

赵威威, 周再知, 刘高峰, 等. CO₂ 与液态物质耦合对沉香形成及成分的影响 [J]. 华南农业大学学报, 2024, 45(1): 60-70.
ZHAO Weiwei, ZHOU Zaizhi, LIU Gaofeng, et al. Formation and composition of agarwood co-induced by CO₂ coupling with liquid substances in *Aquilaria sinensis*[J]. Journal of South China Agricultural University, 2024, 45(1): 60-70.

CO₂ 与液态物质耦合对沉香形成及成分的影响

赵威威^{1,2}, 周再知¹, 刘高峰^{1,3}, 张青青¹, 黄桂华¹, 庞圣江^{1,4}

(1 中国林业科学研究院 热带林业研究所, 广东 广州 510520; 2 南京林业大学 林学院, 江苏 南京 210037; 3 菏泽学院 农业与生物工程学院, 山东 菏泽 274000; 4 中国林业科学研究院 热带林业实验中心, 广西 凭祥 532600)

摘要:【目的】探明 CO₂ 与液态物质 (无机盐、激素和真菌) 耦合对土沉香 *Aquilaria sinensis* 结香的诱导效果, 寻求高效诱导土沉香结香的新方法, 为人工诱导结香技术促进结香提供理论依据。【方法】以 13 年生土沉香为研究对象, 采用 CO₂ 与 3 种液态物质 (无机盐、激素和真菌) 耦合的方法诱导处理树体, 1 年后, 取样观察沉香树体结香部位切片组织结构和内含物变化, 并检测醇溶性挥发油含量及化学成分。【结果】1) 不同诱导处理对土沉香木质部中的淀粉颗粒均有不同程度的消耗。木薄壁细胞内侵填物质通过导管-薄壁细胞间半具缘纹孔进入相邻导管内积累至完全堵塞。2) CO₂ 与 3 种液态物质 (无机盐、激素和真菌) 诱导处理中, 射线薄壁细胞、轴向薄壁细胞和导管内油脂类物质积累存在差异, CK-1 (只充 CO₂) 仅存有少量油脂类物质, CK-2 (只打孔不充 CO₂) 未观察到油脂类物质。3) 诱导变色范围受诱导方法影响较大, 处理孔位置越远诱导变色距离越短, CO₂ 与无机盐联合诱导处理变色范围最大。4) 不同诱导处理的醇溶性挥发油含量存在差异, 黑褐色树脂越多含量越高。GC-MS 结果显示, 5 种诱导处理后共鉴定出 74 种化合物, 其中共有的成分主要为 11 种, 且部分醇溶性挥发油成分的相对含量在不同处理间差异较大。【结论】5 种诱导方式所产沉香样品的醇溶性挥发油含量、沉香特征性成分及含量存在差异, CO₂ 与无机盐耦合诱导的土沉香特征性成分和含量均高于其他处理, 诱导所产沉香品质最好, 其次为 CO₂ 与真菌联合诱导所产沉香, 仅填充 CO₂ 所产沉香品质较差。

关键词: CO₂; 耦合; 树脂; 化学成分; 沉香; 诱导方式

中图分类号: S567.19; S792.99

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2024)01-0060-11

Formation and composition of agarwood co-induced by CO₂ coupling with liquid substances in *Aquilaria sinensis*

ZHAO Weiwei^{1,2}, ZHOU Zaizhi¹, LIU Gaofeng^{1,3}, ZHANG Qingqing¹, HUANG Guihua¹, PANG Shengjiang^{1,4}

(1 Research Institute of Tropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Guangzhou 510520, China; 2 College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 3 College of Agriculture and Biological Engineering, Heze College, Heze 274000, China; 4 Tropical Forestry Experimental Center, Chinese Academy of Forestry, Pingxiang 532600, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the effect of CO₂ coupling with liquid substances (inorganic salts, hormones, and fungi) on agarwood induction in *Aquilaria sinensis*, seek a new method for the efficient induction of agarwood, and provide a basis for artificial induction technology promoting agarwood formation. 【Method】The method of coupling CO₂ with three liquid substances (inorganic salts, hormones, and fungi)

收稿日期: 2022-10-31 网络首发时间: 2023-06-30 09:01:08

首发网址: <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/44.1110.S.20230629.1432.002.html>

作者简介: 赵威威, 硕士研究生, 主要从事珍贵树种培育及沉香结香技术研究, E-mail: Zhao_vivi@163.com; 通信作者: 周再知, 研究员, 博士, 主要从事资源树种培育, E-mail: zzzhoucn@21cn.com

基金项目: 广东省林业科技创新项目 (2017KJ CX001); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (CAFYBB2022MB004)

was used to induce agarwood formation in 13-year-old *A. sinensis* trees for one year. Samples were taken to observe the changes of tissue structure and inclusions in the sections of agarwood-bearing parts of *A. sinensis* trees, and detect the differences of content and chemical composition in alcohol-soluble volatile oil. 【Result】 1) Different induction treatments depleted the starch granules in the xylem of the incense tree to different degrees. The invasive materials in the wood thin-walled cells were entering into the adjacent ducts through the semi-ciliated pores between the ducts and thin-walled cells, and accumulated until the ducts were completely blocked. 2) CO₂ and three liquid substances (inorganic salts, hormones, and fungi) induced differences in the accumulation of oil-like substances in ray thin-walled cells, axial thin-walled cells and ducts, with only a small amount of oil-like substances in CK-1 (Only filled with gas CO₂) and no oil-like substances observed in CK-2 (Only punching, not filled with gas CO₂). 3) The range of induced discoloration was greatly affected by the induction method, the distance of induced discoloration was shorter with the farther location of the treated holes, and the range of discoloration in the combined CO₂ and inorganic salt induction treatment was the largest. 4) The content of alcohol-soluble volatile oil varied significantly among the different induction treatments, and the more black-brown resin it contained, the higher the content. The GC-MS results showed that 74 compounds were identified after the five induction treatments, 11 of which were common components, and the relative contents of some alcohol-soluble volatile oil components varied greatly among treatments. 【Conclusion】 By comparing and analyzing the differences in alcohol-soluble leachate content, characteristic components, and content of incense produced by the five induction methods, it was found that CO₂ coupled with inorganic salts induced the best quality of agarwood produced by *A. sinensis*, the characteristic components and their contents were higher than those of other treatments. The sediment produced by combined induction of CO₂ and fungi were followed, and the quality of the sediment produced by filling CO₂ only was poor.

Key words: CO₂; Coupling; Resin; Chemical composition; Agarwood; Induction method

沉香是瑞香科 Thymelaeaceae 沉香属 *Aquilaria* 植物受到自然或人为因素刺激后产生的次生代谢物与木质部结合的油脂性木材^[1]。沉香作为我国传统的名贵药材,因其独特的香味,在亚洲、中东和欧洲等地被广泛用于制作香水、熏香和工艺品等^[2-6]。由于掠夺式的过度采伐,导致野生沉香属植物濒于枯竭,现已被列为濒危物种^[7]。为保护野生沉香资源和提高沉香产量,营建土沉香 *A. sinensis* 人工林势在必行。然而,健康的沉香树体并不产香,如何提高结香产量和质量是目前沉香产业发展的重大难题之一。

目前,国内外相关学者关于 CO₂ 诱导林木心材的研究显示,CO₂ 可调控心材的形成,其作用在于促使树体内部代谢反应偏向合成萜类物质,但对酚类物质的合成起到抑制作用^[8-10]。Nilsson 等^[11] 研究了樟子松 *Pinus sylvestris* 树干填充 C₂H₄、CO₂ 和 N₂ 对心材形成的影响,发现填充 C₂H₄ 或 CO₂ 可促使近似天然心材的形成。刘小金^[8] 对檀香 *Santalum album* 树干填充 C₂H₄、CO₂ 和 N₂ 发现,仅填充 CO₂ 处理的檀香心材中提炼的精油含量可达国际标准,说明填充气态类物质可作为一种新型外源物

质诱导土沉香结香的方式。目前,关于液态物质诱导结香技术研究颇多,但采用气态类物质诱导土沉香结香的研究相对较少。Chowdhury 等^[12] 认为化学物质可刺激沉香的形成,其中以亚硫酸氢钠、酵母提取物和铁粉按质量比 1:1:3 混合诱导处理的效果最优。潘质洪^[13] 研究发现,茉莉酸甲酯、乙烯利及其混合溶液亦能诱导土沉香木质部次生代谢产物的积累,二者均以 2% 体积分数配置的混合溶液所产倍半萜类种类及相对含量的效果最好,茉莉酸甲酯次之,乙烯利最差。Subasinghe 等^[14] 利用黑曲霉菌 *Aspergillus niger* 和腐皮镰刀菌 *Fusarium solani* 分别侵染土沉香发现,二者均可有效促进结香,其中腐皮镰刀菌诱导的沉香质量相对较好。Faizal 等^[15] 采用腐皮镰刀菌通体结香研究也发现,诱导 6 个月时可取得较好的结香效果。因此,本研究在热带林业研究所珍贵树种培育课题组前期试验及研究报道的较优诱导方式基础上^[12-17],选用树干填充 CO₂ 进行优良配方耦合的方式,开展土沉香结香试验,旨在探究气-液耦合对沉香形成和成分的影响,为人工诱导土沉香结香提供新技术和新理论。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验地位于广东省惠州市博罗县横河镇老圩村人工种植基地 (114°6'E, 23°20'N), 选用生长健康、长势均匀的 13 年生土沉香为试验材料, 平均胸径 (12.58±0.29) cm, 平均树高 (7.82±0.31) m。

1.2 试验设计

采用随机区组试验设计, 在研究报道的较优诱导方式^[12-17]基础上, 共设置 4 个气-液联合处理, 分别是 T1 处理:CO₂ 与体积比为 1:1 的腐皮镰孢菌、

黑绿木霉混合液; T2 处理:CO₂ 与浓度为 30 mol·L⁻¹ 的 NaCl+20 mol·L⁻¹ 的 FeCl₂ 混合液; T3 处理: CO₂ 与浓度为 0.5 mol·L⁻¹ 的茉莉酸甲酯+ 3 mol·L⁻¹ 的乙烯利混合液; T4 处理: CO₂ 与浓度为 20 mol·L⁻¹ 的 NaCl+0.1 mol·L⁻¹ 的茉莉酸甲酯+腐皮镰孢菌混合液; 并且以只充 CO₂ 为对照处理 (CK-1), 只打孔不充气作为空白对照 (CK-2), 具体见表 1。每个处理 5 株, 3 次重复, 试验共计处理 90 株。2020 年 11 月, 选择晴天开展试验。在诱导处理结束 1 年后, 在处理中随机选取样株, 进行各项指标测定。

表 1 CO₂ 与液体物质组合处理
Table 1 Combined treatment of CO₂ and liquid substances

处理 Treatment	打孔 Perforate	气态物质 Gaseous matter	液体物质组合 Liquid substance combination
T1	打孔	CO ₂	腐皮镰孢菌+黑绿木霉(体积比为 1 : 1)
T2	打孔	CO ₂	NaCl (30 mol·L ⁻¹)+ FeCl ₂ (20 mol·L ⁻¹)
T3	打孔	CO ₂	茉莉酸甲酯(0.5 mol·L ⁻¹)+ 乙烯利(3 mol·L ⁻¹)
T4	打孔	CO ₂	NaCl (20 mol·L ⁻¹)+ 茉莉酸甲酯(0.1 mol·L ⁻¹)+腐皮镰孢菌
CK-1	打孔	CO ₂	
CK-2	打孔		

1.3 处理方法

充气处理: 在距离树干基部 40 cm 处钻取 1 个充气孔 (直径 10 mm), 充气具体操作步骤参照专利方法^[18], 待充气完成后, 使用铁夹将橡胶管夹紧以保证管内气体充盈。每隔 15 d 填充 1 次气体, 持续处理 3 个月。

输液处理: 距充气孔垂直上方及树干对面 35 cm 处各钻取 1 个输液孔, 控制流速保证输液完全滴注 (250 mL/袋), 待输液完成后利用土沉香枝条填堵注射孔并用 AB 胶密封, 之后进行充气处理。每隔 1 个月滴注 1 次液体, 持续处理 3 个月, 垂直纵向输液孔两两间隔为 40 cm。

1.4 指标测定

1.4.1 木质部组织结构内含物观察 每个处理随机选取 1 棵样株, 在充气孔上方 3 cm 处, 用生长锥钻取木芯, 样品置于 FAA 固定液带回实验室后, 制成 2 mm 厚的薄片, 使用扫描电镜 (JSM-6510LV, Japan) 观察木质部组织结构的变化并拍照记录。

1.4.2 木质部油脂类物质观察 取样方法同“1.4.1”, 将样品置于 FAA 固定液带回实验室后, 采用石蜡切片法^[19]固定样品, 运用德国莱卡滑动切片机 (Leica RM2255, Germany) 切取样品三切面 (横切面、径切面和弦切面), 并使用高清数码相机

(Pixera Pro 600ES, USA) 和光学显微镜 (Olympus BX51, Japan) 拍照、观察。

1.4.3 木质部变色范围测定 每个处理随机选取 3 株, 分别在处理孔 (充气孔和输液孔) 上下方使用内径 0.5 cm 的生长锥每隔 3~5 cm 钻取木芯, 直至钻取木芯全为白木为止, 室内绘制变色距离直观图。

1.4.4 醇溶性挥发油含量及成分测定 每个处理均选用 5 棵样株, 在充气孔上方 5 cm 处, 截取 5 cm 厚半圆片, 将其置于 40 ℃ 恒温干燥箱烘至恒质量。分别用小刀除去白木部分, 将剩余的深色树脂部分 (沉香区) 粉碎后过 40 目筛网。称取 2.00 g 木粉粉末, 置离心管中, 加入 φ 为 95% 乙醇溶液 20 mL, 在水浴中超声处理 30 min, 取上清液, 并重复上述操作 1 次。用 0.45 μm 滤膜将 2 次上清液定容到 50 mL, 通过旋转蒸发浓缩后计算精油含量^[20], 最后求平均值。

精油成分采用气相色谱质谱 (GC-MS) 系统 (安捷伦 7890B-5977A, 美国) 进行测定。搜索 NIST14 库, 依据保留指数鉴定化合物, 计算峰面积, 得到各组分的相对含量。色谱条件: 色谱柱 HP-5MSZ (30 m×0.25 mm×0.25 μm); 升温程序: 起始温度 70 ℃, 保持 1 min 后, 以 10 ℃/min 升至 150 ℃,

保持 5 min; 再以 5 °C/min 升至 200 °C, 保持 5 min; 然后以 8 °C/min 升至 280 °C, 保持 1 min。进样口温度 250 °C; 载气为高纯 He(ρ 为 99.999%), 载气流量 10 mL/min, 进样量 0.2 μ L (不分流), 溶剂延迟 4 min。质谱条件: 色谱-质谱接口温度 280 °C; 离子源温度 230 °C; 电离方式 EI; 电子能量 70 eV, 质量扫描范围 35~350 AMU。

1.5 数据分析

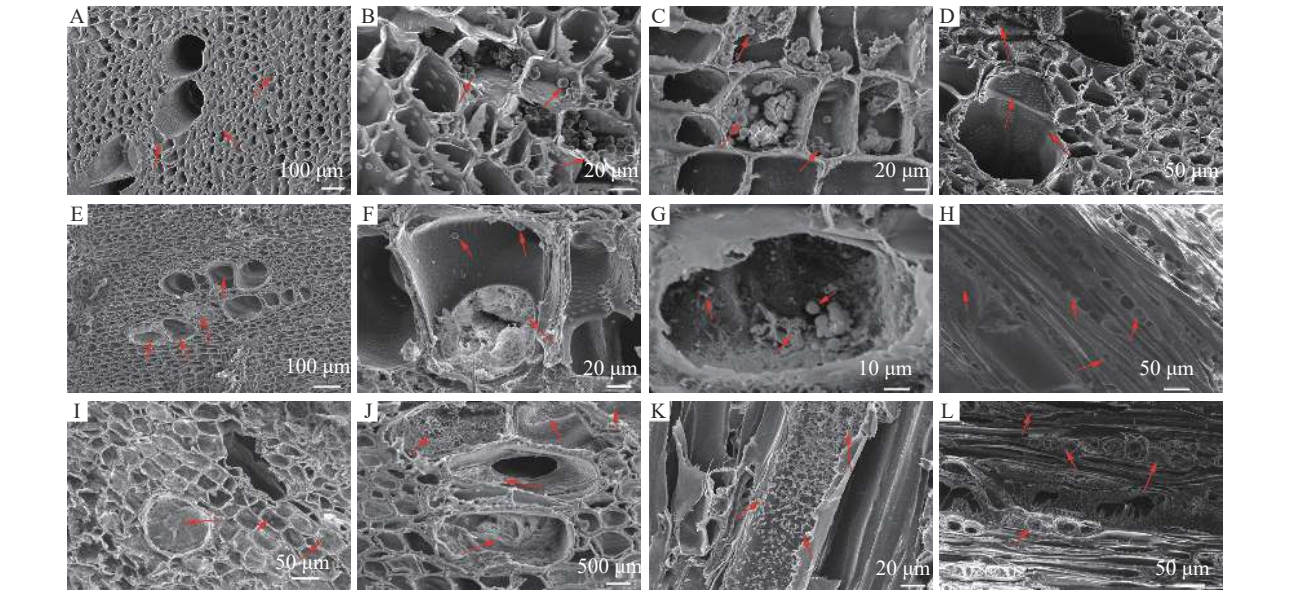
采用 Excel 进行数据录入及预处理, 运用 SPSS 22.0 和 Origin 2021 软件进行数据统计分析。

2 结果与分析

2.1 木质部组织结构内含物变化

以 CK-1 和 T2 处理为例, 土沉香木质部组织结构内含物见图 1。处理前土沉香木质部导管、木射

线细胞内存在大量淀粉粒 (图 1A~C), 导管纹孔、管壁结构清晰, 但导管内未观察到累积形成的侵填物或油脂类物质 (图 1D), 诱导处理 1 年后, CK-1 处理的导管、木射线出现絮状内含物的富集, 淀粉粒在木射线细胞内逐渐消失, 木薄壁细胞内开始积累絮状内含物, 并通过导管-薄壁细胞的半具缘纹孔进入到相邻导管内, 进一步在导管内或薄壁细胞内累积, 但未完全堵塞导管和木射线细胞 (图 1E~G)。T2 处理的导管、射线细胞内内含物大量富集, 淀粉粒在木射线细胞内完全消失, 导管和木射线细胞内油脂类物质或内含物累积增多乃至完全堵塞 (图 1I~L)。由此可知, 诱导结香过程可能与组织细胞内淀粉粒转化程度有关, 与 CK-1 处理相比, T2 处理明显促进了淀粉粒的分解转化, 加快了导管和射线细胞内含物的形成和转运。



A~D: 处理前; E~H: CK-1 处理; I~L: T2 处理; A、D、E、I 横切面上箭头所指为导管、木射线和木纤维; B、C 中箭头所指为木射线内淀粉粒; F、J、K 中箭头所指为导管内油脂粒和侵填物; G、H、L 中箭头所指为木射线细胞侵填物
A~D: Before treatment; E~H: CK-1 treatment; I~L: T2 treatment; Arrows in cross-sections of A, D, E and I are vessel, wood rays and wood fibres; Arrows in B and C are starch grains in wood rays; Arrows in F, J and K are oil grains and infestations in ducts; Arrows in G, H and L are infestations in wood ray cells

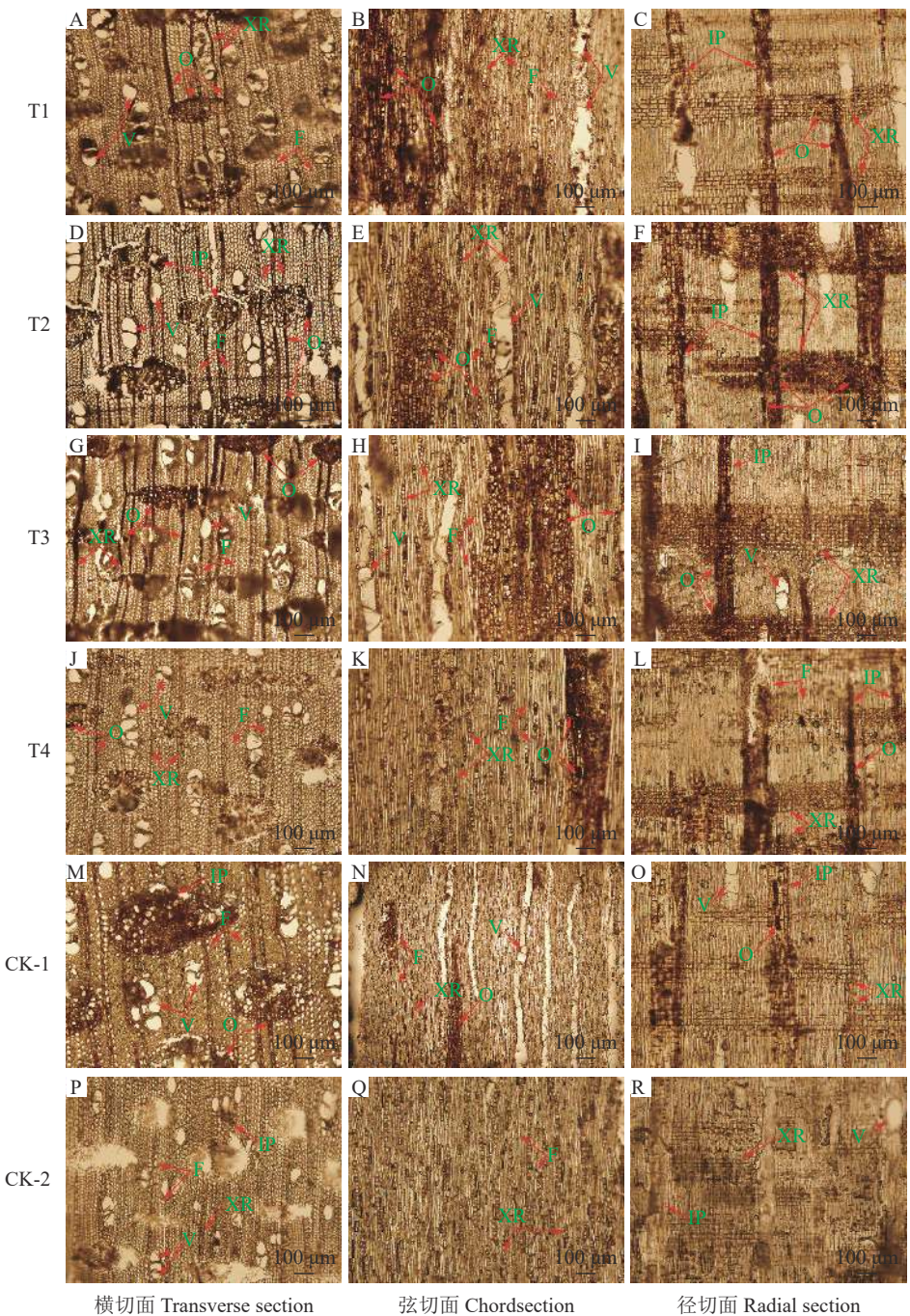
图 1 扫描电镜下不同处理的土沉香木质部内含物变化情况

Fig. 1 Changes of xylem inclusions of *Aquilaria sinensis* in different treatments under scanning electron microscopy

2.2 木质部油脂类物质分布

从图 2 可见, 不同诱导处理的土沉香木质部结构相似, 横切面导管呈椭圆形或卵圆形, 多个单管孔排列为径向复管孔或管孔团, 弦切面导管以单列型射线为主, 呈现为两头细中间宽的梭形或椭圆形, 均匀分布, 径切面木射线内涵韧皮部呈不间断的横向分布。其主要区别在于, 不同诱导处理下木质部累积褐色或深褐色油脂类的范围不同。经诱导处理 1 年后, 显微观察树干木质部三切面 (横切面、径切面和弦切面) 褐色或深褐色油脂类累积形成的

区域 (图 2A~O), 发现油脂类物质大多累积在导管、木射线细胞和内涵韧皮部中, 而未处理样品三切面 (图 2P~R) 并未在细胞内观察到油脂类物质存在。经显微对比分析发现, T2 处理 (图 2D~F) 深褐色油脂类在导管、木射线细胞和内涵韧皮部积累最多, 其诱导效果最好; 其次为 T1 (图 2A~C) 和 T3 处理 (图 2G~I), 也可明显观察到导管、木射线细胞和内涵韧皮部中存在油脂类物质; 仅单独充 CO₂ 的 CK-1 处理的效果较差, 仅在薄壁组织和导管内发现少量油脂类物质 (图 2M~O)。空白对照组 CK-2 处理,



图中箭头尾部大写字母 V: 导管, O: 油脂, IP: 薄壁细胞, F: 木纤维, XR: 木射线
For the capital letter at the end of the arrow in the diagram, V: Vessel, O: Wood grease, IP: Parenchyma cell, F: Wood fiber, XR: Wood ray

图 2 光学显微镜下不同诱导处理的土沉香木质部三切面解剖差异

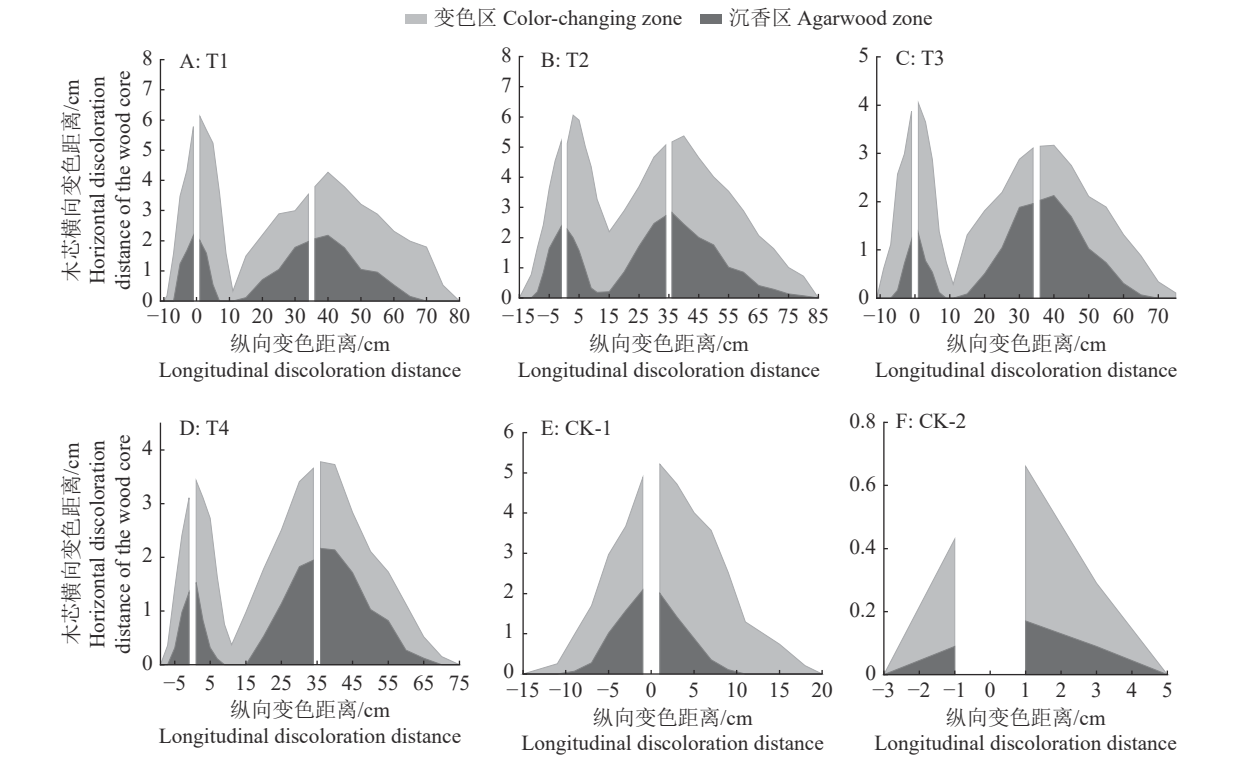
Fig. 2 Anatomical differences of three-section planes of *Aquilaria sinensis* xylem in different induction treatments under light microscopy

在导管、木射线和薄壁细胞内并未观察到油脂类物质存在(图 2P~R)。

2.3 树干木质部木芯变色距离

由图 3 可见,不同诱导处理对土沉香树干木质部木芯变色距离影响不同,其相似点在于木芯纵向和横向变色距离随着距处理孔位置越远变色距离越短。经诱导处理 1 年后, T2 处理诱导土沉香变色距离效果最好,其纵向变色距离最长,达 100 cm,

是 CK-1 处理的 2.86 倍,其次为 T1 处理纵向变色距离达 89 cm,效果最差为 CK-1 和 CK-2 处理。在木芯横向变色距离上,各处理之间尽管差异不显著,但均高于 CK-2。T2 处理下木芯变色区和沉香区的横向变色距离均最长,分别为 6.21 和 3.02 cm, T1 处理木芯变色区和沉香区变色距离最长,分别达 6.12 和 2.17 cm。根据表观估计,不同诱导处理诱导变色范围(纵向变色距离和横向木芯变色距



横坐标 0 和 35 cm 分别代表充气孔和输液孔位置, 负值代表纵向充气孔以下诱导变色距离

The horizontal coordinates 0 and 35 cm represent the location of the inflation and infusion holes, respectively, and the negative values represent the distance of induced discoloration below the longitudinal inflation hole

图 3 不同诱导处理土沉香树干木质部木芯变色距离

Fig. 3 Distance of discoloration of wood cores in woody parts of treated *Aquilaria sinensis* trunks in different induction treatments

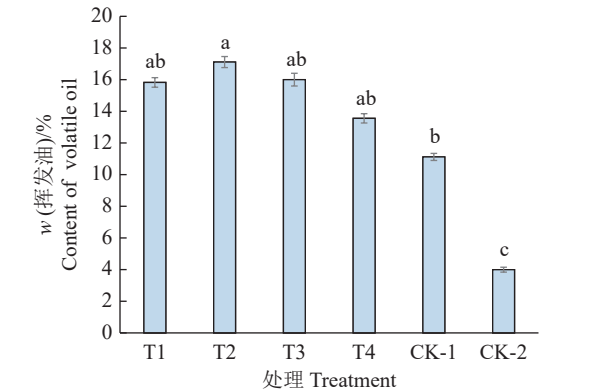
离) 大小排序为: T2 处理>T1 处理>T3 处理>T4 处理>CK-1 处理>CK-2 处理。

2.4 醇溶性挥发油含量及化学成分分析

由图 4 可见, 经诱导处理 1 年后, 不同诱导处理的土沉香醇溶性挥发油含量较对照组 (CK-1、CK-2) 均有不同程度的提高。其中, T2 处理的土沉

香醇溶性挥发油质量分数最高, 达 17.11%, 分别是 CK-1、CK-2 处理的 1.17 和 3.96 倍; 其次为 T3 处理, 其醇溶性挥发油质量分数达 16.00%; 空白对照组 (CK-2) 的效果最差, 其醇溶性挥发油质量分数仅达到 4.00%。方差分析结果显示, T1~T4 处理间的土沉香醇溶性挥发油含量差异不显著, 但 T2 处理的醇溶性挥发油含量较 T1、T3 和 T4 处理均有所提升, 与 CK-1 处理相比, 仅 T2 处理诱导的土沉香醇溶性挥发油含量差异显著, 其余 3 个处理与 CK-1 处理挥发油含量差异虽不显著, 但均有不同程度的提高。

不同诱导处理的土沉香挥发油成分种类及含量列于表 2。CK-2 处理并未检测出倍半萜和色酮类物质, 主要成分以脂肪酸类为主。T1~T4 和 CK-1 处理土沉香样品醇溶性挥发油中分别检测到 38、44、34、39、23 个色谱峰, 共鉴定出 74 种化学成分, 主要包含 33 种萜烯类化合物、9 种色酮类化合物、16 种芳香族化合物和 15 种脂肪酸/烷烃类化合物, 用峰面积归一化法测定的这些色谱峰在 T1~T4 和 CK-1 处理样品中的总相对含量之和分别为 85.57%、92.97%、85.24%、83.86%、73.58%, 其中, 倍半萜类化合物和 2-(2-苯乙基) 色酮类成分相对



柱子上方凡是有一个相同小写字母者, 表示差异不显著 ($P>0.05$, Duncan's 法)

Any two columns with one identical lowercase letter on the bars indicates that the difference is not significant ($P>0.05$, Duncan's method)

图 4 不同诱导处理的醇溶性挥发油含量

Fig. 4 Contents of alcohol-soluble volatile oil under different induction treatments

表 2 不同处理下土沉香挥发油成分及相对含量

Table 2 Chemical constituents and relative contents of agarwood extracted oils under different treatments

序号 No.	化合物 ¹⁾ Compound	分子式 Molecular formula	相对含量/% Relative content				
			T1	T2	T3	T4	CK-1
1	苯甲醛 ¹ Benzaldehyde	C ₇ H ₆ O	3.33	3.23	4.20	2.70	2.48
2	苄基丙酮 ¹ 2-Butanone, 4-phenyl-	C ₁₀ H ₁₂ O	2.86	4.74	4.71	1.40	3.72
3	石竹烯-(11) ¹ Caryophyllene-(11)	C ₁₅ H ₂₄	—	—	0.13	1.21	—
4	5-甲氧基-1,3-二甲基吡唑 5-Methoxy-1,3-dimethyl-pyrazole	C ₆ H ₁₀ N ₂ O	0.47	0.74	—	0.32	—
5	2,5-二甲基庚-1,3,5-三烯 ² 2,5-Dimethylhepta-1,3,5-triene	C ₉ H ₁₄	—	0.38	—	0.21	—
6	(-)-蓝桉烯 ³ (-)-Globulol	C ₁₄ H ₂₂ O	—	—	—	0.97	—
7	2-异丙氧基丙酸乙酯 2-Isopropoxyethyl propionate	C ₈ H ₁₆ O ₃	—	—	1.78	—	—
8	白菖烯 ¹ Alloaromadenderen	C ₁₅ H ₂₄	3.56	4.69	2.52	1.86	—
9	苯丙醛 ¹ Benzenepropanal	C ₉ H ₁₀ O	0.36	—	5.65	—	0.52
10	氢化肉桂酸 ¹ Hydrocinnamic acid	C ₉ H ₁₀ O ₂	—	—	3.07	1.06	1.32
11	2,4-二叔丁基苯酚 ³ 2,4-Di-tert-butylphenol	C ₁₄ H ₂₂ O	—	0.49	—	—	—
12	2'-羟基-5'-甲氧基苯乙酮 ³ Ethanone, 1-(2-hydroxy-5-methoxyphenyl)-	C ₉ H ₁₀ O ₃	—	—	0.69	1.95	—
13	β-水芹烯 ³ Beta-phellandrene	C ₁₀ H ₁₆	0.42	—	—	0.75	—
14	1-甲基-4-(2-甲基环氧)-7-氧双环[4.1.0]庚烷 ² 7-Oxabicyclo[4.1.0]heptane, 1-methyl-4-(2-methyloxiranyl)-	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	0.45	—	0.70	—	—
15	二十烷 ² Eicosane	C ₂₀ H ₄₂	1.31	1.58	—	1.84	4.21
16	十二烷-9-酮 ² Oxatetracyclo[5.3.2.0(2,7).0(2,8)]dodecan-9-one	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	0.53	—	0.72	0.93	—
17	异香橙烯环氧化物 ¹ Isoaromadendrene epoxide	C ₁₅ H ₂₄ O	2.75	—	1.56	1.20	0.85
18	赤藓糖醇 ¹ Erythritol	C ₄ H ₁₀ O ₄	—	1.73	5.02	—	1.17
19	戊烯醇 ¹ Valerenol	C ₁₅ H ₂₄ O	—	—	0.34	—	0.62
20	木香醇 ¹ Costol	C ₁₅ H ₂₄ O	—	0.47	—	1.52	—
21	沉香螺醇 ¹ Agarospirol	C ₁₅ H ₂₆ O	0.56	2.47	1.11	0.97	0.43
22	缬草-4,7(11)-二烯 ¹ Valerena-4,7(11)-diene	C ₁₅ H ₂₄	1.77	1.21	—	2.47	1.47
23	白木香醛 ¹ Baimuxinal	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	4.39	7.84	3.75	3.56	1.65
24	缬草素 ¹ Valerenic acid	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	—	1.81	0.38	1.53	2.42
25	α-愈创木烯 ¹ α-Guaiene	C ₁₅ H ₂₄	1.34	1.47	0.56	1.44	0.84
26	2-羟基-3-丙基-1,4-萘醌 1,4-Naphthalenedione, 2-hydroxy-3-propyl-	C ₁₃ H ₁₂ O ₃	1.33	—	—	—	—
27	1,3-二氢-5-甲乙基-1-苯甲基甲酮 1,3-dihydro-5-(1-methylethyl)-1-(phenylmethyl)- 2H-imidazole-2-thione	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ S	5.35	—	—	—	3.85
28	β-朱桉 ³ β-Vatirenene	C ₁₅ H ₂₂	—	2.58	1.39	1.71	—
29	2,2,8,8-四甲基-3,6-壬二烯-5-酮 3,6-Nonadien-5-one, 2,2,8,8-tetramethyl-	C ₁₃ H ₁₈ O	0.41	1.42	—	—	—
30	(+)-香橙烯 ¹ Aromandendrene	C ₁₅ H ₂₄	2.28	2.38	1.04	1.95	0.73
31	长叶烯 ¹ Longifolene	C ₁₅ H ₂₄	1.46	1.30	1.28	2.45	0.43
32	1H-茛-4-羧酸, 2,3,6,7-四氢-7-甲基鸟苷-, 乙酯 1H-indene-4-carboxylic acid, 2,3,6,7-tetrahydro-7-methyl-, ethyl ester	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	0.97	—	—	—	0.62
33	β-紫罗兰酮 ³ Trans-β-ionone	C ₁₃ H ₂₀ O	1.46	2.40	—	—	0.70
34	芹子烯 ¹ α-Selinene	C ₁₅ H ₂₄	1.24	3.27	2.10	0.86	0.32

续表 2 Continued table 2

序号 No.	化合物 ¹⁾ Compound	分子式 Molecular formula	相对含量/% Relative content				
			T1	T2	T3	T4	CK-1
35	β -芸烯 ³ β -Vatirenene	C ₁₅ H ₂₂	0.94	—	—	1.79	—
36	长叶香芹酮 ¹ Longipinocarvone	C ₁₅ H ₂₂ O	—	2.53	—	—	0.84
37	氧化二烯(I) ¹ Cycloheptane	C ₁₅ H ₁₀ ClN ₃ O	0.60	—	—	—	0.53
38	2-乙基吡啶 ³ 2-Ethylacridine	C ₁₅ H ₁₀ ClN ₃	1.19	—	—	—	0.74
39	1-苄氧基-8-萘酚 ² 8-Naphthol, 1-(benzyloxy)-	C ₁₇ H ₁₄ O ₂	—	—	1.15	—	0.58
40	间苯乙基苯甲腈 ³ Benzonitrile, <i>m</i> -phenethyl-	C ₁₅ H ₁₃ N	1.87	—	1.58	—	—
41	2-异丙基噻唑烷-3,4-二羧酸,3-苄酯 ² 2-Isopropyl-thiazolidine-3,4-dicarboxylic acid, 3-benzyl ester	C ₁₅ H ₁₉ NO ₄ S	1.46	0.13	—	0.37	4.27
42	2-二甲基-1,2,3,4, 4a,5,6,8a-八氢萘-2-丙烯醛 ² 2-Dimethyl-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydronaphthalen-2-acrylaldehyde	C ₁₅ H ₂₂ O	—	1.41	—	—	—
43	3,4,4-三甲基-3-(3-甲基-1,3-丁二烯基)-双环[4.1.0]庚烷-2-酮 ² Bicyclo[4.1.0]heptan-2-one, 3,4,4-trimethyl-3-(3-methyl-1,3-butadienyl)-	C ₁₅ H ₂₂ O	1.18	—	—	0.38	—
44	1,5-二甲基-8-(1-甲基亚乙基)-1,5-环癸二烯 1,5-Cyclodecadiene, 1,5-dimethyl-8-(1-methylethylidene-, E,E)-	C ₁₅ H ₂₄	0.90	0.58	—	1.41	—
45	3-羟基-2-对甲苯基-2-丁烯腈 ³ 3-Hydroxy-2-p-tolyl-2-butenenitrile	C ₁₁ H ₁₁ NO	2.25	—	—	—	1.45
46	蛇麻烯 ³ Humulene	C ₁₅ H ₂₄ O	0.89	1.37	0.58	1.57	—
47	甲基丁香酚 ³ Methyleugenol	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	—	1.47	—	0.51	—
48	A-乙基苯甲醇乙酸酯 ³ Acetic acid, 1-phenylpropyl ester	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	1.78	1.54	—	1.42	2.53
49	4-(4-甲氧苯基)-2-丁酮 ³ 2-Butanone, 4-(4-methoxyphenyl)-	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	—	0.29	1.43	1.74	1.53
50	香树烯 ¹ Alloaromadendrene	C ₁₅ H ₂₄	0.85	1.72	0.37	—	—
51	Bicyclo[7.2.0]undecane, 10,10-dimethyl-2,6-bis(methylene)-, [1 <i>S</i> -(1 <i>R</i> *,9 <i>S</i> *)]-	C ₁₅ H ₂₄	0.59	0.32	—	1.04	—
52	别香氧化物 ¹ Alloaromadendrene oxide-(2)	C ₁₅ H ₂₄ O	0.87	—	0.56	—	1.69
53	檀香醇 α ¹ Santalol, cis, alpha-	C ₁₅ H ₂₄ O	—	1.38	—	1.06	1.42
54	新氯芬-(I),二氢 Neoclovene-(I), dihydro-	C ₁₅ H ₂₆	—	0.58	—	—	1.54
55	N-丁基乙酰胺 ² Acetamide, N-butyl-	C ₆ H ₁₃ NO	0.70	—	—	—	—
56	2-乙酰基噻吩 ² Ethanone,1-(2-thienyl)-	C ₆ H ₆ OS	—	0.32	—	0.82	—
57	1-十六烯 ¹ Hexadecane	C ₁₆ H ₃₂	—	—	3.46	—	—
58	2-苯乙基-4H-色烯-4-酮 ⁴ 2-Phenethyl-4H-chromen-4-one	C ₁₇ H ₁₄ O ₂	4.41	7.04	8.23	5.02	4.46
59	6-甲氧基-2-苯乙基-4H-苯并吡喃-4-酮 ⁴ 6-Methoxy-2-phenethyl-4H-chromen-4-one	C ₁₈ H ₁₆ O ₃	0.75	2.08	—	—	—
60	2-[2-(4-甲氧基)苯乙基]色酮 ⁴ 2-(2-(4-Methoxyphenethyl)) chromen	C ₁₈ H ₁₆ O ₃	5.80	3.32	4.87	3.17	2.73
61	2-甲基腺苷 Adenosine, 2-methyl-	C ₁₁ H ₁₅ N ₅ O ₄	—	0.24	—	0.42	—
62	十八烯酸 ² Oleic Acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	1.34	0.67	—	0.85	0.68
63	2-(2-羟基丙酰基)苯基乙醛酸甲酯 ³ 2-(2-Hydroxypropionyl)phenylglyoxylic acid, methyl ester	C ₁₂ H ₁₂ O ₅	1.01	—	—	—	—
64	3-(4-氨基苯基)甲基-4-戊二酮 ³ 4-pentanedione, 3-[(4-aminophenyl)methyl]-	C ₁₂ H ₁₅ NO ₂	—	—	0.31	—	—
65	1,2,4-三乙苯 ³ Benzene, 1,2,4-triethyl-	C ₁₂ H ₁₈	—	0.45	—	0.18	—
66	正十八烷 ² Octadecane	C ₁₈ H ₃₈	—	—	1.48	0.42	—

续表 2 Continued table 2

序号 No.	化合物 ¹⁾ Compound	分子式 Molecular formula	相对含量/% Relative content				
			T1	T2	T3	T4	CK-1
67	3-甲基-2-(4-甲氧基苯乙基)色酮 ⁴ 3-Methoxyl-2-(4-methoxyphenyl)-chromone	C ₁₉ H ₁₈ O ₃	—	3.58	—	—	5.79
68	6-甲氧基-2-(4-甲氧基苯乙基)色酮 ⁴ 6-Methoxy-2-(4-methoxyphenyl)chromone	C ₁₉ H ₁₈ O ₄	3.40	12.25	3.22	2.49	1.48
69	6,7-甲氧基-2-(2-苯乙基)-4-色酮 ⁴ 6,7-Methoxy-2-phenethyl-4H-chromen	C ₁₉ H ₁₈ O ₄	15.19	10.64	3.12	15.06	—
70	6,7-二甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-4H-乙基色酮 ⁴ 6,7-Dimethoxy-2-(4-methoxyphenethyl)-4H-chromen-4-one	C ₂₀ H ₂₀ O ₅	2.80	3.03	—	—	1.28
71	2-甲基十九烷 ² Nonadecane, 2-methyl-	C ₂₀ H ₄₂	0.57	—	—	—	0.74
72	姜烯酮 A ¹ Gingerenone A	C ₂₁ H ₂₄ O ₅	0.86	—	0.64	0.31	—
73	正二十六烷 ² Hexacosane	C ₂₆ H ₅₄	—	—	0.57	—	1.72
74	6,7-二甲氧基-2-(2-苯乙基)色酮 ⁴ 6,7-Dimethoxy-2-(2-phenethyl)chromone	C ₃₁ H ₄₅ NO ₅	4.45	7.41	4.63	5.84	10.9
主要有效成分 Main active ingredients		倍半萜类 Sesquiterpenoids	28.21	34.27	41.92	32.23	24.35
		色酮类 Chromones	36.81	49.35	24.59	35.61	29.76
		芳香族 Aromatic	11.81	9.35	5.98	7.14	8.24
		脂肪酸/烷烃类 Fatty acids/alkanes	6.08	5.36	14.17	9.88	10.43
		合计 Total	82.91	98.33	86.66	84.86	72.78

1) 上角标数字表示物质类别, 其中, 1: 倍半萜类物质, 2: 脂肪酸/烷烃类物质, 3: 芳香族物质, 4: 色酮类物质; “—”表示未检测出该物质

1)Upper corner numbers indicate substance groups, where 1: Sesquiterpenes, 2: Chromones, 3: Aromatic substances, 4: Fatty acids/alkanes; “—” indicates that the substance was not detected

含量之和分别为 59.25%、78.26%、60.95%、54.82% 和 46.42%。5 种诱导方式下的挥发性成分中, 共有的成分主要为 11 种, 包括倍半萜类: 白木香醛、 α -愈创木烯、香橙烯、长叶烯、沉香螺醇、苯甲醛、苜基丙酮; 色酮类: 2-(2-苯乙基) 色酮、2-[2-(4-甲氧基) 苯乙基] 色酮、6, 7-二甲氧基-2-(2-苯基乙基) 色酮和 6-甲氧基-2-(4-甲氧基苯乙基) 色酮。其中, 7 种特征性物质成分白木香醛、 α -愈创木烯、香橙烯、长叶烯、沉香螺醇、苯甲醛、苜基丙酮相对含量之和分别占 5 种诱导处理倍半萜类总相对含量的 52.74%、56.08%、35.47%、46.96% 和 40.71%。

3 讨论与结论

沉香是树体受到外界刺激或损伤后激活树体防御反应, 经长期缓慢累积而成的^[16]。为提高沉香

的产量和质量, 探索高效的人工诱导方法迫在眉睫。本研究发现, 诱导处理后内涵韧皮部、木射线和导管中均出现褐色或黑褐色油脂类物质积累现象, 油脂类物质或内含物通过导管-薄壁细胞间纹孔进入相邻导管内积累甚至完全堵塞, 并伴随着类似心材变色现象, 该现象与前人研究结果一致^[17, 21]。变色区域在一定程度上反映了土沉香次生代谢物积累的程度, 且与沉香质量及挥发油含量存在直接的关系, 表现为木质部含有的黑褐色物质越多, 挥发油含量越高。

沉香富含多种有机物质, 不同诱导方式所产沉香成分存在差异, 但其主要成分为倍半萜类和色酮类物质^[14]。对本研究所产沉香样品检测发现, CO₂ 与真菌、无机盐联合诱导所产沉香样品中的色酮类成分相对百分含量更高, 这与廖格等^[22]、Ma 等^[23]研究结果一致, 但色酮类成分相对百分含量略低,

这可能是诱导处理材料及处理时间的差异引起的。另外, 由于检测方式中 Nist 和 Wiley 质谱库包含的 2-(2-苯乙基) 色酮类化合物的质谱数据极其有限, 而目前已报道的 2-(2-苯乙基) 色酮类化合物多达几十种, 因此, 对于评价沉香品质的 2-(2-苯乙基) 色酮类色谱库的建立极有必要。相比而言, CO₂ 与激素联合诱导所产沉香样品中倍半萜类相对百分含量更高, 这与宋晓琛等^[17]、王之胤^[24]研究的结论一致, 其主要原因可能是激素刺激启动了土沉香信号转导途径, 促进沉香成分中脂类和倍半萜类物质的积累^[13,25]。相较于前期仅采用生物和化学方式诱导结香试验^[17-18], 本试验采用了耦合的方式, 所产沉香成分中色酮类和倍半萜类相对百分含量均有提升, 尤其是倍半萜类相对百分含量提升更多, 这可能与充入 CO₂ 对土沉香树体造成高度物理损伤以及 CO₂ 自身可促进萜类物质的生物代谢与合成有关。此外, 本试验诱导处理所结沉香中均检测到富含与天然沉香相似的挥发性成分苯基丙酮和沉香螺醇, 以及与沉香品质相关的倍半萜类特征性成分白木香醛、香橙烯、长叶烯等。杨锦玲等^[26]、Hashim 等^[27] 研究报道, 通过对沉香成分中另一类特征性成分 2-(2-苯乙基) 色酮类化合物含量进行沉香品质定量评价, 结果显示, 沉香色酮含量与品质呈正相关。本研究通过 GS-MS 技术分析色酮类特征性成分 2-(2-苯乙基) 色酮和 2-[2-(4-甲氧基) 苯乙基] 色酮相对含量, 结果显示, 5 种诱导处理的色酮类特征成分含量之和达到 7.19%~13.1%, 显著高于黄熟香和吊口沉香色酮类特征成分含量^[26]。在诸多研究中, 均以这些具有药理活性的特征成分相对百分含量作为评价沉香等级和沉香质量的重要参考指标^[28]。本研究通过比较不同诱导方式所产沉香特征性成分(白木香醛、 α -愈创木烯、香橙烯、长叶烯、沉香螺醇、苯甲醛、苄基丙酮)及含量, 发现 CO₂ 与无机盐联合诱导所产沉香倍半萜类特征性成分的总含量最高, 为 23.43%, 其次为 CO₂ 与真菌联合诱导所产沉香(16.22%), 而单独 CO₂ 处理所产沉香含量最低(10.28%), 因此在诱导所产沉香品质评价中, 以 CO₂ 与无机盐联合诱导更具有优势。

综上所述, 本试验以不同诱导方式所产沉香为研究对象。通过对所产沉香微观特征、醇溶性挥发油含量、沉香特征成分和含量分析发现, 均符合《LY/T 2904—2017 沉香》^[29] 的相关要求, 且诱导所产沉香样品醇溶性挥发油含量明显高于《中国药典》标准。其中 CO₂ 与无机盐耦合诱导土沉香特征

性成分和含量均高于其他处理, 醇溶性挥发油质量分数达 17.11%, 诱导所产沉香品质最好; 其次为 CO₂ 与真菌联合诱导所产沉香, 醇溶性挥发油质量分数达 16.00%; 仅填充 CO₂ 所产沉香较差, 醇溶性挥发油质量分数为 11.12%。

参考文献:

[1] 王军, 王宇光, 杨锦玲, 等. 2 种白木香所产沉香的木材组织构造和化学成分比较[J]. 林业科学, 2019, 55(7): 146-154.

[2] 中华人民共和国药典委员会. 中国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 172.

[3] ELISA M F, IBRAHIM H, MAHAMOD W R W. A review on the malaysian *Aquilaria* species in karas plantation and agarwood production[J]. International Journal of Academic Research in Business and Social Sciences, 2017, 7(4): 1021-1029.

[4] WANG S L, TASI Y C, FU S L, et al. 2-(2-Phenylethyl)-4H-chromen-4-one derivatives from the resinous wood of *Aquilaria sinensis* with anti-inflammatory effects in LPS-induced macrophages[J]. *Molecules*, 2018, 23(2): 289. doi: 10.3390/molecules23020289.

[5] NAZIZ P S, DAS R, SEN S. The scent of stress: Evidence from the unique fragrance of agarwood[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 840. doi: 10.3389/fpls.2019.00840.

[6] LIU J, ZHANG X, YANG J, et al. Agarwood wound locations provide insight into the association between fungal diversity and volatile compounds in *Aquilaria sinensis*[J]. *Royal Society Open Science*, 2019, 6(7): 190211. doi: 10.1098/rsos.190211.

[7] LI W, CHEN H Q, WANG H, et al. Natural products in agarwood and *Aquilaria* plants: Chemistry, biological activities and biosynthesis[J]. *Natural Product Reports*, 2021, 38(3): 528-565.

[8] 刘小金. 檀香精油成分组成、分布及人工促成心材形成的研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2012.

[9] KAMPE A, MAGEL E. New insights into heartwood and heartwood formation[M]//MOHAMED R. Cellular aspects of wood formation. Berlin, Heidelberg: Springer, 2013: 71-95.

[10] 罗蓓, 何蕊, 杨燕. 边材生理机能及心材形成机理的研究进展[J]. 北京林业大学学报, 2018, 40(1): 120-129.

[11] NILSSON M, WIKMAN S, EKLUND L. Induction of discolored wood in Scots pine (*Pinus sylvestris*)[J]. *Tree Physiology*, 2002, 22(5): 331-338.

[12] CHOWDHURY M, HUSSAIN M D, CHUNG S O, et al. Agarwood manufacturing: A multidisciplinary opportunity for economy of Bangladesh: A review[J]. *Agricultural Engineering International: CIGR Journal*, 2016, 18(3): 171-178.

[13] 潘质洪. 白木香植物激素诱导结香解剖学及化学成分

的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2019.

[14] SUBASINGHE S M C U P, HITIHAMU H I D, FERNANDO K M E P. Use of two fungal species to induce agarwood resin formation in *Gyrinops walla*[J]. *Journal of Forestry Research*, 2019, 30(2): 721-726.

[15] FAIZAL A, AZAR A W P, TURJAMAN M, et al. *Fusarium solani* induces the formation of agarwood in *Gyrinops versteegii* (Gilg.) Domke branches[J]. *Symbiosis*, 2020, 81(1): 15-23.

[16] 宋晓琛, 黄桂华, 王西洋, 等. 无机盐、激素与真菌联合诱导土沉香抗逆能力的研究[J]. *植物研究*, 2019, 39(4): 505-513.

[17] 宋晓琛, 王西洋, 杨光, 等. 无机盐与激素混合对土沉香结香的诱导[J]. *林业科学*, 2020, 56(8): 121-130.

[18] 中国林业科学研究院热带林业研究所. 一种利用高压气体诱导土沉香结香的方法及其应用: CN202110159934. X[P]. 2022-04-01.

[19] 蔡海滨, 涂敏, 胡彦师, 等. 一种优化的橡胶树木质部石蜡切片制作方法[J]. *热带农业科学*, 2015, 35(6): 25-28.

[20] LI Y H, ZOU X B, SHEN T T, et al. Determination of geographical origin and anthocyanin content of black goji berry (*Lycium ruthenicum* Murr.) using near-infrared spectroscopy and chemometrics[J]. *Food Analytical Methods*, 2017, 10(4): 1034-1044.

[21] LIU Y X, QIAO M J, FU Y L, et al. Tissue structure changes of *Aquilaria sinensis* xylem after fungus induction[J]. *Forests*, 2022, 13(1): 43. doi: 10.3390/f13010043.

[22] 廖格, 赵美丽, 宋希强, 等. 整树结香法所产沉香的 GC-MS 分析[J]. *热带作物学报*, 2016, 37(2): 411-417.

[23] MA S, FU Y L, LI Y J, et al. The formation and quality evaluation of agarwood induced by the fungi in *Aquilaria sinensis*[J]. *Industrial Crops and Products*, 2021, 173: 114129. doi:10.1016/j.indcrop.2021.114129.

[24] 王之胤. 白木香树木中脂类物质形成的激素诱导研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2013.

[25] 江浩, 王祝年, 羊青, 等. 茉莉酸甲酯重复刺激对白木香所结沉香中沉香四醇含量的研究[J]. *热带作物学报*, 2018, 39(9): 1834-1840.

[26] 杨锦玲, 梅文莉, 董文化, 等. 3 种越南产沉香的 GC-MS 分析[J]. *热带作物学报*, 2015, 36(8): 1498-1504.

[27] HASHIM Y Z H Y, KERR P G, ABBAS P, et al. *Aquilaria* spp. (agarwood) as source of health beneficial compounds: A review of traditional use, phytochemistry and pharmacology[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2016, 189: 331-360.

[28] 丁哲远, 张文博, 李海潮, 等. 沉香鉴别方法及特征性成分检测研究进展[J]. *世界林业研究*, 2017, 30(5): 56-61.

[29] 全国木材标准化技术委员会. 沉香: GB/T 2904—2017 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2018.

【责任编辑 李晓卉】