

不同结香方法对土沉香木质部 芳香物质形成的影响

庞圣江^{1,2}, 周再知^{3*}, 李英健⁴, 张培¹, 李忠国^{5,6}, 邓硕坤¹

(1 中国林业科学研究院热带林业实验中心, 广西凭祥 532600; 2 南京林业大学, 南京 210037; 3 中国林业科学研究院热带林业研究所, 广州 510520; 4 广西大学, 南宁 530004; 5 广西友谊关森林生态系统国家定位观测研究站, 广西凭祥 532600; 6 崇左凭祥友谊关森林生态系统广西野外科学观测站研究站, 广西凭祥 532600)

摘要:以 12 年生土沉香人工林为研究对象, 通过设置钻孔、火烧孔和黄绿墨耳菌(*Melanotus flavolivens*)溶液诱导土沉香结香试验, 比较分析各处理的土沉香结香木质部变色范围, 淀粉和可溶性糖含量、醇溶性提取物、沉香四醇、挥发性香气成分方面的差异, 探讨不同结香方法对土沉香木质部芳香物质形成的影响, 为创新和优化土沉香结香技术提供理论参考。结果表明, (1) 黄绿墨耳菌溶液处理的土沉香木质部(沉香材部分)变色范围最大, 纵向变色距离最长达 120.02 cm, 横向变色距离最宽达 3.84 cm; 钻孔和火烧孔处理, 纵向变色距离均超过 110 cm, 但横向变色距离最宽仅为 0.58 cm 和 1.06 cm。(2) 3 种结香处理的土沉香木质部淀粉含量均显著低于 CK($P < 0.05$), 降幅范围在 24.82%~55.25%; 黄绿墨耳菌溶液和火烧孔处理的土沉香木质部可溶性糖含量均显著高于 CK($P < 0.05$), 钻孔与 CK 差异不显著($P > 0.05$)。(3) 钻孔、火烧孔和黄绿墨耳菌溶液处理土沉香的醇溶性提取物含量分别达到 11.84%、13.26% 和 21.08%, 均显著高于 CK($P < 0.05$); 沉香四醇含量分别达到 0.18%、0.26% 和 0.42%, 对照处理未检测出沉香四醇。(4) 钻孔、火烧孔和黄绿墨耳菌溶液处理的土沉香芳香物质中分别鉴定出 29 种、33 种和 36 种, 主要成分包括 2-(2-苯乙基)色酮及其衍生物、沉香螺醇、愈创木醇、香树烯、苄基丙酮、二氢卡拉酮、枯苏醇、 α -檀香醇和壬醛。说明黄绿墨耳菌溶液处理土沉香木质部变色范围最大, 淀粉含量消耗和可溶性糖增幅最大, 醇溶性提取物、沉香四醇含量及其芳香物质积累的效果最优。

关键词: 沉香; 香气; 结香技术; 土沉香; 气相色谱-质谱分析

中图分类号: Q949.9

文献标志码: A

Effect of Different Agarwood-induction Technique Treatments on the Formation of Aromatic Substances in Xylem of *Aquilaria sinensis*

PANG Shengjiang^{1,2}, ZHOU Zaizhi^{3*}, LI Yingjian⁴,
ZHANG Pei¹, LI Zhongguo^{5,6}, DENG Shuokun¹

(1 Experimental Center of Tropical Forestry, Chinese Academy of Forestry Sciences, Pingxiang, Guangxi 536000, China; 2 Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 3 Research Institute of Tropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Guangzhou 510520, China; 4 Guangxi University, Nanning 530004, China; 5 Guangxi Youyiguan Forest Ecosystem Research Station, Pingxiang, Guangxi 532600, China; 6 Youyiguan Forest Ecosystem Observation and Research Station of Guangxi, Pingxiang, Guangxi 536000, China)

收稿日期: 2023-02-18; 修改稿收到日期: 2023-06-25

基金项目: 中国林业科学研究院中央级院所基本业务费专项(CAFYBB2022MB004, CAFYBB2017MB020); 广西林业科技攻关项目(桂林科研[2022]第 2 号); 广东省林业科技创新项目(2017KJCX001)

作者简介: 庞圣江(1986—), 男, 博士研究生, 副研究员, 主要从事土沉香结香技术研究。E-mail: rlzxpang@126.com

* 通信作者: 周再知, 研究员, 博士生导师, 主要从事土沉香结香技术研究。E-mail: zzzhoucn@21cn.com

Abstract: Using 12-year-old *Aquilaria sinensis* plantation as the research subject, this study compares and analyzes the differences in the discoloration range at the xylem part, contents of starch and soluble sugars, alcohol soluble extracts, agarotetrol, and volatile aroma components induced by drill hole, red-hot iron drill bit and solutions of *Melanotus flavolivens* treatment. The aim is to explore the effects of different methods on the formation of aromatic substances in the xylem of *A. sinensis* and provide theoretical references for innovation and optimization the technologies of agarwood induction. The results showed that, (1) the largest discoloration range at xylem part was observed on treatment of *M. flavolivens* solutions, where the discoloration range could reach 120.02 cm in longitudinal and 3.84 cm in horizontal directions. Though the longitudinal discoloration range could exceed 110 cm for the other two treatments, the largest horizontal discoloration ranges were only 0.58 cm and 1.06 cm, respectively. (2) The starch contents in xylem of the three treatments were significantly lower than that of CK ($P < 0.05$), the decreased amount ranged from 24.82% to 55.25%. The soluble sugar contents of *M. flavolivens* solutions and red-hot iron drill bit treatments were significantly higher than that of CK, while significant difference was absent between drill hole and CK treatments. (3) The contents of alcohol soluble extracts were 11.84%, 13.26% and 21.08% for the treatments of drill hole, red-hot iron drill bit and solution of *M. flavolivens*. It was significantly higher than that of CK. The agarotetrol contents of the three treatments were 0.18%, 0.26% and 0.42%, respectively, and no agarotetrol was detected in CK. (4) There were 29, 33 and 36 aromatic substances in the *A. sinensis* of drill hole, red-hot iron drill bit and solution of *M. flavolivens* treatments, respectively. The main components mainly include 2-(2-phenylethyl) chromone and its derivatives, agarospirol, guaiol, aromadendrene, benzylacetone, dihydrokaranone, kusunol, α -santalol and non-anal. *A. sinensis* trees with injection of *M. flavolivens* solutions could induce the largest discoloration range, increase the contents of starch and soluble sugars and be beneficial for the accumulation of agarotetrol and aromatic substances.

Key words: agarwood; aroma; agarwood-induction techniques; *Aquilaria sinensis*; GC-MS

沉香是沉香属树种含有油脂的木质部分(俗称“结香”),也是沉香属树种遭遇伤害、真菌侵扰等外界胁迫,产生含有芳香气味用于抵御不良因素的次生代谢产物^[1]。沉香具有极高的经济价值,通常应用于高档香料、名贵药材、宗教用品和精细工艺雕刻用品;同时,沉香因其具有独特而优异的香韵气味,令人感觉愉悦舒适,在调节人体心理生理机能方面发挥着重要作用^[2]。沉香主要由具有挥发性芳香物质组成,包括色酮类、萜烯类和芳香族类化合物^[3-4]。健康的沉香属树种木质部呈白亮色,沉香有效成分少且香味不浓,香农通过利用打洞、砍伤和火烧等传统结香的方法,才能形成少量沉香。人工沉香无论色泽形态、香气活性成分均有别于天然沉香;采用不同的结香方法,沉香属树种结香木质部结构变化、沉香形成时间及其挥发性香气成分亦有差异,潘质洪^[5]研究认为激素处理有利于土沉香结香木质部变色面积扩大与芳香物质的积累;Liu等^[6]研究表明钻孔诱导土沉香结香,所结沉香品质相对稍好,但其产量低和结香时间长。一些诸如火烧可适当增加沉香产量^[7-8],采用激素、无机盐溶液混合处理,土沉香结香时间有所缩短且产量也相对较高^[9-10],沉香品

质仍然参差不齐。可见,尽管土沉香结香技术丰富多样,还需要继续积极创新和优化结香技术,才能实现生产量大质优的沉香,是人工种植土沉香的最终目的,也是沉香产业发展急需解决的一个重大难题。

土沉香(*Aquilaria sinensis*)木质部的变色范围作为沉香产量的重要指标,通常纵向变色距离较长而横向宽度较窄,淀粉和可溶性糖含量变化,与具有芳香气味的沉香物质形成密切相关^[9,11];醇溶性提取物直接决定沉香四醇含量,后者是沉香药材的优劣标志物,《中国药典》规定其不低于0.1%作为药用的质量指标^[12];土沉香结香木质部中的苯基丙酮、愈创木醇和2-(2-苯乙基)色酮等主要特征香气成分^[13],也已被用作沉香品质评价的重要依据。

试验以12年生土沉香人工林为研究对象,通过设置钻孔、火烧孔和黄绿墨耳菌(*Melanotus flavolivens*)溶液诱导土沉香结香试验,比较分析各处理的土沉香结香木质部变色范围,淀粉和可溶性糖含量、醇溶性提取物、沉香四醇、挥发性香气成分方面的差异,探讨不同结香方法对土沉香木质部芳香物质形成的影响,为创新和优化土沉香结香技术提供理论参考。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验地位于广西凭祥市热带林业实验中心夏石树木园附近的沉香种植基地(106°89'E, 22°11'N)。研究地气候条件为南亚热带季风气候, 年平均气温 21~23℃, 年平均降雨量 1 060~1 780 mm, 无霜期 344~362 d, 土壤为酸性红壤土, 为土沉香适宜栽培区。以 12 年生土沉香人工林为研究对象, 选取长势相对均匀, 无严重病虫害植株开展结香诱导处理。土沉香的平均胸径(15.86±0.86) cm、平均树高(7.78±0.26) m。

1.2 试验方法

2021 年 8 月以来, 选择晴朗天气, 在土沉香人工林试验地内, 设置钻孔、火烧孔和黄绿墨耳菌溶液诱导处理, 不处理作为对照组。采用完全随机区组排列, 每个区组各处理 10 株, 3 次重复, 共计 120 株。钻孔处理采用电钻(钻头直径 10 mm), 在土沉香树体基部 0.5 m 处直至距离树干的第一枝下高

处 0.5 m, 上下洞口相距 10 cm 处, 横向排列钻孔; 火烧孔处理则是用直径为 12 mm 的火烧钢钎, 铁锤辅助往土沉香树体钻孔; 1 L 黄绿墨耳菌溶液用大树营养液袋分装 2 袋, 以输液方式注入土沉香树体进行结香处理。2022 年 10 月, 即处理 12 个月后, 每个处理随机取样 5 株, 于土沉香树体钻孔上下 1~3 cm 处的凿取适量结香木质部, 取样后用锡箔纸包好拿回实验室自然晾干, 粉碎研磨成细粉末。每次称取过 40 目筛的沉香粉末, 检测相关指标。

1.2.1 土沉香木质部组织变色范围

土沉香经过打孔、火烧孔和菌液一定时间处理, 结香木质部有明显的含油性沉香物质, 且具有特殊的芳香气味, 浅色区(变色材)、深色区(沉香材)界限明显, 剥去树皮和白边材, 可直接初步判别土沉香木质部变色情况(图 1)。取样时, 土沉香剥皮和用勾刀刨去外围一部分白边材, 采用直尺和电子游标卡尺, 分别测量浅色区、深色区的横向宽度(处理孔为中心, 沿左、右方向的宽度)、纵向长度(处理孔为中心, 沿上、下方向的长度)^[9,11]。

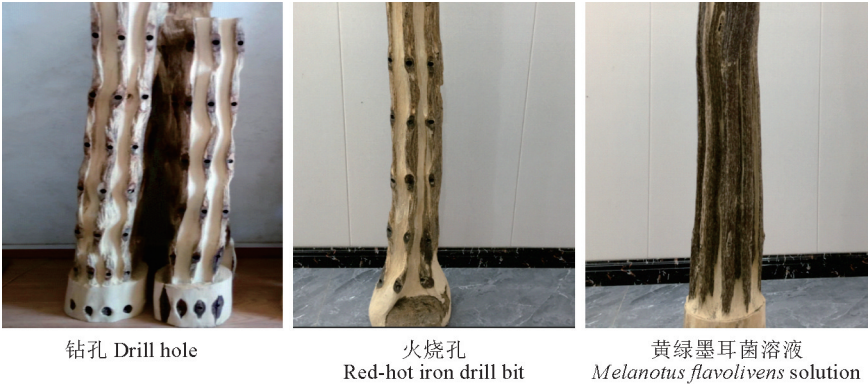


图 1 3 种结香技术获得的土沉香标本

Fig.1 A. *sinensis* samples obtained from three agarwood-induction technique treatments

1.2.2 淀粉和可溶性糖含量

取样前于土沉香钻孔上方 3.0~5.0 cm 处钻取结香木质部小木块, 锡箔纸包好放入液氮里速冻。当天将样品带回实验室, 用液氮磨成粉并置于-80℃温冰箱临时保存, 蒽酮-硫酸比色法和硝酸钙法测定淀粉和可溶性糖含量^[9]。

1.2.3 醇溶性提取物测定

根据林业行业标准 LY/T 2904—2017《沉香》方法^[14], 采用电子称准确取 2 g 沉香粉末, 用体积分数 95%乙醇(色谱纯)超声波提取 2 h, 静置 3~5 min 后, 过 0.45 μm 滤膜获取悬浮液, 重复提取 3 次, 待液体挥发至恒重, 称其质量计算醇溶性提取物含量^[15]。

1.2.4 沉香四醇和挥发性成分

按照 1.2.3 节操作步骤, 每次提取 10 mL 乙醇提取物, 溶剂挥发后用乙酸乙酯定容 2 mL, 过滤干燥后, 在广西大学林产品质量检测中心采用 GC-MS(日本岛津), DB-5ht 专用色谱柱(250 m×4.6 mm, 5 μm), 对待测样品进行沉香四醇和挥发性成分测定。

沉香四醇: 根据 2020 版《中华人民共和国药典》测定沉香四醇含量, 沉香四醇标准品浓度为 30 μg/mL(由中国食品药品检定研究院提供), 采用 LC-20A 液相色谱仪(日本岛津), 色谱柱: C18 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 检测沉香四醇含量。

挥发性成分: 称取 2 g 沉香粉末, 按步骤 1.2.3 节的操作获取乙醇提取物, 进行 GC-MS 上机检测

挥发性成分。色谱条件:升温程序,起始温度 90 ℃ 保持 1 min 后,以 5 ℃/min 升温至 150 ℃,保持 5 min;再以 5 ℃/min 的升速至 260 ℃,保持 10 min。进样口温度 250 ℃;载气为高纯 He(99.999%),载气流量 0.5 mL/min,进样量 1 μL,溶剂延迟 4 min。质谱条件:离子源接口温度为 250 ℃,电离方式 EI;电子能量 70 eV,质量扫描范围 35~350 m/z。

利用 GC-MS Postrun Analysis 软件,根据色谱峰的保留指数和质谱碎片信息检索 NIST 谱库(2014),确认化学成分。采用沉香四醇的保留时间作为基准,对 GC-MS 总离子流图和 HPLC 中的色谱峰进行保留时间校正,用中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件,寻找共有峰并计算峰面积^[16]。

1.3 数据处理

用 SPSS 20.0 对数据进行 ANOVA 方差分析, Duncan 法进行多重比较,用 Origin 2021 绘图。

表 1 土沉香木质部组织横向和纵向变色范围

处理 Treatment	横向变色宽度 Horizontal discoloration width/cm		纵向变色长度 Vertical discoloration length/cm	
	浅色区 Light colored area	深色区 Deep colored area	浅色区 Light colored area	深色区 Deep colored area
钻孔 Drill hole	0.42±0.08c	0.58±0.05c	106.42±8.03b	111.83±9.27a
火烧孔 Red-hot iron drill bit	0.96±0.14b	1.06±0.09b	128.24±6.25b	114.36±8.34a
黄绿墨耳菌溶液 <i>M. flavovirens</i> solution	2.71±0.23a	3.84±0.18a	145.65±6.14a	120.02±5.12a
对照组 CK	0	0	0	0

注:同一列相同字母表示无显著差异($P<0.05$)。
Note: The same letter in the same column indicates no significant difference ($P<0.05$).

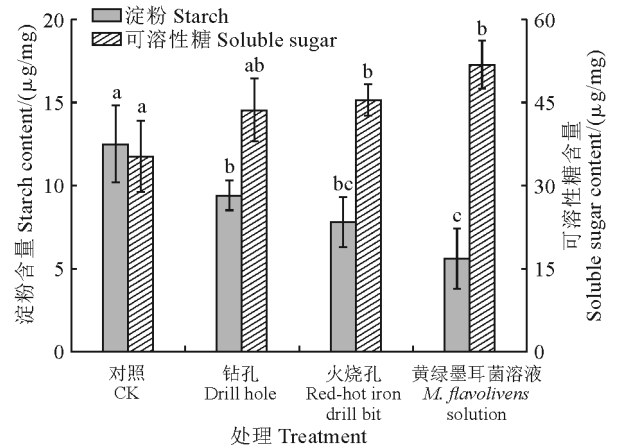
2.2 土沉香木质部组织淀粉和可溶性糖含量

从图 2 可以看出,3 种方法处理的土沉香结香木质部淀粉含量均显著低于 CK 处理($P<0.05$),降幅范围为 24.82%~55.25%;其中,黄绿墨耳菌溶液处理土沉香结香木质部淀粉含量降幅最大,火烧孔处理次之,钻孔处理降幅最小。此外,黄绿墨耳菌溶液和火烧孔处理土沉香结香木质部可溶性糖含量均显著高于 CK 处理($P<0.05$),钻孔处理与 CK 处理差异不显著($P>0.05$),三者涨幅范围为 23.76%~46.87%;其中,黄绿墨耳菌溶液处理土沉香结香木质部可溶性糖含量涨幅最大,火烧孔处理次之,钻孔处理涨幅最小,说明不同结香方法处理后,土沉香结香木质部淀粉出现不同程度的消耗,促进了可溶性糖转化积累,黄绿墨耳菌溶液处理效果最为明显。

2 结果与分析

2.1 土沉香木质部组织变色范围

从表 1 可以看出,3 种结香方法对土沉香结香木质部变色范围的影响各异,对照组土沉香木质部未结香均为白边材。从土沉香结香木质部变色大小范围来看,黄绿墨耳菌溶液处理>火烧孔处理>钻孔处理。
其中,黄绿墨耳菌溶液处理土沉香木质部(沉香材部分)变色范围最大,纵向变色距离最长达 120.02 cm,横向变色距离最宽达 3.84 cm,离输入孔越近深色区域范围越大。钻孔和火烧孔诱导土沉香木质部变色范围,持续存在没有规律性的变色材和沉香材;沉香材纵向变色距离均超过 110 cm,但横向变色距离最宽仅为 0.58 cm 和 1.06 cm,而后者变色范围优于前者处理。



柱状图上不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。下同。
图 2 土沉香木质部组织淀粉和可溶性糖含量
Different lowercase letters indicate significant differences among treatments ($P<0.05$). The same as below.
Fig. 2 Starch content and soluble sugar content of xylem tissue of *A. sinensis*

2.3 土沉香醇溶性提取物和沉香四醇含量

从图 3 可以看出,钻孔、火烧孔和黄绿墨耳菌溶液处理的土沉香样品醇溶性提取物含量分别达到 11.84%、13.26%和 21.08%,均显著高于对照处理 ($P<0.05$)。各方法诱导处理的所有土沉香样品醇提物含量在 11.84%~21.08%之间,均达到林业行业标准 LY/T 2904—2017《沉香》鉴定标准,但醇溶性提取物含量却各有差异。其中,黄绿墨耳菌溶液处理效果最优,与其他处理均存在显著差异 ($P<0.05$);钻孔和火烧孔处理的效果次之,二者之间的差异不显著 ($P>0.05$),说明黄绿墨耳菌溶液处理更有利于提高沉香醇溶性提取物含量。

3 种方法处理的沉香四醇含量分别达到 0.18%、0.26%和 0.42%,CK 处理未检测出沉香四醇。各诱导处理的所有沉香四醇含量在 0.18%~0.42%之间,均超过 2020 年版《中国药典》所规定的 0.1% 含量标准。根据沉香四醇含量高低顺序依次为黄绿墨耳菌溶液处理>火烧孔处理>钻孔处理,且各处理间存在显著差异 ($P<0.05$)。由此可见,黄绿墨耳菌溶液处理更有利于提高沉香四醇含量。

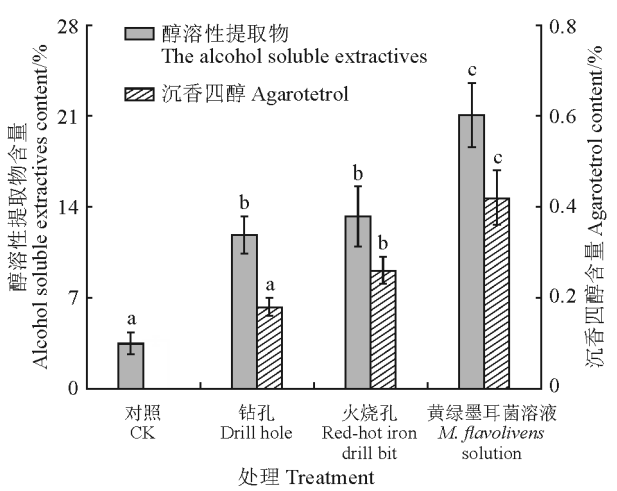


图 3 土沉香木质部组织醇溶性提取物和沉香四醇含量
Fig. 3 The alcohol soluble extractive content and agarotretol content of xylem tissue of *A. sinensis*

2.4 土沉香香气挥发性成分

通过 GC/MS 方法分析结果发现,3 种方法处理的土沉香结香木质部芳香物质形成过程中,共鉴定出 46 种主要挥发性香气成分(表 2)。

表 2 结香诱导处理所得土沉香主要挥发性香气成分

Table 2 The main volatile aroma components of *A. sinensis* obtained by agarwood-induction technique treatments

编号 No.	成分 Component	气味描述 Odor description	相对峰面积 Relative peak area/%		
			钻孔 Drill hole	火烧孔 Red-hot iron drill bit	黄绿墨耳菌溶液 <i>M. flavovirens</i> solution
1	圆柚酮 Nootkatone	柚子清甜果香 Grapefruit is sweet and fruity	0.52	0.58	—
2	间二甲苯 <i>m</i> -xylene	甜香 Sweet	—	—	0.37
3	榄香素 Elemicin	甜果香 Sweet fruit aromas	1.43	2.12	—
4	α -蒎烯 α -pinene	松木香 Rosin	—	—	0.11
5	丁酸丁酯 <i>n</i> -butyl butyrate	甜香 Sweet	—	—	0.45
6	α -石竹烯 α -caryophyllene	辛香,木质香,柑橘香和樟脑香 Spicy, woody, citrus, camphoreous	0.41	0.94	1.82
7	柠檬烯 Cinene	柠檬香 Lemon	—	0.18	—
8	苯甲醛 Benzaldehyde	杏仁味,木质和坚果香 Almond, woody, nutty aromas	1.08	1.34	2.06
9	壬醛 Nonanal	甜香 Sweet	2.08	1.55	2.81
10	4-叔丁基间二甲苯 4-tert-butyl <i>m</i> -xylene	甜香 Sweet	0.85	1.03	0.42
11	3,11-芹子二烯-9-酮 Seline-3,11-dien-9-one	柠檬香,微刺鼻清香 Lemon, fresh	—	0.17	—
12	苯基丙酮 Benzylacetone	花香,草香和茉莉香 Floral, herbaceous, jasmine aromas	5.47	4.23	6.82
13	4-苯基-2-丁酮 4-phenyl-2-butanone	果香,花香和药草香 Fruity, floral, medicinal	1.59	1.48	2.54
14	β -榄香烯 β -elemene	柠檬香,甜乳香 Lemon, milk aromas	—	—	0.11
15	1,5-二苯基-3-戊酮 1,5-diphenyl-3-pentanone	沉重、发霉的木质气味 Strong moldy wood smell	0.18	0.36	0.84
16	香木兰烷 Aromadendrane	花香,木兰香 Flower, magnolia flower aroma	—	—	0.34
17	二氢沉香呋喃 Dihydroagarofuran	木质和坚果香 Woody, nutty aromas	—	—	0.45
18	香树烯 Alloaromadendrene	橙甜香 Orange-like aromas	5.49	5.24	2.83

续表 2 Continued table 2

编号 No.	成分 Component	气味描述 Odor description	相对峰面积 Relative peak area/%		
			钻孔 Drill hole	火烧孔 Red-hot iron drill bit	黄绿墨耳菌溶液 <i>M. flavolivens</i> solution
19	环氧异香橙烯 Isoaromadendrene epoxide	橙香 Orange-like aromas	0.48	0.51	0.76
20	9,10-脱氢异长叶烯 9,10-dehydro-isolongifolene	木质香和龙涎香 Woody, ambergris	—	—	0.13
21	依兰烯 Ylangene	树兰花香 Magnolia flower aroma	—	—	0.16
22	长叶烯 Longifolene	松木香 Rosin	—	0.26	—
23	α -布藜烯 α -bulnesene	木质香 Woody	—	—	0.15
24	β -朱栾 β -vatirenene	橙香 Orange-like aromas	0.08	—	0.11
25	α -姜黄烯 α -curcumene	温和的辛香 warm, spicy	—	0.21	—
26	愈创木-4,11-二烯 Guaiacol-4,11-diene	木质香,药草香 Woody, medicinal	—	0.12	0.19
27	喇叭茶醇 Palustrol	茶香乳香 Tea and milk aromas	0.17	0.09	—
28	α -檀香醇 α -santalol	柔和的檀木香 Soft sandalwood	2.81	3.05	2.06
29	枯苏醇 Kusunol	木质香和烟熏 Woody, burnt	3.59	4.26	2.82
30	愈创木醇 Guaiacol	木质香,花香和樟脑 Woody, floral fragrance, camphoreous	6.34	7.45	8.32
31	沉香螺醇 Agarospirol	木质香,坚果香和烟熏 Woody, nutty aromas, burnt	7.35	8.67	8.56
32	矛苍术醇 Hinesol	药草香 Medicinal	0.34	0.48	0.93
38	缬草烯醛 Valerenal	果香,淡花香 Fruity, light flower aromas	—	—	0.68
33	二氢卡拉酮 Dihydrokaranone	木质香 Woody	5.28	5.52	3.06
34	白木香醛 Baimuxinal	木质香,药草香 Woody, medicinal	2.05	1.61	1.43
35	油酸 Oleic acid	微酸臭气味 Slightly sour odor	—	—	0.37
36	硬脂酸 Stearic acid	脂肪气味 Fat odor	—	—	0.62
37	缬草-4,7(11)-二烯 Valerena-4,7(11)-diene	淡花香 Light flower aromas	1.34	1.28	0.86
39	2-(2-苯乙基)色酮 2-(2-phenylethyl) chromone	木质和坚果香 Woody, nutty aromas	8.46	9.77	12.06
40	2-[2-(4-甲氧基)苯乙基]色酮 2-[2-(4-methoxy) phenylethyl] chromone	木质和坚果香 Woody, nutty aromas	2.17	2.04	3.85
41	2-[2-(4-羟基)苯乙基]色酮 2-[2-(4-hydroxy) phenylethyl] chromone	木质和坚果香 Woody, nutty aromas	1.32	1.06	1.64
42	6-甲氧基-2-(2-苯乙基)色酮 6-methoxy-2-(2-phenylethyl) chromone	木质和坚果香 Woody, nutty aromas	4.45	3.71	4.32
43	雅榄酮 Eremephilone	木质和坚果香 Woody, nutty aromas	0.83	0.75	1.08
44	三十碳六烯 Squalene	轻微令人愉快的气味 Green fresh	0.26	0.47	0.65
45	γ -谷甾醇 γ -sitosterol	几乎无味 Almost tasteless	0.12	0.16	—
46	γ -扶桑甾醇氧化物 γ -sitostenone	几乎无味 Almost tasteless	0.25	0.23	—

钻孔处理土沉香芳香物质中共鉴定出 29 种成分,占总峰面积的 66.79%;主要成分包括色酮及其衍生物(16.40%)、沉香螺醇(7.35%)、愈创木醇(6.34%)、香树烯(5.49%)、苜基丙酮(5.47%)、二氢卡拉酮(5.28%)和枯苏醇(3.59%)。火烧孔处理土沉香芳香物质中共鉴定出 33 种成分,占总峰面积的 70.92%;主要成分是色酮及其衍生物(16.58%)、沉香螺醇(8.67%)、愈创木醇(7.45%)、二氢卡拉酮(5.52%)、香树烯(5.24%)、枯苏醇(4.26%)、苜基丙酮(4.23%)和 α -檀香醇(3.05%)。黄绿墨耳菌溶

液处理土沉香芳香物质中共鉴定出 36 种成分,占总峰面积的 76.78%;主要成分是色酮及其衍生物(21.87%)、沉香螺醇(8.56%)、愈创木醇(8.32%)、苜基丙酮(6.82%)、二氢卡拉酮(3.06%)、香树烯(2.83%)、枯苏醇(2.82%)和壬醛(2.81%)。

3 讨 论

本研究中钻孔、火烧孔和黄绿墨耳菌溶液处理,对土沉香结香木质部变色范围的影响各异;其中,以黄绿墨耳菌溶液处理的变色范围最大,深色区(沉香

材)纵向变色距离最长达 120.02 cm,横向变色距离最宽达 3.84 cm。钻孔或火烧孔的变色范围较小,属于没有规律性的沉香材。这与其他方法的土沉香结香,出现类似心材变色现象有一定相似性^[9,17],尤其是菌液处理之后通过蒸腾作用,向上输导所引起土沉香树体防御反应,更有利于木质部芳香物质的积累。有学者研究认为,有色物质大多数来源于含氧酚羟基或者碳基,这些助色自由基与土沉香结香木质部变色有密切关系,主要通过淀粉代谢经由可溶性糖类化合物转化而来^[18-19]。

本研究表明,3 种方法处理土沉香结香木质部淀粉和可溶性糖含量(除钻孔)均显著低于 CK 处理($P<0.05$)。其中,菌液处理的淀粉含量降幅最大,火烧孔处理次之,钻孔处理降幅最小;可溶性糖含量在这些组织结构内增加,增幅则相反之。前人研究认为可能与人工诱导土沉香树体所产生的生理响应有关^[20-21],木质部淀粉加速转化为可溶性糖,增强自身代谢能力,利于具有芳香气味的物质形成以抵御外界胁迫。

3 种方法处理土沉香的醇溶性提取物含量分别达到 11.84%、13.26%和 21.08%,显著高于 CK 处理($P<0.05$)。也高于半截干或接菌处理 1 年左右土沉香^[22],通体结香技术处理为 11.15%~24.02%^[23],与本研究结果基本一致,说明不同方法处理土沉香的醇溶性提取物含量各有差异。3 种方法处理的沉香四醇含量分别达到 0.18%、0.26%和 0.42%,这与其他人工促进土沉香结香,检测的沉香四醇含量无明显差别^[24]。总体上来看,本研究 3 种方法处理 1 年后,沉香四醇含量均超过 0.1%的药用标准,这可能与土沉香结香的时间有关,积累时间越长沉香品质才更优质。

研究显示,3 种方法处理的土沉香结香木质部芳

香物质主要是色酮及其衍生物(16.40%~21.87%)、沉香螺醇(7.35%~8.56%)、愈创木醇(6.34%~8.32%)、香树烯(2.83%~5.49%)、苜基丙酮(4.23%~6.82%)、二氢卡拉酮(3.06%~5.52%)和枯苏醇(2.82%~4.26%)。而采用生物接菌、火烧和化学刺激法诱导处理^[25-27],所得沉香螺旋醇、沉香呋喃、白木香醛、苜基丙酮、对甲氧基苜基丙酮和矛苍术醇是沉香主要芳香物质,与本研究结果有所差异。与 2-[2-(4-甲氧基苜基)乙基]色酮、沉香螺醇、愈创木二烯-15-醛、二氢卡拉酮和雪松醇是马来沉香(*A. malaccensis*)主要芳香物质也有一定区别^[28-29]。可见,土沉香结香木质部芳香物质的化学成分及其相对含量方面的差异,可能与沉香属树种、结香方法、结香时长和遗传因素存在密切关联^[30-31]。

土沉香结香木质部芳香物质中,色酮及其他衍生物、沉香螺醇、二氢卡拉酮和枯苏醇带有木质和坚果香气,是最具有强烈的芳香活性成分之一。这与马来沉香、近全缘沉香(*A. subintegra*)和柯拉斯那沉香(*A. crassna*)挥发性香气成分研究结果^[32]相似,是土沉香芳香物质的重要成分。另外,一些诸如白木香醛、二氢沉香呋喃、雅榄酮、缬草烯醛、愈创木-4,11-二烯和 α -布藜烯等低浓度香气物质,也有助于提升沉香香韵气味。3 种方法处理土沉香所含的苜基丙酮、榄香素、4-苜基-2-丁酮、缬草-4,7(11)-二烯和香木兰烷的香气贡献率也比较大,甜果香、花香和药草香归因于该类物质存在;壬醛、环氧异香橙烯、香树烯、丁酸丁酯、4-叔丁基间二甲苯和间二甲苯是甜香的主要香气来源,说明沉香香气是不同挥发性成分的气味物质之间的平衡。

参考文献:

[1] 庞圣江,周再知,黄桂华,等. 沉香香气物质研究进展[J]. 世界林业研究, 2022, **35**(5): 59-64.
PANG S J, ZHOU Z Z, HUANG G H, *et al.* Research progress in agarwood aroma substances[J]. *World Forestry Research*, 2022, **35**(5): 59-64.

[2] 洪 蓉,金幼菊. 日本芳香生理心理学研究进展[J]. 世界林业研究, 2001, **14**(3): 61-66.
HONG R, JIN Y J. The advances of research on aromachology in Japan[J]. *World Forestry Research*, 2001, **14**(3): 61-66.

[3] ZHANG N N, XUE S Y, SONG J, *et al.* Effects of various artificial agarwood-induction techniques on the metabolome of *Aquilaria sinensis*[J]. *BMC Plant Biology*, 2021, **21**(1): 591.

[4] DONG M Y, DU H T, LI X L, *et al.* Discovery of biomarkers and potential mechanisms of agarwood incense smoke intervention by untargeted metabolomics and network pharmacology[J]. *Drug Design, Development and Therapy*, 2022, **16**: 265-278.

[5] 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.

[6] 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): 3 086-3 106.

[7] 梅文莉,左文健,杨德兰,等. 沉香结香机理、人工结香及其化学成分研究进展[J]. 热带作物学报, 2013, **34**(12): 2 513-2 520.
MEI W L, ZUO W J, YANG D L, *et al.* Advances in the mechanism, artificial agarwood-induction techniques and chemical constituents of artificial agarwood production[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2013, **34**(12): 2 513-2 520.

[8] SAW PENG C, OSMAN M F, NURI N B E A, *et al.* Production

- of agarwood resin in *Aquilaria beccariana* using inducement technology[J]. *Journal of Agrobiotechnology*, 2021, **12**(1): 57-67.
- [9] 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.
- SONG X C, WANG X Y, YANG G, *et al.* Mechanism of agarwood formation under the induction of both inorganic salts and hormones[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2020, **56**(8): 121-130.
- [10] WU Z Q, LIU S, LI J F, *et al.* Analysis of gene expression and quality of [J]. *Journal of Tropical Forest Science*, 2017, **29**(3): 380-388.
- [11] 刘高峰,周再知,黄桂华,等. 氮气诱导土沉香结香及挥发性成分分析[J]. 热带作物学报, 2023, **44**(3): 638-646.
- LIU G F, ZHOU Z Z, HUANG G H, *et al.* Analysis of agarwood formation and volatile components of *Aquilaria sinensis* induced by nitrogen gas[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2023, **44**(3): 638-646.
- [12] 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, 2020, 190-192.
- [13] YAN T T, HU Z K, CHEN Y, *et al.* The key odor-active components differed in cultured agarwood from two germplasms of *Aquilaria sinensis* trees[J]. *Industrial Crops and Products*, 2023, **194**: 116-185.
- [14] 国家林业局. LY/T 2904—2017 沉香[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018.
- [15] 李志宏,张宁南,徐大平,等. 盐胁迫对土沉香中沉香四醇和 2-(2-苯乙基)色酮含量的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2023, **51**(8): 29-40.
- LI Z H, ZHANG N N, XU D P, *et al.* Effects of salt stress on contents of agarotetrol and 2-(2-phenylethyl) chromone [J]. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 2023, **51**(8): 29-40.
- [16] 晏婷婷,陈媛,王茜,等. 液相色谱-质谱结合化学计量学用于国产沉香品质分析[J]. 木材工业, 2019, **33**(6): 14-18.
- YAN T T, CHEN Y, WANG Q, *et al.* Quality analyses of domestic agarwood (*Aquilaria sinensis*) in China by LC-MS combining with chemometrics[J]. *China Wood Industry*, 2019, **33**(6): 14-18.
- [17] ZIEGLER H. Biological aspects of heartwood formation[J]. *Holz als Roh-und Werkstoff*, 1968, **26**(2): 61.
- [18] 诸葛强,黄敏仁,潘惠新,等. 杨树湿心材的化学特性及形成机理研究[J]. 林业科学, 1997, **33**(3): 259-266.
- ZHUGE Q, HUANG M R, PAN H X, *et al.* Study on chemical characteristics and formation mechanism of poplar wet heartwood [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 1997, **33**(3): 259-266.
- [19] 徐维娜. 真菌侵染诱导沉香形成关键技术效果评价及结香机制初步研究[D]. 广州: 广东药学院, 2011.
- [20] 李明月,沈华杰,何海珊,等. 白木香解剖构造及提取物化学成分分析[J]. 西南林业大学学报(自然科学), 2017, **37**(5): 208-213.
- LI M Y, SHEN H J, HE H S, *et al.* Anatomic structure and extracted chemical component content of *Aquilaria sinensis* [J]. *Journal of Southwest Forestry University (Natural Sciences)*, 2017, **37**(5): 208-213.
- [21] PENG C, RAHIM K A, AWANG M R. Histology study of *Aquilaria malaccensis* and the agarwood resin formation under light microscope [J]. *Journal of Agrobiotechnology*, 2014, **35**(5): 42-46.
- [22] 刘洋洋,杨云,魏建和,等. 不同产地通体香沉香药材的质量分析[J]. 中国现代中药, 2014, **16**(3): 183-186.
- LIU Y Y, YANG Y, WEI J H, *et al.* Analysis on the quality of agarwood produced via the whole-tree agarwood-inducing technique in different area [J]. *Modern Chinese Medicine*, 2014, **16**(3): 183-186.
- [23] 李远彬,王羚郦,邓幸运,等. 沉香的醇浸出物和沉香四醇含量测定及品质分类[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, **23**(15): 70-75.
- LI Y B, WANG L L, DENG X Y, *et al.* Investigating and exploring content of alcohol soluble extractives and agarotetrol in agarwood and its quality classification method [J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2017, **23**(15): 70-75.
- [24] 顾宇凡,张倩,霍会霞,等. HPLC-DAD 测定沉香药材中沉香四醇的含量[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2014, **16**(12): 2 643-2 646.
- GU Y F, ZHANG Q, HUO H X, *et al.* Quantitative determination of agarotetrol in agarwood by HPLC-DAD [J]. *Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology*, 2014, **16**(12): 2 643-2 646.
- [25] ZHANG Z, WEI J H, HAN X M, *et al.* The sesquiterpene biosynthesis and vessel-occlusion formation in stems of *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg trees induced by wounding treatments without variation of microbial communities[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, **15**(12): 23 589-23 603.
- [26] ISHIHARA M, TSUNEYA T, UNEYAMA K. Fragrant sesquiterpenes from agarwood [J]. *Phytochemistry*, 1993, **33**(5): 1 147-1 155.
- [27] MEIER M, KOHLENBERG B, BRAUN N A. Isolation of anisyl acetone from agarwood oil [J]. *Journal of Essential Oil Research*, 2003, **15**(1): 54-56.
- [28] 孙雨安,于文浩,王国庆,等. 进口沉香挥发性成分的 HS-GC-MS 分析[J]. 轻工学报, 2019, **34**(2): 63-70.
- SUN Y, YU W H, WANG G Q, *et al.* HS-GC-MS analysis of volatile components in imported agarwood [J]. *Journal of Light Industry*, 2019, **34**(2): 63-70.
- [29] TIBPROMMA S, ZHANG L, KARUNARATHNA S C, *et al.* Volatile constituents of endophytic fungi isolated from *Aquilaria sinensis* with descriptions of two new species of *Nemania* [J]. *Life*, 2021, **11**(4): 363.
- [30] 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.
- [31] XIANG P, DONG W H, CAI C H, *et al.* Three new dimeric 2-(2-phenylethyl) chromones from artificial agarwood of *Aquilaria sinensis* [J]. *Natural Product Research*, 2021, **35**(21): 3 592-3 598.
- [32] PRIPDEEVECH P, KHUMMUENG W, PARK S K. Identification of odor-active components of agarwood essential oils from Thailand by solid phase microextraction-GC/MS and GC-O [J]. *Journal of Essential Oil Research*, 2011, **23**(4): 46-53.