



王东光,张宁南,杨曾奖,等. 20 种真菌对白木香挥发油成分的影响[J]. 华南农业大学学报,2016,37(5):77-83.

20 种真菌对白木香挥发油成分的影响

王东光, 张宁南, 杨曾奖, 刘小金, 洪 舟, 徐大平
(中国林业科学研究院 热带林业研究所, 广东 广州 510520)

摘要:【目的】检测 20 种真菌对白木香 *Aquilaria sinensis* 树体挥发油成分的影响。【方法】通过输液法的通体结香技术,将不同菌液注入广东省惠东县境内白木香树体内,运用 GC-MS 技术分析变色木质部乙醇浸出物的化学成分。【结果】经龙眼焦腐病菌 *Lasiodiplodia theobromae*、斑点青霉 *Penicillium meleagrinum*、黑绿木霉 *Trichoderma atroviride*、拟康木霉 *T. koningiopsis*、青霉病病原菌 *Pen. italicum*、腐皮镰孢 *Fusarium solani*、葡萄座腔菌 *Botryosphaeria rhodina* 这 7 种真菌菌液处理的白木香目标树乙醇浸出物的质量分数超过 10% ,且倍半萜、芳香族类和 2-(2-苯乙基)色酮类相对含量之和分别为:21.57%、21.85%、24.02%、22.83%、23.49%、25.15% 和 24.84% ,而其他 13 种真菌处理树体乙醇浸出物质量分数均低于 10% ,主要检出物质为脂肪酸和烷烃类物质,倍半萜和芳香族类物质的相对含量之和仅为 2.67% ~7.88% ,不含 2-(2-苯乙基)色酮类物质。【结论】20 种待测菌种中,只有 7 种真菌能有效促进白木香树体沉香物质的形成,而其他 13 种真菌效用不明显。

关键词:白木香; 气象色谱-质谱联用仪; 真菌; 挥发油; 沉香
中图分类号:S718 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2016)05-0077-07

Effects of 20 fungal species on compositions of essential oils from *Aquilaria sinensis* trees

WANG Dongguang, ZHANG Ningnan, YANG Zengjiang, LIU Xiaojin, HONG Zhou, XU Daping
(Research Institute of Tropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Guangzhou 510520, China)

Abstract:【Objective】To determine the effect of 20 different fungi on compositions of essential oils from agarwood of *Aquilaria sinensis*. 【Method】The whole-tree agarwood-inducing technique was used, and culture fluids of 20 fungal species were injected into *A. sinensis* trees separately. The chemical compositions of extracts from the 20 treatments were investigated using GC-MS method. 【Result】The ethanol extract contents were above 10% from *A. sinensis* trees infected by seven fungal species including *Lasiodiplodia theobromae*, *Penicillium meleagrinum*, *Trichoderma atroviride*, *T. koningiopsis*, *Pen. italicum*, *Fusarium solani* and *Botryosphaeria rhodina*. The total relative contents of sesquiterpenes, aromatics compounds and 2-(2-phenylethyl) chromone derivatives were 21.57% , 21.85% , 24.02% , 22.83% , 23.49% , 25.15% and 24.84% respectively. For the rest 13 treatments, the ethanol extract contents were below 10% , the main detected ingredients were fatty acids and alkanes, the total relative contents of sesquiterpenes and aromatics compounds were only 2.67% to 7.88% , and no 2-(2-phenylethyl) chromone derivative was detected. 【Conclusion】Among the 20 fungal species, seven species can efficiently induce agarwood formation in *A. sinensis*, and the effects of the rest 13 species are not obvious.

Key words:*Aquilaria sinensis*; GC-MS; fungus; essential oil; agarwood

收稿日期:2015-12-23 优先出版时间:2016-07-05
优先出版网址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20160705.1159.018.html>
作者简介:王东光(1985—),男,博士研究生,E-mail:wangdgking@163.com; 通信作者:徐大平(1964—),男,研究员,博士,
E-mail:gzfsrd@163.com
基金项目:国家林业局林业公益性行业科研专项(201304402-4); 广东省林业科技创新项目(2014KJCX004-01)

沉香为瑞香科 Thymelaeaceae 沉香属 *Aquilaria* 或拟沉香属 *Gyrinops* 包括 19 个树种在内的树体受伤(包括雷击、动物啃食、昆虫蛀干或其他微生物侵染)后所得的特殊的木材物质^[1]。沉香主要的活性化学成分为倍半萜、2-(2-苯乙基)色酮以及芳香族化合物,无论是国际上还是国内,在评判沉香质量时,常以 3 类化合物中的 1 种或几种化学物质为特征成分来分级^[2]。沉香药材对治疗肠胃病、心绞痛等疾病有特效,是中国、印度、日本、尼泊尔及东南亚各国的传统名贵药材^[3]。从结香木质部提取的芳香油,具有特殊香味,是高级香味产品的主要原材料。此外,沉香也是世界五大教公认的祭祀圣物^[4]。天然的沉香树,受到刺激而产生排异反应,形成沉香,是一个偶发的现象,而且需要经历一个漫长的过程。近年来,人们对沉香资源需求的增长和已有天然沉香的毁灭性采掘导致天然沉香资源已几近枯竭。为了保障沉香资源的合理和可持续利用,2004 年开始,《濒危野生动植物种国际贸易公约》已将这 19 种结香树种列为Ⅱ级保护植物。

据统计,我国沉香树种植面积已达 3 000 万株^[5],健康沉香树无法结香,且传统的人工造伤技术,远远不能满足社会的需求,人工促进结香技术的改进已势在必行。研究表明,沉香树受到损伤后,在伤口处会有真菌侵入树体,激发树体的防御体系,从而在真菌和树体内酶的作用下产生一些具有抑菌活性的次生代谢产物,这些次生代谢产物即为沉香^[6]。人工接菌促进结香的历史可以追溯到 1929 年,所使用的菌种为结香树体分离的内生真菌^[7]。研究表明,感染黄绿墨耳菌 *Melanotus flavolives* 的白木香木质部细胞,2 个月后可以产生一种倍半萜类物质,即白木香醛^[8]。何梦玲等^[9]也运用此种真菌处理白木香继代培养小苗的离体侧根,表明离体根在真菌侵染胁迫下能重新合成色酮化合物。

多种真菌均可以促进沉香树体结香,但其促进效果在不同的生长环境下表现不尽相同^[10-11]。本研究中,利用已分离的 20 个真菌菌种,将其接种于广东惠州惠东境内的白木香 *Aquilaria sinensis* 树体中,通过比较不同菌种菌液促使树体产生沉香物质的化学成分差异,来评价各菌种的有效性,从而筛选出最适于本地白木香树体结香的菌种。

1 材料与方法

1.1 试验材料与试验地概况

试验材料为广东种源的 7 年生白木香,试验地 <http://xuebao.scau.edu.cn>

位于广东省惠州市惠东县白盆珠镇莲花山,为花岗岩地质;南亚热带季风气候,年均气温 22.0℃,年均日照 2 038.9 h,≥10℃年积温 7 947.9℃;年均降雨量 1 935.7 mm;年均相对湿度 80%,年蒸发量 1 875 mm,常年基本无霜;土壤为山地红壤。不同真菌分离自己结香的白木香树体、树桩和根系,从分离的 54 株不同种菌株中,选择 20 种具有代表性或有研究表明其对结香有效的菌种,且涵盖几乎所有已报道的菌种(表 1)。目标树胸径约为 9~10 cm,树高和冠幅无显著差异(表 1),有利于不同真菌对白木香树体结香促进作用大小的检测。

1.2 试验方法

于 2014 年 7 月,用选取的 20 个真菌菌种进行结香试验。先把选出的菌种转接到装有 500 mL 已灭菌的马铃薯葡萄糖水(广东环凯生物科技有限公司)溶液的锥形瓶中,28℃条件下恒温培养 5 d 后,将其用单层医用纱布过滤到大树输液袋中备用。对照为无菌葡萄糖水,每个处理设 3 株重复,每个重复注入树体的真菌代谢液为 500 mL。选取胸径约为 9~10 cm 的白木香树,在目标树距地面 50 cm 处部位钻孔,孔径为 0.5 cm,两孔相距 10 cm,且呈 90°交叉,孔深 6 cm。选择晴朗无风的天气,将菌液以最快的速度注入树干。2015 年 5 月进行采样测定。

1.3 挥发油测定

3 个重复的样品木材原盘磨成粉,合并混匀,过 20 目筛,于 60℃条件下恒温干燥至恒质量。取样品约 3 g 置于 150 mL 锥形瓶中,加入体积分数为 95% 的乙醇 100 mL,连接冷凝回流管,加热至沸腾,1 h 后冷却蒸干,计算乙醇浸出物含量。

1.4 GC-MS 分析

沉香挥发油成分分析采用气质联用仪(美国,安捷伦 6890 N-59751)。GS-MS 条件:色谱柱 DB-5MS (30 m×0.25 mm×0.25 μm);起始温度 60℃,保持 2 min 后,以 8℃·min⁻¹的速度升至 280℃,并保持 12 min;进样口温度 250℃;进样量 1 μL(不分流);色谱-质谱接口温度 280℃;离子源温度 230℃;四极杆温度 150℃;电离方式 EI;电子能量 70 eV;载气 He(体积分数为 99.999%);载气流速 1 mL·min⁻¹;质量扫描范围 35~450 AMU;溶剂延迟 4 min。通过 HPMSD 化学工作站,采用峰面积归一化法计算各化学成分相对含量,再通过 NIST 和 Willy 标准质谱库,经人工谱图解析和计算机数据系统检索,同时与相关文献进行核对^[2,12-14],确认所测定的化合物成分。

表1 真菌种类及目标树基本特征¹⁾

Tab.1 Fungal species and basic characteristics of the sampling trees

处理	真菌种类	目标树		
		胸径/cm	树高/m	冠幅/m
F1	蒙塔腔菌科 <i>Montagnulaceae</i> sp.	9.82 ± 0.28a	5.60 ± 0.12a	2.70 ± 0.21a
F2	龙眼腐烂菌 <i>Lasiodiplodia pseudotheobrome</i>	9.67 ± 0.19a	5.52 ± 0.19a	2.07 ± 0.34a
F3	龙眼焦腐病菌 <i>L. theobromae</i>	9.25 ± 0.43a	5.43 ± 0.19a	2.67 ± 0.26a
F4	附球抱菌属 <i>Epicoccum sorghi</i>	9.34 ± 0.15a	5.23 ± 0.26a	2.30 ± 0.06a
F5	生赤壳属 <i>Bionectria</i> sp.	9.29 ± 0.13a	5.52 ± 0.14a	2.40 ± 0.15a
F6	肉座菌 <i>Hypocrea</i> sp.	9.47 ± 0.44a	5.77 ± 0.09a	2.10 ± 0.12a
F7	拟盘多抱毛属 <i>Pestalotiopsis</i> sp.	9.88 ± 0.38a	5.75 ± 0.08a	2.23 ± 0.22a
F8	斑点青霉 <i>Penicillium meleagrinum</i>	9.33 ± 0.33a	5.68 ± 0.04a	2.40 ± 0.17a
F9	橘青霉 <i>Pen. citrinum</i>	9.47 ± 0.38a	5.23 ± 0.30a	2.07 ± 0.09a
F10	丛赤壳属 <i>Nectria</i> sp.	9.63 ± 0.42a	5.65 ± 0.13a	2.97 ± 0.44a
F11	光黑壳属 <i>Preussia minima</i>	9.38 ± 0.17a	5.73 ± 0.07a	2.10 ± 0.10a
F12	白木香内生真菌 <i>Phaeoacremonium rubrigenum</i>	9.52 ± 0.42a	5.13 ± 0.19a	2.13 ± 0.49a
F13	稻黑孢菌 <i>Nigrospora oryzae</i>	9.70 ± 0.64a	5.17 ± 0.32a	2.47 ± 0.37a
F14	黑绿木霉 <i>Trichodermaatroviride</i>	9.33 ± 0.18a	5.45 ± 0.14a	2.30 ± 0.06a
F15	拟康木霉 <i>T. koningiopsis</i>	9.97 ± 0.36a	5.50 ± 0.26a	2.50 ± 0.26a
F16	轮枝菌属 <i>Verticillium</i> sp.	9.30 ± 0.31a	5.55 ± 0.08a	2.37 ± 0.12a
F17	青霉病原菌 <i>Pen. italicum</i>	9.62 ± 0.65a	5.77 ± 0.22a	2.40 ± 0.25a
F18	小孢拟盘多抱毛 <i>Pes. microspora</i>	9.52 ± 0.17a	5.77 ± 0.13a	2.20 ± 0.15a
F19	腐皮镰孢 <i>Fusarium solani</i>	9.93 ± 0.68a	5.33 ± 0.70a	2.43 ± 0.09a
F20	葡萄座腔菌 <i>Botryosphaeria rhodina</i>	9.25 ± 0.40a	5.70 ± 0.35a	2.13 ± 0.15a
CK	无菌葡萄糖水(对照)	9.43 ± 0.17a	5.37 ± 0.23a	2.07 ± 0.09a

1) 目标树基本特征数据来源于3株样本树,表中数据为平均值±标准误,同列数据后凡有一个相同小写字母者,表示差异不显著(Duncan's 法, $P>0.05$)。

1.5 数据处理

运用SPSS18.0进行数据的统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同真菌对白木香树体乙醇浸出物含量的影响

不同种类真菌菌液对白木香树体结香质量的影响不同,乙醇浸出物质量分数大于10%的为经龙眼焦腐病菌*Lasiodiplodia theobromae*、斑点青霉*Penicillium meleagrinum*、黑绿木霉*Trichoderma atroviride*、拟康木霉*T. koningiopsis*、青霉病原菌*Pen. italicum*、腐皮镰孢*Fusarium solani*、葡萄座腔菌*Botryosphaeria rhodina*菌液处理的目标树,这7种树体所得乙醇浸出物的质量分数分别为13.16%、11.38%、12.21%、11.04%、11.70%、14.03%和12.88%,符合《中国药典》(2010版)沉香入药的标准,分别为对照目标树(5.00%)的2.63、2.27、2.44、2.21、2.34、2.81和2.58倍。其他13种处理(F1、F2、F4、F5、F6、F7、F9、F10、F11、F12、F13、F16、F18)的乙醇浸出物质量分

数均低于10%,但高于5%,分别为8.88%、6.25%、9.04%、6.70%、7.85%、6.51%、5.76%、9.62%、9.41%、9.65%、7.89%、8.47%和7.40%。

2.2 不同真菌对白木香树体挥发油化学成分的影响

7种有效促进白木香物质形成的真菌处理,其所侵染木质部挥发油成分如表2所示,乙醇浸出物质量分数大于10%的7种有效真菌处理,其检出物中共含有倍半萜化合物21种,芳香族化合物12种,色酮化合物1种,脂肪酸和烷烃类及其他化合物36种。这7种有效真菌处理,都含有的化学成分包括:苯甲醛、苄基丙酮以及十八碳烷酸、邻苯二甲酸二异丁酯、棕榈酸、正二十烷、8-甲氧基-2-(2-苯乙基)色酮、正二十四烷、二十六烷、二十七烷。其中小分子苯甲醛和苄基丙酮可能是其他倍半萜、芳香族和色酮物质的前体物质,有效真菌F3、F8、F14、F15、F17、F19和F20侵染树体所得2-(2-苯乙基)色酮类物质相对含量分别为0.82%、1.22%、1.89%、2.35%、5.75%、2.46%和3.15%。

表 2 GC-MS 检测的 7 种有效真菌感染后白木香树体挥发油的化学成分及相对含量¹⁾

Tab. 2 Chemical compositions and relative contents of the essential oils from *Aquilaria sinensis* trees infected with seven effective fungi examined with GC-MS

峰号	$t_{\text{保留}}/\text{min}$	化合物名称	分子式	有效菌种处理已鉴定物质的相对含量/%						
				F3	F8	F14	F15	F17	F19	F20
1	6.208	苯甲醛	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}$	0.27	0.51	0.50	0.25	0.27	0.61	0.45
2	11.009	5-羟甲基糠醛	$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3$	...	...	...	...	0.94	...	...
3	11.320	苜基丙酮	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}$	0.50	0.87	1.12	0.43	0.38	0.78	0.89
4	12.341	2-甲基萘	$\text{C}_{11}\text{H}_{10}$	...	...	1.10	0.28	...	...	...
5	15.022	二羟基顺丁烯二酸	$\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$	...	1.03	...	...	...	...	...
6	15.147	1,5-戊二醇	$\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}_2$	...	...	...	...	...	...	...
7	15.606	茴香基丙酮	$\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_2$	...	...	...	0.38	...	...	...
8	17.098	正十三烷	$\text{C}_{13}\text{H}_{28}$	...	...	...	0.46	...	...	...
9	17.098	十六烷	$\text{C}_{16}\text{H}_{34}$	...	0.17	0.12	...	...	...	...
10	17.098	檀香醇	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$	0.50	...	0.34	...	0.73	...	...
11	17.899	丁香醛	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_4$	...	...	0.23	...	1.69	...	...
12	18.017	α -衣兰油烯	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	...	0.52	0.20	...	...	...	...
13	18.038	(-)-蓝桉醇	$\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{O}$	...	...	0.31	0.37	...	...	...
14	18.049	桉叶醇	$\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$	0.88	...	...	...	1.44	...	...
15	18.087	β -愈创木烯	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	0.72	0.44	0.19	...	0.72	1.21	1.71
16	18.204	δ -杜松烯	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	...	...	...	0.21	...	...	...
17	18.385	4-羟基-3-甲氧基肉桂醇	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_3$	...	0.28	...	1.47	2.23	1.18	1.23
18	18.511	正十七烷	$\text{C}_{17}\text{H}_{36}$	0.83	...	0.22	...	...	3.46	1.33
19	18.688	沉香螺醇	$\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$	0.81	0.77	0.38	...	0.96	1.45	1.65
20	18.833	对叔丁基苯甲醚	$\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}$	0.75	...	0.20	...	...	...	...
21	19.300	十四酸	$\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}_2$	...	...	...	...	...	...	...
22	19.359	百里香酚	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}$	1.61	0.55	...	...	0.90	...	...
23	19.746	α -沉香呋喃	$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}$	...	1.61	...	...	0.77	0.96	1.58
24	20.036	十八碳烷酸	$\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$	0.92	1.80	1.08	1.02	0.89	1.13	1.65
25	20.363	β -桉叶醇	$\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$	...	...	0.25	...	0.51	...	...
26	20.481	香橙烯氧化物-(1)	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$	...	0.69	...	...	...	1.23	1.02
27	20.680	邻苯二甲酸二异丁酯	$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_4$	0.61	2.38	3.55	3.21	1.73	1.70	4.24
28	20.680	棕榈酸	$\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$	2.17	2.44	2.66	2.84	2.07	2.49	3.88
29	21.110	正二十烷	$\text{C}_{20}\text{H}_{42}$	0.52	2.04	1.76	2.57	3.75	0.58	1.27
30	21.174	香橙烯氧化物-(2)	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$	...	...	...	2.61	...	...	...
31	21.185	环氧柏木烷	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$	...	...	2.54	...	...	...	...
32	21.469	异香树烯环氧化	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$	1.88	0.14	0.64	1.17	...	1.35	2.20
33	21.636	3-甲基环十五酮	$\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{O}$	...	...	...	...	...	...	...
34	21.647	白木香醛	$\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_2$	1.33	0.78	...	1.55	2.54	1.56	1.49
35	22.028	β -桉叶烯	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	2.67	1.16	0.18	...	...	...	...
36	22.082	邻苯二甲酸单(2-乙基己基)酯	$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_4$	...	4.78	1.88	2.11	2.43	2.78	1.33
38	22.275	姜酮	$\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_3$	...	...	...	0.81	...	...	...
39	22.280	占吨醇	$\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{O}_2$	...	...	...	...	2.29	...	...
40	22.313	十六烷酸乙酯	$\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$	...	...	...	...	...	...	...
41	22.319	反式-9-十八碳烯酸	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$	...	...	...	...	...	...	...
42	22.474	月桂烯	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	...	...	0.51	...	0.95	...	...
43	22.823	8-甲氧基-2-(2-苯乙基)色酮	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_3$	0.82	1.22	1.89	2.35	5.75	2.46	3.15
44	22.823	α -石竹烯	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	...	...	0.70	1.68	...	1.38	...
45	22.903	别香橙烯环氧化物	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$	...	...	0.58	...	...	...	...

续表2 Tab.2 continued

峰号	t _{保留} /min	化合物名称	分子式	有效菌种处理已鉴定物质的相对含量/%						
				F3	F8	F14	F15	F17	F19	F20
46	22.973	氧化石竹烯	C ₁₅ H ₂₄ O	…	…	…	…	…	…	…
47	22.989	(+) - 香橙烯	C ₁₅ H ₂₄	2.33	1.44	3.56	…	…	1.78	…
48	23.333	β - 朱桉	C ₁₅ H ₂₂	1.13	1.98	0.98	1.98	0.84	1.22	2.01
49	23.591	二十一烷	C ₂₁ H ₄₄	…	3.13	3.83	0.48	2.54	…	2.39
50	23.988	顺式 - 十八碳烯酸	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	…	2.41	…	2.19	2.32	2.44	4.38
51	24.343	油酸乙酯	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	…	…	…	…	…	…	…
52	24.633	硬脂酸乙酯	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	…	0.21	0.09	…	…	…	…
53	24.718	二十二烷	C ₂₂ H ₄₆	2.19	2.13	2.28	…	0.67	…	…
54	24.731	2,4 - 双 - (1 - 苯基乙基) 苯酚	C ₂₂ H ₂₂ O	…	0.90	0.16	0.27	…	…	…
55	24.799	1 - 十八烷烯	C ₁₈ H ₃₆	…	0.38	…	…	…	…	…
56	25.798	正二十三烷	C ₂₃ H ₄₈	4.53	3.02	3.18	…	1.77	4.79	3.77
57	26.329	2 - 萘酚苄基醚	C ₁₇ H ₁₄ O	7.14	2.20	…	2.13	1.65	4.67	3.12
58	26.845	正二十四烷	C ₂₄ H ₅₀	6.36	1.03	5.33	1.58	2.41	6.34	3.25
59	26.931	4',5 - 二羟基 - 7 - 甲氧基黄酮	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	…	…	0.85	…	…	…	…
60	27.838	二十五烷	C ₂₅ H ₅₂	5.90	0.84	…	…	…	5.01	…
61	28.139	豆固醇	C ₂₉ H ₄₈ O	…	…	…	…	…	…	…
62	28.370	谷固醇	C ₂₉ H ₅₀ O	…	…	…	…	…	…	…
63	28.800	二十六烷	C ₂₆ H ₅₄	4.17	3.52	3.57	1.27	1.59	3.36	2.63
64	29.476	2 - 甲基十八烷	C ₁₉ H ₄₀	…	0.90	0.63	…	…	…	…
65	29.729	二十七烷	C ₂₇ H ₅₆	2.28	3.35	3.71	1.11	1.06	2.23	3.63
66	30.131	对苯二甲酸二辛酯	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	…	0.37	2.36	…	…	…	…
67	30.352	二十八烷	C ₂₈ H ₅₈	…	0.57	0.41	…	…	…	2.33
68	30.899	角鲨烯	C ₃₀ H ₅₀	…	0.62	0.40	…	…	…	…
69	31.941	二十九烷	C ₂₉ H ₆₀	0.70	…	1.39	…	…	…	0.95
70	33.369	正三十烷	C ₃₀ H ₆₂	…	0.76	0.55	…	0.27	…	…

1) …表示未检测到。

由表3可知,乙醇浸出物质量分数≥10%的7种不同真菌处理白木香树体挥发性成分中,F3、F8、F14、F15、F17、F19和F20菌种处理分别分离得54、69、84、94、61、49和45个峰,已鉴定物质峰个数分别占总气化物峰个数的50.00%、55.00%、52.00%、31.00%、50.82%和53.06%,说明白木香挥发油气化产物成分复杂。除F8处理树体的芳香族类化合物相对含量大于倍半萜外,其他处理树体化学成分相对含量从高到低依次为:脂肪酸+烷烃类、倍半萜类、芳香族类和2-(2-苯乙基)色酮类。F3、F8、F14、F15、F17、F19和F20菌种处理所得倍半萜类化合物是对照的16.32、12.71、15.19、15.01、12.77、16.19和15.55倍;芳香族类为对照处理的4.46、5.81、5.62、4.83、4.27、5.52和5.25倍,说明上述7种真菌处理能有效促进白木香活性成分的积累。

由表3可知,F1、F2、F4、F9、F10、F11、F12、F13、F16和F18处理树体倍半萜类化合物仅为对照的

1.76、2.17、8.50、1.44、2.08、3.77、3.07、4.76、0.57和0.65倍;芳香族类化合物则为对照的0.79~2.07倍;F1、F2、F4、F5、F6、F7、F9、F10、F11、F12、F13、F16和F18处理树体所得挥发油成分中,均未检测到2-(2-苯乙基)色酮类物质。对照挥发油成分中鉴定物质占总气化物相对含量的63.06%,含极少量倍半萜、芳香族类物质,不含色酮类物质,脂肪酸和烷烃类相对含量最高,倍半萜和芳香族类物质的相对含量之和仅为脂肪酸和烷烃类物质相对含量的0.04倍;而结香效果较佳的7种真菌处理树体倍半萜类、芳香族类和2-(2-苯乙基)色酮类成分相对含量之和依次为:21.57%、21.85%、24.02%、22.83%、23.49%、25.15%和24.84%,仅略低于其脂肪酸和烷烃类物质相对含量;结香欠佳的13种真菌处理树体挥发油成分中,已鉴定物质峰个数占气化物峰个数的25.00%~45.61%,倍半萜和芳香族类物质的相对含量之和为2.67%~7.88%,仅为脂

肪酸和烷烃类物质相对含量的 0.05 ~0.18 倍,与对 照相近。

表 3 20 种真菌侵染后白木香树体挥发油的化学成分类别及相对含量

Tab. 3 Relative contents of different types of chemicals in the essential oils from *Aquilaria sinensis* trees infected with 20 fungal species

处理 ¹⁾	化合物相对含量 ²⁾ /%				合计/%	鉴定数/出峰数
	倍半萜	芳香族	色酮	脂肪酸 + 烷烃类		
F1	1.32	2.00	...	33.88	37.20	14/55
F2	1.63	3.49	...	30.55	35.67	26/57
F3 [†]	12.24	8.51	0.82	30.06	51.64	27/54
F4	6.38	1.50	...	48.84	56.72	17/49
F5	...	2.70	...	18.01	21.12	19/52
F6	...	2.67	...	55.10	58.70	18/53
F7	...	3.51	...	45.43	48.94	19/46
F8 [†]	9.53	11.10	1.22	25.75	47.11	38/69
F9	1.08	3.63	...	52.14	56.85	18/56
F10	1.56	2.23	...	47.26	51.05	22/61
F11	2.83	2.29	...	41.31	46.43	21/64
F12	2.3	3.20	...	39.74	45.24	31/83
F13	3.57	3.96	...	41.22	48.75	20/62
F14 [†]	11.39	10.74	1.89	28.42	51.94	44/84
F15 [†]	11.26	9.22	2.35	10.95	33.78	29/94
F16	0.43	3.20	...	62.41	66.04	31/84
F17 [†]	9.58	8.16	5.75	15.32	38.80	31/61
F18	0.49	3.34	...	28.81	32.64	20/63
F19	12.14	10.55	2.46	31.24	56.39	26/49
F20 [†]	11.66	10.03	3.15	30.20	55.04	27/45
CK	0.75	1.91	...	60.40	63.06	16/24

1) †表示乙醇浸出物质量分数超过 10% 的处理; 2) ...表示未检测到。

3 讨论与结论

本试验采用的是输液法的通体结香技术,此技术系统原理在于:将沉香诱导剂滴注入沉香树干,使诱导剂混入树干液流,在蒸腾作用下扩散到整个树体,使树体受到胁迫产生沉香物质^[15]。要求所选目标树干形和冠幅须保持一致,才能保证所注入树干的菌液散布均匀,从而保证沉香数量和质量的一致。本试验中,所选目标树经方差分析得胸径、树高和冠幅均差异不显著,有利于检验各菌种的有效性。

根据《中国药典》(2010 版)沉香入药标准,乙醇热浸法所得浸出物质量分数不低于 10%。经龙眼焦腐病菌、斑点青霉、黑绿木霉、拟康氏木霉、青霉病原菌、腐皮镰孢、葡萄座腔菌菌液处理的目标树,其浸出物质量分数在 11% ~15%,符合入药标准。其他真菌处理和对照处理的乙醇浸出物质量分数均低于 10%。

经 GC-MS 分析,结香效果欠佳的 13 种真菌以及对照处理树体挥发油主要组成物为脂肪酸和烷烃类物质,不含色酮类物质,有效活性成分倍半萜类和芳香族类物质的相对含量之和仅为 2.67% ~7.88%。

而上述 7 种真菌菌液处理树体提取的挥发油化学成分中倍半萜、2-(2-苯乙基)色酮和芳香族类物质相对含量之和分别为 21.57%、21.85%、24.02%、22.83%、23.49%、25.15% 和 24.84%。多年来国内外沉香化学成分分析的研究表明,沉香所含活性物质高达 150 多种,但主要为倍半萜类、2-(2-苯乙基)色酮类和芳香族类物质^[13-14,16]。对照目标树提取物成分包括相对含量 0.75% 的倍半萜和 1.90% 的芳香族类物质,是因为滴注葡萄糖水及钻孔伤害足以促使沉香树体产生少量的沉香物质,而且在沉香树木粉干燥过程中,由于存在一部分活的细胞,倍半萜和芳香族代谢途径可能被促发^[14],而其他真菌不能有效促使白木香树体受胁迫而产生特定的次生代谢反应。研究表明:龙眼焦腐病菌注入 4 年生白木香树干,其 GC-MS 分析所得化学成分与天然沉香成份最为相近^[12],且通过组培试验证实,这种真菌能够通过产生茉莉酸甲酯,而显著提高愈创木烯等倍半萜类物质的含量^[17],与本试验中 F3 菌种试验结果一致;齐楠沉香 *A. agallocha* 经青霉菌菌液处理后,树干提取物含有沉香呋喃等倍半萜化合物^[18],与本试验中斑点青霉和小孢拟盘多孢毛菌种效果相

同;而运用木霉菌提取物来刺激马来沉香 *A. malaccensis* 悬浮体系,所得沉香物质最多,其提取物化学成分包括: β -桉叶醇、 β -愈创木烯和别香橙烯环氧化物^[19],与本试验黑绿木霉和拟康木霉菌种试验结果一致;高晓霞等^[20]研究表明,镰刀菌诱导白木香叶,促使沉香物质产生,这一过程可能与镰刀菌改变了白木香叶真菌种类有关。Mohamed 等^[21]认为,马来沉香受物理伤害后产生沉香物质,是由于伤口处感染镰刀菌的结果,这与 F20 菌种试验结果相近;将葡萄座腔菌接种于离体的白木香树枝,可以产生倍半萜 9-二甲基-2-(1-甲基亚乙基)-环癸醇,而本试验中未检测到这种倍半萜,可能是活体树干内封闭与离体树干环境开放的差异所致。本试验中,所有结香效果显著的白木香树体提取物中,均含有苜基丙酮,这也可能是其含有 2-(2-苯乙基)色酮类物质的原因^[22]。

综上所述,20种待测菌种中,只有7种真菌能有效促进白木香树体沉香物质的形成,而其他13种效用不明显。本研究中不同菌种的表现,对进一步促进白木香结香菌种的筛选,有很重要的借鉴作用。本试验中,使用真菌种类复杂,还需对其代谢液化学成分进行分析,才能进一步揭示真菌对白木香树体结香的促发机理。

致谢:衷心感谢陆俊坤博士提供试验菌种及惠州市鸿茂林业发展有限公司钟锦祥董事长供给试验所需白木香目标树和试验过程中给予的诸多帮助!

参考文献:

[1] 黄俊卿,魏建和,张争,等. 沉香结香方法的历史记载、现代研究及通体结香技术[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(3):302-306.

[2] NAEF R. The volatile and semi-volatile constituents of agarwood, the infected heartwood of *Aquilaria* species: A review[J]. Flavour Frag J, 2011, 26(2):73-87.

[3] 中国国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:172.

[4] SNELDER D J, LASCO R D. Smallholder tree growing for rural development and environmental services[M]. Berlin:Springer, 2008:245-262.

[5] 刘娟. 程序性细胞死亡与沉香倍半萜次生代谢关系的探索研究[D]. 北京:北京协和医学院, 2015.

[6] 张争,杨云,魏建和,等. 白木香结香机制研究进展及其防御反应诱导结香假说[J]. 中草药, 2010, 41(1): 156-159.

[7] ALAM J, MUJAHID M, BADR B, et al. An insight of

pharmacognostic study and phytopharmacology of *Aquilaria agallocha*[J]. J Pharm Sci, 2015, 5(8):173-181.

[8] 戚树源,陆碧瑶,朱亮锋,等. 白木香中白木香醛形成的研究[J]. 植物生理学通讯, 1992, 28(5): 336-339.

[9] 何梦玲,戚树源,胡兰娟. 白木香离体侧根中色酮类化合物的诱导形成[J]. 中草药, 2010, 41(2): 281-284.

[10] 刘鹏,高慎淦,陈念,等. 沉香资源与利用研究进展[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(03): 734-737.

[11] 刘军民,翟明. 国产沉香资源开发利用及化学成分研究进展[J]. 中国新药杂志, 2012, 21(1):8-11.

[12] ZHANG Z, HAN X M, WEI J H, et al. Compositions and antifungal activities of essential oils from agarwood of *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg induced by *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon. & Maubl[J]. J Brazil Chem Soc, 2014, 25(1): 20-26.

[13] NOR AZAH M A, ISMAIL N, MAILINA J, et al. Chemometric study of selected agarwood oils by gas chromatography-mass spectrometry[J]. J Trop For Sci, 2014, 26(3): 382-388.

[14] CHEN H Q, YANG Y, XUE J, et al. Comparison of compositions and antimicrobial activities of essential oils from chemically stimulated agarwood, wild agarwood and healthy *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg trees[J]. Molecules, 2011, 16(6): 4884-4896.

[15] LIU Y Y, CHEN H Q, YANG Y, et al. Whole-tree agarwood-inducing technique: An efficient novel technique for producing high-quality agarwood in cultivated *Aquilaria sinensis* trees[J]. Molecules, 2013, 18(3): 3086-3106.

[16] MEIER M. Isolation of anisyl acetone from agarwood oil[J]. J Essent Oil Res, 2003, 15(1): 54-56.

[17] 韩晓敏,梁良,张争,等. 可可毛色二孢菌对白木香产生倍半萜诱导作用[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(2): 192-196.

[18] BLANCHETTE R A, VAN BEEK H H. Cultivated agarwood: 6,848,211 B2[P]. 2005-02-01.

[19] JAYARAMAN S, MOHAMED R. Crude extract of *Trichoderma* elicits agarwood substances in cell suspension-culture of the tropical tree, *Aquilaria malaccensis* Lam [J]. Turk J Agric For, 2015, 39(2): 163-173.

[20] 高晓霞,周伟平,王磊,等. 镰刀菌诱导结香对白木香叶内生真菌分布和群落构成的影响研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(2): 197-203.

[21] MOHAMED R, JONG P L, ZALI M S. Fungal diversity in wounded stems of *Aquilaria malaccensis* [J]. Fungal Divers, 2010, 43(1): 67-74.

[22] 戚树源,林立东,叶勤法. 沉香中苜基丙酮及其在黄绿墨耳真菌中的生物转化[J]. 生物工程学报, 1998, 14(4): 464-467.

【责任编辑 庄 延,柴 焰】