,2} 阎晋东^{1,2} 徐婷^{1,2} 李燕^{1,2} 朱咏华^{1,2}

LIU Qian^{1,2} YAN Jin-dong^{1,2} XU Ting^{1,2} LI Yan^{1,2} ZHU Yong-hua^{1,2}

(1. 湖南大学生物学院, 湖南长沙 410082; 2. 植物基因组学与发育调控湖南省重点实验室, 湖南长沙 410082)

(1. College of Biology, Hunan University, Changsha, Hunan 410082, China; 2. Hunan Province Key Laboratory of Plant Functional Genomics and Developmental Regulation, Changsha, Hunan 410082, China)

摘要:内生菌对于植物的健康和新陈代谢具有非常重要的作用,目前内生菌对芳香植物香茅草挥发性有机化合物(VOCs)代谢的影响尚不清楚。试验分离了不同生长季节的香茅草内生细菌,得到1株具有清新自然香味的优势内生菌CcLf-2,鉴定为芽孢杆菌属。通过顶空气相色谱质谱联用仪对香茅草VOCs进行检测,发现不同季节其主要挥发性物质柠檬醛含量的变化与CcLf-2的分离率分布规律一致。进一步将CcLf-2接种到香茅草无菌苗中,发现CcLf-2可以成功定殖到香茅草中,并明显增强其所产柠檬醛的比例。实时定量PCR(qRT-PCR)分析表明,CcLf-2的存在可诱导香茅草中柠檬醛生物合成途径相关基因的表达量显著上升($P < 0.05$)。说明内生菌可以作为诱导子来提高宿主植物中一些重要的VOCs的产量。

关键词:内生细菌;香茅草;代谢调节;柠檬醛含量;基因表达

Abstract: The existence of endophytes significantly contributes to plant health and metabolism, however, the effects of endophytes on the volatile organic compounds (VOCs) metabolism of aromatic plant *Cymbopogon citratus* are still unclear. In this study, the endophytic bacteria from *C. citratus* grown at different seasons were isolated, and a dominant endophytic bacterium *Bacillus* sp. CcLf-2 was identified, with a fragrance-producing property. After seasonal analysis of the VOCs of *C. citratus* by headspace gas chromatography-mass spectrometry, found that the abundance pattern of CcLf-2 had a similar trend with the emission profile of citral, the primary and valuable composition of VOCs, in *C. citratus*. By inoculating CcLf-2 into *C. citratus* aseptic seedlings obtained by tissue culture, endophyte reisolation test verified the colonization of CcLf-2 in plants and

the presence of CcLf-2, which can increased the citral proportion, obviously. Moreover, quantitative real-time PCR analysis of relevant genes in the citral biosynthesis pathway revealed that they were significantly up-regulated (at least $P < 0.05$) with the existence of CcLf-2. The endophytic bacteria may enhance the citral production by modulating the expression of genes related to biosynthesis. And implies the possibility of using endophytic bacteria as a regulator to improving yields of some important VOCs in its host.

Keywords: Endophytic bacteria; *Cymbopogon citratus*; metabolism regulation; citral production; gene expression

内生菌是一类与植物紧密联系的特殊微生物,在其生命周期的某一阶段或者整个阶段定殖于植物组织或器官内,但不引起植物出现明显病害症状^[1]。植物内生菌几乎存在于所有植物中^[2],对植物的生长发育^[3-4],适应性^[5]以及多样性具有非常重要的作用^[6]。由于特殊的生存环境,内生菌在长期的协同进化过程中,具有调节其宿主植物次级代谢产物合成的能力^[7-8]。挥发性有机化合物(VOCs)是植物次级代谢产物中的重要成分,具有极重要的生物功能,如抗非生物胁迫或生物胁迫;在实际生产中的应用范围也很广,从香料的生产到新药的来源^[9],因而受到越来越多关注。有报道^[10]显示,芳香植物的内生菌对宿主萜类挥发性有机物的产量和质量具有重要的影响,如内生真菌PGP-HSF会影响薄荷中萜类化合物的化学合成。相对来说,关于内生细菌对宿主次级代谢,特别是VOCs影响的报道还非常少。

香茅草,又被称为柠檬草,是一种重要的香料植物,主要生长在热带地区^[11]。其VOCs的主要成分是柠檬醛。天然状态下,柠檬醛主要以橙花醛和香叶醛两种几何异构体的形式存在^[12]。柠檬醛具有拮抗细菌^[13]、真菌^[14]以及抗虫性能^[15],并被广泛用于生产香料,合成紫罗兰酮、 V_A 和 V_E 等^[16]。然而,芳香植物所产生的柠檬醛还远不能满足高速

基金项目:国家自然科学基金(编号:31672093)

作者简介:柳倩,女,湖南大学在读硕士研究生。

通信作者:朱咏华(1968—),女,湖南大学教授,博士。

E-mail: yonghuaz@outlook.com

收稿日期:2017-04-03

发展的香料行业的需求,所以,探究影响香茅草产柠檬醛的因素极其重要。目前,已有研究显示生长季节^[17]和植物年龄^[18]能影响香茅草精油成分,而内生菌对香茅草 VOCs 的影响未见诸于报道。

本研究拟对不同生长季节的香茅草内生细菌进行分离,并鉴定了具有产香能力的优势内生细菌。通过对不同季节内生细菌的分布规律以及香茅草挥发性成分进行分析比较,揭示内生细菌与宿主次级代谢产物合成之间的关系。进一步通过植物组织培养技术获得香茅草无菌苗,并用优势内生菌对无菌苗进行处理,通过顶空气相色谱质谱联用仪(HS-GC-MS)对用菌处理与未处理的香茅草无菌苗的 VOCs 进行检测分析。同时,通过实时定量 PCR(qRT-PCR)对香茅草中柠檬醛合成途径中相关基因的 mRNA 水平的表达情况进行检测,以发掘内生菌影响香茅草生产柠檬醛的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

香茅草 [*Cymbopogon citrates* (DC.) Stapf]:由福建农林大学提供,种植于湖南省长沙市岳麓区湖南大学(28.10°47.9994"N, 112.57°0'E);

细菌 DNA 提取试剂盒:上海捷瑞生物工程有限公司;

植物总 RNA 快速抽提试剂盒:生工生物工程有限公司;

Prime Script RT 试剂盒:宝生物工程有限公司;

气相色谱-质谱联用仪: Thermo-Finnigan Trace GC + Polaris Q 型, 美国赛默飞世尔科技公司;

qRT-PCR 仪: Mx3000P QPCR System 型, 美国安捷伦科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 香茅草内生细菌的分离 清洗干净的香茅草样品,室温晾干后,参照文献^[5]进行表面消毒和内生细菌的分离。待内生细菌析出后统计其分离率[分离率为4种分离培养基:大豆酪蛋白培养基(TSA)、甘露醇大豆培养基(MS)、酵母提取物培养基(TWYE)^[19]和水琼脂培养基(WA)^[20]分离到内生菌的平均值],并将其挑出到 NA 培养基上^[21]进行划线培养得到纯培养物。

1.2.2 细菌菌种鉴定 用细菌 DNA 提取试剂盒提取细菌基因组 DNA。以此为模板,以通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGT-TACCTTGTACGACTT-3') 对其 16S rRNA 进行扩增,测序后的序列在 NCBI 酸数据库 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 中进行比对分析,用 GENEDOC 软件和 MEGA 5.1 软件构建系统发育树。

1.2.3 HS-GC-MS 分析 将新鲜的香茅草用 SiO₂ 研磨,所得汁液转移到 20 mL 色谱瓶。检测条件参照文献^[22],所得总离子流图与 NIST08 标准质谱数据库进行对比,对香茅草挥发性成分进行分析鉴定^[23]。

内生细菌在 NA 培养基上培养 24 h 后,刮取菌体混合于装有 20 mL 无菌水的 20 mL 色谱瓶中,用于 HS-GC-MS 分析,检测条件同香茅草检测条件。

1.2.4 香茅草组织培养 新鲜的香茅草样品剥去 1~2 层叶鞘,选取幼嫩根状茎作为外植体进行表面消毒:70%乙醇浸泡 2 min,无菌水冲洗,2% NaClO 浸泡 10~15 min,无菌水冲洗 3~10 次,于超净工作台晾干。将香茅草样品切成 1 cm 左右转移到 NB 培养基^[24][2.0 g/L 2,4-二氯苯氧基乙酸(2,4-D)]诱导愈伤组织。2 周后,将愈伤组织转移到 MS 培养基^[25][3.0 g/L 激动素(KT),0.05 mg/L α-萘乙酸(NAA)]进行分化。培养温度为 28 °C,14 h 光照/10 h 黑暗,光强为 80 μmol/(m²·s)。

1.2.5 优势内生菌处理香茅草无菌苗 将内生细菌的发酵液稀释至 1×10⁵ CFU/mL,待组培瓶中生根培养基[1/2 MS^[25],0.05 mg/L NAA]冷却至 35 °C 左右时,加入发酵液 2 mL,在培养基中加入 2 mL 无菌水作为对照。待培养基冷却至室温后,将 90 d 苗龄的香茅草幼苗转移到培养基上进行培养。

1.2.6 植物总 RNA 提取和 qRT-PCR 使用植物总 RNA 快速抽提试剂盒对香茅草总 RNA 进行提取,使用 Prime Script RT 试剂盒合成 cDNA。qRT-PCR 引物参照文献^[26]。qRT-PCR 反应体系及扩增程序参照文献^[27]。每个反应重复 3 次,使用 2^{-ΔΔCt} 方法计算基因表达相对值^[28]。无菌水处理的香茅草基因表达水平设为 1。

2 结果与讨论

2.1 香茅草产香内生细菌的分离

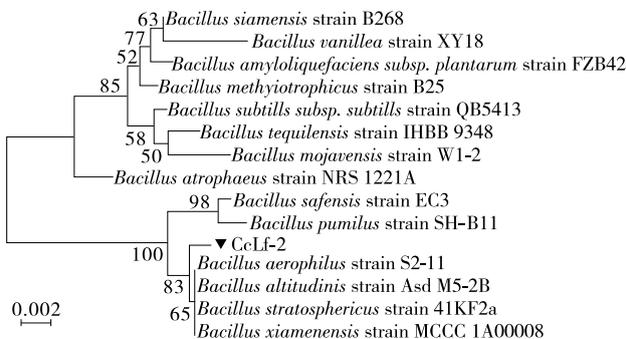
通过对 2015 年 7 月~2016 年 6 月的香茅草内生细菌进行分离,从 14 376 个香茅草组织样品中分离出 3 594 株内生细菌。在所分离的内生细菌中,发现一株细菌不管是在不同的生长季节还是在不同的香茅草组织中,析出频率都比较高,将其命名为 CcLf-2。通过形态学观察结合 16S rRNA 序列分析,鉴定该菌为芽孢杆菌属(*Bacillus*) (图 1)。据报道^[29],一些内生真菌可以产生与其宿主植物相似的次级代谢物,如紫杉醇。然而,关于内生细菌的类似研究却很少见^[7]。通过感官评定,发现分离自香茅草的一些内生细菌可以产生清新自然的香味,尤其是 CcLf-2,香味很明显。芽孢杆菌属的菌种具有抗菌、除臭等多种生理功能^[30],但是其具有产香能力却是首次发现。通过 HS-GC-MS 检测 CcLf-2 的挥发性物质,表明 CcLf-2 的挥发性成分中含有桃醛、紫罗兰酮等重要的香料物质(表 1)。

表 1 *Bacillus* sp. CcLf-2 的挥发性成分分析

Table 1 The volatile organic compounds of

Bacillus sp. CcLf-2

物质	分子式
四氢香叶醇	C ₁₀ H ₂₂ O
十四烷	C ₁₄ H ₃₀
香叶基丙酮	C ₁₃ H ₂₂ O
异桉醛	C ₂₂ H ₃₄ O ₆
领苯二甲酸	C ₁₆ H ₂₂ O ₄
α-紫罗兰酮	C ₁₃ H ₂₀ O
棕榈酸甲酯	C ₁₇ H ₃₄ O ₂
桃醛	C ₁₁ H ₂₀ O ₂
柠檬醛	C ₆ H ₈ O ₇



分支点上的数字表示构建系统发育树时 1 000 次计算时形成该节点的百分比

图 1 CcLf-2 的 16S rRNA 基因系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of CcLf-2 16S rRNA gene sequences

值得注意的是,不同季节 CcLf-2 的分离率(图 2)与香茅草内生细菌的总分离率(图 3)的变化趋势相反,即具有产香能力的优势菌 CcLf-2 析出频率高的时候,并不对应着内生细菌在宿主植物香茅草中分布最丰富的季节。而香茅草挥发性物质的组成及比例随季节发生变化,因此怀疑这一变化是否与产香内生细菌的特殊分布存在关联。为了验证这一猜测,通过 HS-GC-MS 对不同季节香茅草 VOCs 进行检测。

2.2 不同季节香茅草 VOCs 分析

利用 HS-GC-MS,鉴定出香茅草中 9 个挥发性成分(表 2)。主要包含柠檬醛(以橙花醛和香叶醛两种几何异构体的形式存在)和 α -蒎烯,这两种物质均广泛应用于香料生产中。有研究报道香茅草精油中含有 30 多种挥发性物

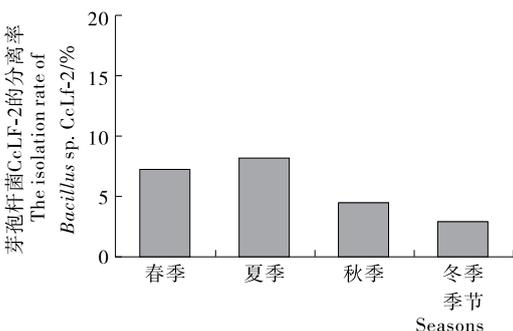


图 2 不同季节优势内生细菌 *Bacillus* sp. CcLf-2 的分离率
Figure 2 The isolation rate of dominant endophytic bacteria *Bacillus* sp. CcLf-2 in different seasons

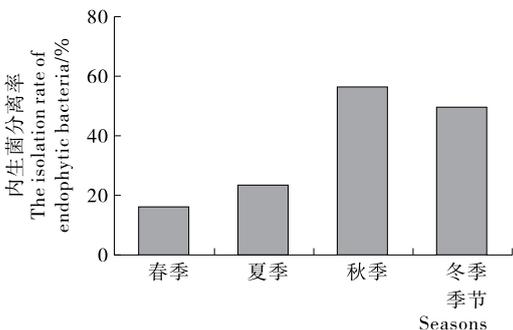


图 3 香茅草内生细菌的总分离率

Figure 3 General endophytic bacteria from *C. citratus* in different seasons

表 2 不同季节香茅草挥发性成分分析

Table 2 Volatile organic compounds obtained from *C. citratus* in different seasons

物质	分子式	相对峰面积/%			
		春季	夏季	秋季	冬季
α -蒎烯	$C_{10}H_{16}$	62.71	68.49	89.33	93.57
β -罗勒烯	$C_{10}H_{16}$	1.36	0.37	1.37	0.66
马鞭草烯醇	$C_{10}H_{16}O$	0.80	0.49	0.19	0.27
2, 2-二甲基-3, 4-辛二烯	$C_{10}H_{16}O$	—	0.85	0.09	0.15
橙花醛	$C_{10}H_{16}O$	13.98	15.16	4.70	3.89
香叶醛	$C_{10}H_{16}O$	19.82	11.16	3.61	0.51
α -萜澄茄油烯	$C_{15}H_{24}$	0.62	0.82	0.32	0.37
β -榄香烯	$C_{15}H_{24}$	0.38	1.92	0.15	0.16
石竹烯	$C_{15}H_{24}$	0.33	0.73	0.24	0.42

质^[31],本研究只分离鉴定到 9 种,其原因可能有以下两点:

- ① 不同于传统提炼精油的方法,本研究直接用石英砂来研磨新鲜的香茅草样品,可能会导致一些含量很少的成分损失;
- ② 本研究通过顶空自动进样器来收集样品,在此过程中,一些高沸点的化合物难以自然扩散到进样器中。但本方法快速便捷,能满足获得主要 VOCs 的需要。由表 2 可知,不同季节香茅草 VOCs 的比例发生了明显的变化,其中橙花醛和香叶醛的比例在春季和夏季明显高于秋冬季节,与之前提到的优势内生细菌 CcLf-2 在不同季节的分布规律的变化趋势一致(图 2)。因此,寄生于香茅草内的产香内生细菌可能会对其 VOCs,尤其是主要成分柠檬醛的含量有一定的影响。

2.3 内生菌 CcLf-2 对香茅草 VOCs 的影响

为了进一步验证内生细菌对香茅草 VOCs 的影响,首先通过植物组织培养技术获得了香茅草无菌苗(图 4),以排除其他微生物的干扰。将内生细菌 CcLf-2 接种到香茅草无菌苗培养基中,CcLf-2 可以通过香茅草的根部渗入香茅草。通过重分离试验,从香茅草组培苗的叶片和鞘中分离出了 CcLf-2(图 5),证明其的确可以成功定殖在香茅草中。通过 HS-GC-MS 检测接种了 CcLf-2(E+)和未接种 CcLf-2(E-)的香茅草无菌苗以及野生香茅草幼苗(W)的 VOCs,发现接种 CcLf-2 后,香茅草 VOCs 中橙花醛和香叶醛的比例明显增加(表 3),说明内生细菌 CcLf-2 可以诱导香茅草主要挥发性物质柠檬醛的产生。值得注意的是,生长同期,大小一致的野生香茅草幼苗,其柠檬醛的含量明显高于 CcLf-2 处理后的香茅草组培苗,表明内生菌诱导香茅草 VOCs 中柠檬醛比例的增加可能不只依赖单个菌种,而是依赖整个微生物菌群。

2.4 CcLf-2 对香茅草中萜类化合物生物合成基因表达的调控

为了进一步探讨内生细菌诱导宿主香茅草中柠檬醛合成的分子机制,通过 qRT-PCR 分析香茅草中柠檬醛代谢途径相关基因的转录表达水平。异戊烯二磷酸酯(IPP)和二甲基烯丙基二磷酸酯(DMAPP)是萜类化合物生物合成的两种前体物质^[32]。植物体主要通过甲羟戊酸(MVA)途径和 2-C-甲基-D-赤藻糖醇-4-磷酸(MEP)途径来合成 IPP 和

DMAPP^[33-34]。本研究对 MVA 途径中的 3 个基因[甲基戊二酰辅酶A还原酶(HMGR)、甲羟戊酸激酶(MK)、甲羟戊



A. 香茅草外植体在 NB 培养基上培养 2 周后形成的愈伤组织 B. 香茅草愈伤组织在 MS 分化培养基上培养 7 d 形成的芽 C. MS 培养基上培养 2 个月的香茅草无菌苗

图 4 香茅草组织培养

Figure 4 The tissue culture of *C. citratus*

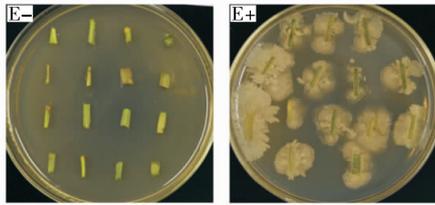
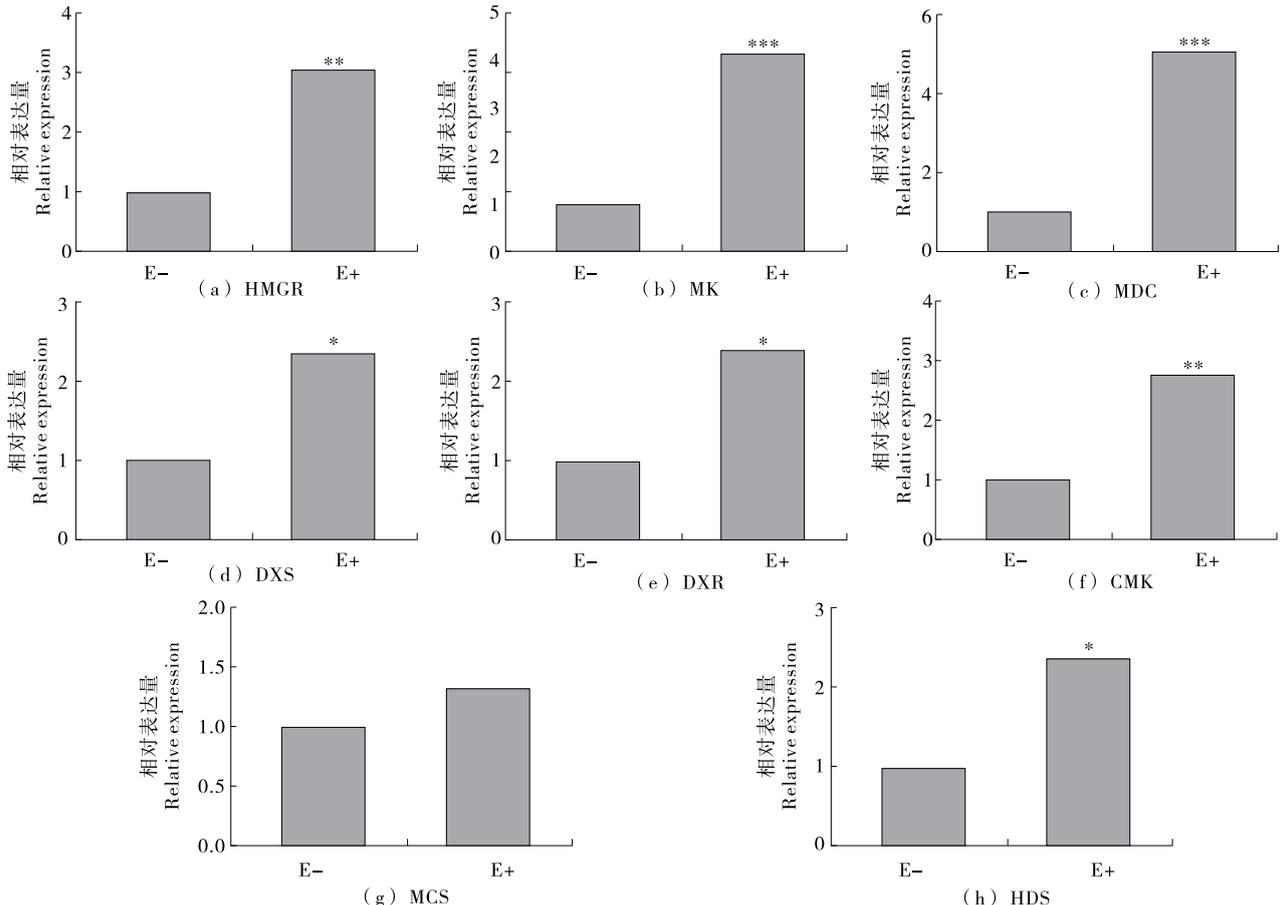


图 5 从未接种 CcLf-2(E-)和接种 CcLf-2(E+)的香茅草组培苗中重分离 CcLf-2

Figure 5 The bacteria CcLf-2 reisolation result from CcLf-2-free (E-) and CcLf-2-inoculated (E+) *C. citratus* aseptic seedlings



E-: 香茅草无菌苗; E+: CcLf-2 处理 10 d 的香茅草组培苗; 星号表示与香茅草无菌苗的显著差异,

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图 6 香茅草中与 MVA 和 MEP 合成途径相关的基因表达水平分析

Figure 6 The expression levels of genes responsible for MVA pathway and MEP pathway ($n=3$)

酸二磷酸脱羧酶(MDC)]和 MEP 途径中的 5 个基因[1-脱氧-D-木酮糖 5-磷酸合成酶(DXS)、1-脱氧-D-木酮糖 5-磷酸还原异构酶(DXR)、5-二磷酸-2-C-甲基-D-赤藓糖醇激酶(CMK)、2,4-环磷酸合酶(MCS)、(E)-4-羟基-3-甲基-2-烯基-二磷酸合酶(HDS)]进行了检测。这些基因都是萜类物质合成途径中的关键基因^[26]。由图 6 可知,与未处理的香

表 3 内生细菌 CcLf-2 处理(E+)和未处理的香茅草组培苗(E-)以及香茅草野生幼苗(W)的挥发性成分分析

Table 3 Volatile organic compounds obtained from endophyte CcLf-2-inoculated (E+), CcLf-2-free (E-) *C. citratus* aseptic seedlings and wild *C. citratus* seedlings (W)

物质	分子式	相对峰面积/ %		
		E-	E+	W
α -蒎烯	$C_{10}H_{16}$	89.97	85.16	80.75
β -罗勒烯	$C_{10}H_{16}$	—	—	2.10
马鞭草烯醇	$C_{10}H_{16}O$	1.37	2.63	0.06
橙花醛	$C_{10}H_{16}O$	0.83	1.96	3.98
香叶醛	$C_{10}H_{16}O$	3.40	6.10	11.04
α -萜澄茄油烯	$C_{15}H_{24}$	2.23	2.18	1.49
β -榄香烯	$C_{15}H_{24}$	0.85	0.74	0.46
石竹烯	$C_{15}H_{24}$	1.34	1.23	0.18

茅草无菌苗相比,用 CcLf-2 处理过的香茅草组培苗中除 MCS 以外,所有检测基因的表达量均显著性上调($P < 0.01$),特别是 MVA 途径中的基因。植物挥发性萜类化合物的合成涉及到一系列复杂的生化反应过程,是多种基因相互作用的结果。由于香茅草基因组信息有限,虽然只检测了部分基因的 mRNA 水平,但已有结果仍表明内生细菌 CcLf-2 在香茅草中的定殖可以通过调控与萜类物质合成相关的基因的表达水平来提高柠檬醛的合成。

3 结论

本研究探究了内生细菌对香茅草 VOCs 的影响。结果表明,分离出的香茅草优势内生细菌 CcLf-2 可以成功定殖在香茅草无菌苗中,通过调控其与萜类化合物合成途径相关基因的表达水平可提高柠檬醛的合成;初步揭示了内生菌诱导香茅草柠檬醛合成的分子机制,证明内生菌作为提高一些高商业价值天然产物产量的诱导子,具有很大的开发潜力。然而,内生菌诱导宿主香茅草产柠檬醛的详细分子机制还需要进一步研究;如何通过控制内生菌的接种方法和接种量,使香茅草柠檬醛的产量达到最大,从而应用于实践生产当中仍需要进一步摸索。

参考文献

- [1] HARDOIM P R, VAN Overbeek L S, BERG G, et al. The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes[J]. *Microbiol Mol Biol R*, 2015, 79(3): 293-320.
- [2] WANG Yu, DAI Chuan-chao. Endophytes: a potential resource for biosynthesis, biotransformation, and biodegradation[J]. *Annals of Microbiology*, 2011, 61(2): 207-215.
- [3] CHEBOTAR V K, MALFANOVA N V, SHCHERBAKOV A V, et al. Endophytic bacteria in microbial preparations that improve plant development (review) [J]. *Appl Biochem Micro*, 2015, 51(3): 271-277.
- [4] SHCHERBAKOV A V, BRAGINA A V, KUZMINA E Y, et al. Endophytic bacteria of Sphagnum mosses as promising objects of agricultural microbiology [J]. *Microbiology*, 2013, 82(3): 306-315.
- [5] XU Ting, LI Yan, ZENG Xia-dong, et al. Isolation and evaluation of endophytic *Streptomyces endus* OsiSh-2 with potential application for biocontrol of rice blast disease [J]. *J. Science Food Agric.*, 2017, 97(4): 1 149-1 157.
- [6] BULGARELLI D, GARRIDO-OTER R, MUNCH P C, et al. Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley [J]. *Cell Host & Microbe*, 2015, 17(3): 392-403.
- [7] LUDWIG-MULLER J. Plants and endophytes: equal partners in secondary metabolite production? [J]. *Biotechnol Lett*, 2015, 37(7): 1 325-1 334.
- [8] MULLER C A, OBERMEIER M M, BERG G. Bioprospecting plant-associated microbiomes [J]. *J Biotechnol*, 2016, 235(10): 171-180.
- [9] MAFFEI M E, GERTSCH J, APPENDINO G. Plant volatiles: production, function and pharmacology [J]. *Nat Prod Rep*, 2011, 28: 1 359-1 380.
- [10] MUCCIARELLI M, CAMUSSO W, MAFFEI M. Volatile terpenoids of endophyte-free and infected peppermint (*Mentha piperita* L.): chemical partitioning of a symbiosis [J]. *Microbiol Ecol*, 2007, 54: 685-696.
- [11] TAVARES F, COSTA G, FRANCISCO V, et al. *Cymbopogon citratus* industrial waste as a potential source of bioactive compounds [J]. *J Sci. Food Agric*, 2015, 95(13): 2 652-2 659.
- [12] NEGRELLE R R B, GOMES E C. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf: chemical composition and biological activities [J]. *Rev Bras Pl Med*, 2007, 9(1): 80-92.
- [13] KIM J K, MARSHALL M R, CORNELL J A, et al. Antibacterial activity of carvacrol, citral and geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and on fish cubes [J]. *J Food Sci*. 1995, 60(6): 1 364-1 374.
- [14] TAO Neng-guo, OU YANG Qiu-li, JIA Lei. Citral inhibits mycelial growth of *Penicillium italicum* by a membrane damage mechanism [J]. *Food Control*, 2014, 41: 116-121.
- [15] RICE P J, COATS J R. Insecticidal Properties of Several Monoterpenoids to the House Fly (Diptera: Muscidae), Red Flour Beetle (Coleoptera: Tenebrionidae), and Southern Corn Rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) [J]. *J Econ Entomol*, 1994, 87(5): 1 172-1 179.
- [16] LERMEN C, MORELLI F, GAZIM Z C, et al. Essential oil content and chemical composition of *Cymbopogon citratus* inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi under different levels of lead [J]. *Ind Crop Prod*, 2015, 76(15): 734-738.
- [17] VIRLENE D A J, ALINE J E M, WILLIAN F D C, et al. Effect of seasons on chemical composition and fungitoxicity of *Cymbopogon citratus* (DC). *Staf essential oil* [J]. *Afr J Agr Res*, 2016, 11(12): 1 048-1 055.
- [18] ROCHA R P, MELO E D C, BARBOSA L C A, et al. Influence of plant age on the content and composition of essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf [J]. *J Med Plants Res*, 2014, 8(37): 1 121-1 126.
- [19] LE Xu-yen, FRANCO C M M, BALLARD R A. Isolation and characterisation of endophytic actinobacteria and their effect on the early growth and nodulation of lucerne (*Medicago sativa* L.) [J]. *Plant Soil*, 2015, 405(1): 13-24.
- [20] GARBEVA P, HORDIJK C, GERARDS S. Volatiles produced by the mycophagous soil bacterium *Collimonas* [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2014, 87(3): 639-649.
- [21] PANG Fa-hu, WANG Tan, ZHAO Chen-chen, et al. Novel bacterial endophytes isolated from winter wheat plants as biocontrol agent against stripe rust of wheat [J]. *Bio Control*, 2016, 61(2): 207-219.
- [22] BARBOSA L C A, PEREIRA U A, MARTINAZZO A P, et al. Evaluation of the chemical composition of brazilian commercial *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf samples [J]. *Molecules*, 2008, 13(8): 1 864-1 874.

- [23] YANG Chun-xiang, WANG Yi-ju, LIANG Zhen-chang, et al. Volatiles of grape berries evaluated at the germplasm level by headspace-SPME with GC-MS[J]. Food Chem, 2009, 114(3): 1106-1114.
- [24] YE Xu-dong, AL-BABILI S, KLÖTI A, et al. Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm[J]. Science, 2000, 287(5451): 303-305.
- [25] LIN Yong-jun, ZHANG Qi-fa. Optimising the tissue culture conditions for high efficiency transformation of indica rice[J]. Plant Cell Rep, 2005, 23(8): 540-547.
- [26] DEVI K, MISHRA S K, SAHU J, et al. Genome wide transcriptome profiling reveals differential gene expression in secondary metabolite pathway of *Cymbopogon winterianus*[J]. Sci Rep, 2016, DOI:10.1038/srep21026.
- [27] MA Jiang-shan, ZHANG Ke-ke, HUANG Mei, et al. Involvement of Fenton chemistry in rice straw degradation by the lignocellulolytic bacterium *Pantoea ananatis* Sd-1[J]. Biotechnology for Biofuels, 2016, 9: 211.
- [28] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta-Delta C(T)} Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [29] STROBEL G A. Endophytes as sources of bioactive products[J]. Microbes Infect, 2003, 5(6): 535-544.
- [30] LOGAN N A, DE Vos P. *Bacillus*[M]// Bergey's Manual of Systematics Bacteriology. New York: Springer, 2015: 3-124.
- [31] AJAYI E O, SADIMENKO A P, AFOLAYAN A J. GC-MS evaluation of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf oil obtained using modified hydrodistillation and microwave extraction methods[J]. Food Chem, 2016, 209(15): 262-266.
- [32] LANGE B M, RUJAN T, MARTIN W, et al. Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes[J]. PNAS, 2000, 97(24): 13172-13177.
- [33] LICHTENTHALER H K. The 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants[J]. Annu Rev Plant Phys, 1999, 50: 47-65.
- [34] KASAHARA H, HANADA A, KUZUYAMA T, et al. Contribution of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways to the biosynthesis of gibberellins in *Arabidopsis*[J]. J Biol Chem, 2002, 277(47): 45188-45194.

(上接第7页)

- [12] 陈继峰, 杨美容, 李绍华. 葡萄酒酿造过程中调酸方法研究[J]. 酿酒, 2005, 32(1): 35-39.
- [13] 季建生. 干型杨梅果酒降酸的研究[J]. 酿酒科技, 2008(7): 73-75.
- [14] 赵燕, 任美燕, 李帅. 猕猴桃果酒降酸研究[J]. 粮食科技与经济, 2012, 37(1): 55-57.
- [15] MILLER B J, FRANZ C M, CHO G S, et al. Expression of the malolactic enzyme gene (mle) from *Lactobacillus plantarum* under winemaking conditions[J]. Current Microbiology, 2011, 62(6): 1682-1688.
- [16] GAO Chong-xiao, FLEET G H. The degradation of malic acid by high density cell suspensions of *Leuconostoc oenos*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 76(6): 632-637.
- [17] 王立芳. 一株可降解 L-苹果酸和柠檬酸菌株的鉴定及降解特性研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2011: 37-38.
- [18] MAIO S D, POLIZZOTTO G, PLANETA D, et al. A method to discriminate between the *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* in mixed fermentation on WLD and lysine agar media[J]. South African Journal for Enology & Viticulture, 2011, 32(1): 35-41.
- [19] 薛军侠. 酿酒酵母的筛选鉴定及耐受性初步研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2007.
- [20] 韩阳. 高产酒精酵母的筛选鉴定及生长和发酵特性研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2007.
- [21] 张霞, 武志芳, 张胜潮, 等. 贵州浓香型白酒大曲中霉菌的 18S rDNA 系统发育分析[J]. 应用与环境生物学报, 2011, 17(3): 334-337.
- [22] 薛景波. 黄酒接种生麦曲微生物群落结构及分离培养微生物的产酶、产香性质分析[D]. 无锡: 江南大学, 2016: 12-13.
- [23] 巴尼特. 酵母菌的特征与鉴定手册[M]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1991.

信息窗

澳大利亚发布强制性过敏原标识问答

据澳大利亚农业与水利资源部消息,2017年5月18日澳大利亚农业与水利资源部发布 IFN 08-17 通报,要求进口商做好过敏原标识工作。

按照澳新食品标准法典的要求,预包装食品要在标签上注明过敏原信息,这包括花生、树生坚果、牛奶、蛋、芝麻籽、鱼贝类、大豆、小麦、羽扇豆。

另外,对于无包装食品或不要求包装的食品(例如散装容器),过敏原信息需要附于货物,以便商家订购食品时了解过敏原信息。

澳大利亚农业与水利资源部要求进口商确保进口的

食品符合规定。进口商需与供应商取得联系,要求他们提供食品中的过敏原信息,必要时给予一定的指导,确保不发生食物过敏事件。

澳大利亚农业与水利资源部表示,过敏原信息未标注,会对过敏人群构成健康风险。按照 1992 进口食品控制法案的要求,如果进口商知晓或者没理由不了解进口食品中的过敏原信息,而进口了有风险的食品,那么属于违法行为,最高可判处 10 年徒刑。

(来源:www.foodmate.net)