

促白木香结香真菌的快速筛选

刘闯, 周国英, 刘君昂*

中南林业科技大学生命科学与技术学院 南方人工林病虫害防控国家林业局重点实验室 森林有害生物防控湖南省重点实验室 经济林培育与保护 教育部重点实验室, 湖南 长沙 410004

摘 要: 以海南省澄迈县海南科大林业公司所有的白木香人工林地为研究对象, 采用前期已分离的菌株对白木香白木进行固体催化, 利用 GC-MS 技术对具有催化效果(白木化学成分在催化前后变化显著)的菌株进行筛选, 将筛选出的菌株接种至白木香树体中, 6 个月后对沉香物质挥发油以及化学成分进行测定。对白木固体催化产物的提取物分析, 鉴定出其乙醚提取物共 24 种化学成分, 其中共有成分 5 种、芳香族类化合物 6 种、其他类化合物 18 种。*Trichoderma* sp.、*Neurospora* sp. 和 *Melanotus flavolivens* 这 3 种菌株使白木香白木的化学成分发生显著变化。对结香处理 6 个月后已结香木材的提取物分析, 鉴定出其乙醚提取物共 84 种化学成分, 其中共有成分 30 种, 芳香族类化合物 17 种、倍半萜类化合物 34 种和其他类化合物 33 种。*Trichoderma* sp.、*Neurospora* sp.、*Melanotus flavolivens* 和 CK 样品乙醚提取物得率分别为 3.62%、4.04%、3.97%和 1.94%。其中芳香族类成分相对含量之和分别为 15.15%、17.29%、12.13%和 7.95%。倍半萜类成分相对含量之和分别为 10.61%、11.19%、11.4%和 0%。在 6 个月内 *Trichoderma* sp.、*Neurospora* sp. 和 *Melanotus flavolivens* 这 3 种经过白木香白木固体催化筛选所得的菌株能够有效诱导白木香结香。

关键词: 白木香; 结香方法; 促结香真菌; GC-MS

[引用本文] 刘闯, 周国英, 刘君昂, 2022. 促白木香结香真菌的快速筛选. 菌物学报, 41(10): 1558-1571

Liu C, Zhou GY, Liu JA, 2022. Rapid screening of fungi that promote the production of agarwood in *Aquilaria sinensis*. Mycosystema, 41(10): 1558-1571

基金项目: “十三五”国家重点研发计划子课题(2016YFD0600601-1); 海南省科研院所技术创新专项(jscx202028)

Supported by the Sub-projects of the 13th Five-Year National Key R&D Plan (2016YFD0600601-1) and Technological Innovation Special Project of Research Institutes of Hainan Province (jscx202028).

*Corresponding author. E-mail: kjc9620@163.com

Received: 2022-01-22, accepted: 2022-03-14

Rapid screening of fungi that promote the production of agarwood in *Aquilaria sinensis*

LIU Chuang, ZHOU Guoying, LIU Jun'ang*

College of Life Science and Technology, Central South University of Forestry and Technology, Southern Plantation Forest Pest Prevention and Control State Forestry Administration Key Laboratory, Hunan Provincial Key Laboratory of Forest Pest Control, Economic Forest Cultivation and Protection Ministry of Education Key Laboratory, Changsha 410004, Hunan, China

Abstract: Taking the *Aquilaria sinensis* plantation owned by the HAINAN KEDA Forestry Co., Ltd. in Chengmai County, Hainan Province as experimental woodland, the solid catalysis of (*Aquilaria sinensis*) was carried out by using the fungal strains isolated previously, and GC-MS technology was used to screen out the strains having catalytic effect. It is found that the chemical composition of agarwood changes significantly after catalysis. The screened strains with catalytic effect were inoculated to the *Aquilaria sinensis*, and the volatile oil and chemical components of agarwood were determined in 6 months after inoculation. The analysis of the extracts of the solid catalytic products of resinated wood showed that there were 24 chemical constituents in the ether extract, including 5 constituents in common, 6 aromatic compounds and 18 other compounds. The three strains, *Trichoderma* sp., *Neurospora* sp. and *Melanotus flavolivens*, significantly changed the chemical composition of agarwood. The analysis of the extracts of the incense wood in 6 months after treatment showed that there were a total of 84 chemical components in the ether extract, including 30 components in common, 17 aromatic compounds, 34 sesquiterpenoids compounds and 33 other compounds. The extraction rate of ether extract of the samples treated with *Trichoderma* sp., *Neurospora* sp., *Melanotus flavolivens* and CK samples were 3.62%, 4.04%, 3.97% and 1.94%, respectively. The sums of relative content of aromatic components were 15.15%, 17.29%, 12.13% and 7.95%, respectively. The sums of relative content of sesquiterpenoids were 10.61%, 11.19%, 11.4% and 0%, respectively. *Trichoderma* sp., *Neurospora* sp. and *Melanotus flavolivens* screened through solid catalysis of resinated wood can effectively induce *Aquilaria sinensis* to generate agarwood within 6 months.

Keywords: *Aquilaria sinensis*; aroma-forming method; aroma-promoting fungus; GC-MS

我国沉香主要来源于白木香 *Aquilaria sinensis* (Lour). Gilg (博立国 1991)。随着沉香药用价值的发掘和收藏价值的增高,其野生资源以灭绝式开采,沉香出现供不应求的景象。为了获得沉香,人们开始越来越多地人工种植白木香,现白木香人工林已成规模(Angela *et al.* 2002),但真正高效的结香技术却几近空白,人们开始探索快速有效的结香技术。目前人工结香主要集中在 3 个方面:物理结香(半断干、砍伤及凿洞等)、化

学结香(氯化钠、亚硫酸氢钠及氯化亚铁等)和真菌结香(杨影等 2021)。沉香的主要活性化学成分是芳香族类化合物和 2-(2-苯乙基)色酮类化合物以及倍半萜类化合物(刘欣怡等 2022),在评定沉香质量时,无论是国际或是国内,通常以主要活性化合物中的一种或多种化学物质为特征成分来分级。白木香树体结香可由多种真菌来促进,但在不同的生长环境下其促进效果表现不尽相同,现有文献报道主要是直接用菌株促进白

木香树结香(谭小明等 2018; 刘闯 2021), 尚未见对沉香进行不同预结香处理之后, 而采集树体表面及变色木质部真菌对白木香树结香的相关报道。

通过前期的白木香预处理结香试验, 从白木香树体表面以及木质部分离纯化出疑似促结香菌株(张秀环等 2009)。为了得到能够快速促进白木香产生沉香的菌株, 本研究进行了所得菌株催化白木香白木以及人工接种所得菌株菌丝体至成年白木香树体等相关试验, 分析了白木香白木固体催化试验中产生的新成分的变化以及人工真菌接种试验中所得沉香的化学成分, 所得沉香质量通过 GC-MS 技术科学评价。探讨高速有效的白木香结香技术, 旨在促进国内蓬勃发展的沉香种植业, 扩展促结香真菌库(刘闯 2021)。

1 材料与方法

1.1 试验地概况、植物材料和菌种

试验地位于海南科大林业公司白木香人工纯林(E19°11', N111°1')。试验地为热带季风气候, 年均气温 23.8 °C, 年均日照时数 2 059 h, 年均降雨量 1 786.1 mm, 终年基本无霜, 土壤以砖红壤为主(刘闯 2021)。

植物材料选取 7 年生、胸径 10–15 cm 的白木香树, 平均树高为 5–6 m, 平均冠幅为 2–2.5 m; 黄绿墨耳 *Melanotus flavolivens* 购自中国科学院菌种保藏中心。

1.2 白木香固体催化

前期研究筛选得到 5 株菌株, *Trichoderma* sp.: LV、*Neurospora* sp.: H、*Fusarium* sp.: CX6-3(1)、*Lasiodiplodia* sp.: CX3-CK-1 和 *Talaromyces* sp.: CX5-1(1)-1。黄绿墨耳(HLME)为已知能诱导白木香结香的促结香真菌, 作为阳性对照。从菌板刮取适量菌丝, 放入 5 mL 离心管, 加无菌水至 5 mL, 振荡 5 min。称量白木香白木屑干重 40 g, 放入聚丙烯食用袋中, 然后

加入 60 mL 蒸馏水充分搅匀, 胶圈封口, 121 °C 灭菌 30 min。待冷却后在超净工作台上加入菌悬液至催化袋中并打孔, 放入恒温培养箱, 26 °C 进行 38 d 催化实验, 没有加入菌悬液的催化袋为阴性对照, 记 CK1(刘闯 2021)。

使用冰水浴超声波提取法进行白木香固体催化产物挥发油的提取。分别称取催化后各木屑湿重 3 g 置 50 mL 离心管中, 加入 15 mL 乙醚萃取 30 min, 然后静置 5 min, 过滤得到乙醚提取液, 重复萃取 3 次, 合并提取液, 放在通风橱挥发干后称重, 计算挥发油含量。质谱与色谱条件参考刘闯(2021)的方法。

1.3 促结香真菌诱导白木香结香

通过白木香固体催化试验, 得到了具有催化效果的 LV、H 和 HLME 3 株菌株, 将其分别接种于各液体培养基中, 26 °C 恒温摇床培养 7 d。过滤菌丝, 将菌悬液装入无菌输液袋中, 加蒸馏水至 1 000 mL; 输液袋中只加入蒸馏水 1 000 mL 作为对照组, 记 CK2, 每组设置 5 个重复。在林地中选择胸径为 10–15 cm 的成年树, 在距离地面约为 1 m 的地方对称斜向下打孔, 标记为人工接种口(图 1)。选择无雨天气, 进行人工接种。接种 6 个月后, 在接种口上下方取长度≈10 cm 和厚度≈2 cm 的扇形圆盘 2 个。刮去未结香木质部与腐殖部位(图 2), 将所留变色木材研磨成粉, 超低温保藏备用(刘闯 2021)。

挥发油提取法以及质谱与色谱条件参考刘闯(2021)的方法。

2 结果与分析

2.1 真菌催化白木香木屑能产生某些沉香前体物

根据 LV、H、HLME、CK1、CX6-3(1)、CX3-CK-1 和 CX5-1(1)-1 的 GC-MS 总离子流(图 3), 其乙醚提取物得率分别为 2.43%、2.74%、3.02%、1.89%、2.31%、2.93%和 2.61%。将总离子流图中的各峰经质谱计算机数据系统检索

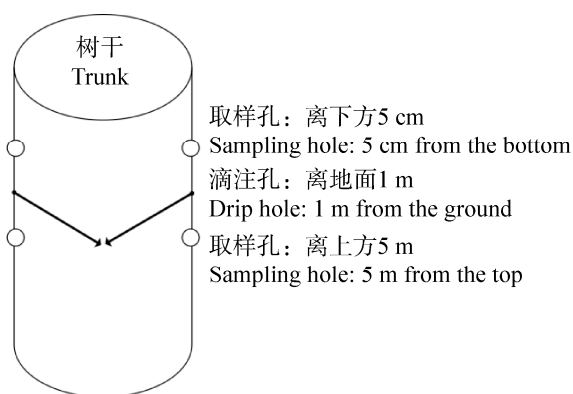


图 1 取样位置图

Fig. 1 Sampling location map.



图 2 沉香样品图 LV: 木霉属菌株侵染白木香树体结果图; H: 脉孢霉菌株侵染白木香树体结果图; HLME: 黄绿墨耳菌株侵染白木香树体结果图; CK1: 空白对照

Fig. 2 Agarwood samples. LV: *Trichoderma* sp. infecting *Aquilaria sinensis* trees; H: *Neurospora* sp. infecting *A. sinensis* trees; HLME: *Melanotus flavolivens* infecting *A. sinensis* trees; CK1: Blank control.

及核对 Nist11 标准质谱图, 参考有关沉香化学成分多个参考文献和历来相关研究的鉴定方法, 利用峰面积归一化法测定其化学成分的相对百分含量。通过人工解析鉴定, 共鉴定出 24 种化学成分(表 1), 其中芳香族类化合物 6 种, 其他类化合物 18 种, 共有化学成分只有 5 种。主成分分析(PCA)结果(图 4)也表明, 7 组样品的乙醚提取物有很大差异。其乙醚提取检出物占总相对百分含量分别为 31.74%、21.86%、20.60%、13.43%、15.88%、19.51%和 18.72%, 其中芳香族类成分相对含量之和分别为 15.21%、12.99%、13.26%、8.22%、9.61%、12.19%和 10.17%。

2-甲基-3-戊醇、十二烷-2-基苯、邻苯二甲

酸二丁酯、硬脂酸和反式角鲨烯这 5 种化学成分是 7 组乙醚提取物的共有成分。2-甲基-3-戊醇这一小分子化合物可能是沉香 3 大主要活性化学成分的前体物质; 在生物体内, 十二烷-2-基苯侧链可被氧化成醇进而变为羧酸, 很可能是沉香倍半萜类的前体物质。己二酸二(2-乙基己)酯、2,6-二叔丁基对甲苯酚、2,6-二异丙基苯基特戊酸酯和单硬脂酸甘油酯这 4 种物质为 LV、H、HLME、CX6-3(1)、CX3-CK-1 和 CX5-1(1)-1 共有而 CK1 没有的化学成分。

2.2 促结香真菌能诱导白木香产生沉香

LV、H、HLME 和 CK2 的 GC-MS 总离子流见图 5, 其乙醚提取物得率分别为 3.62%、4.04%、3.97%和 1.94%。共鉴定出 84 种化学成

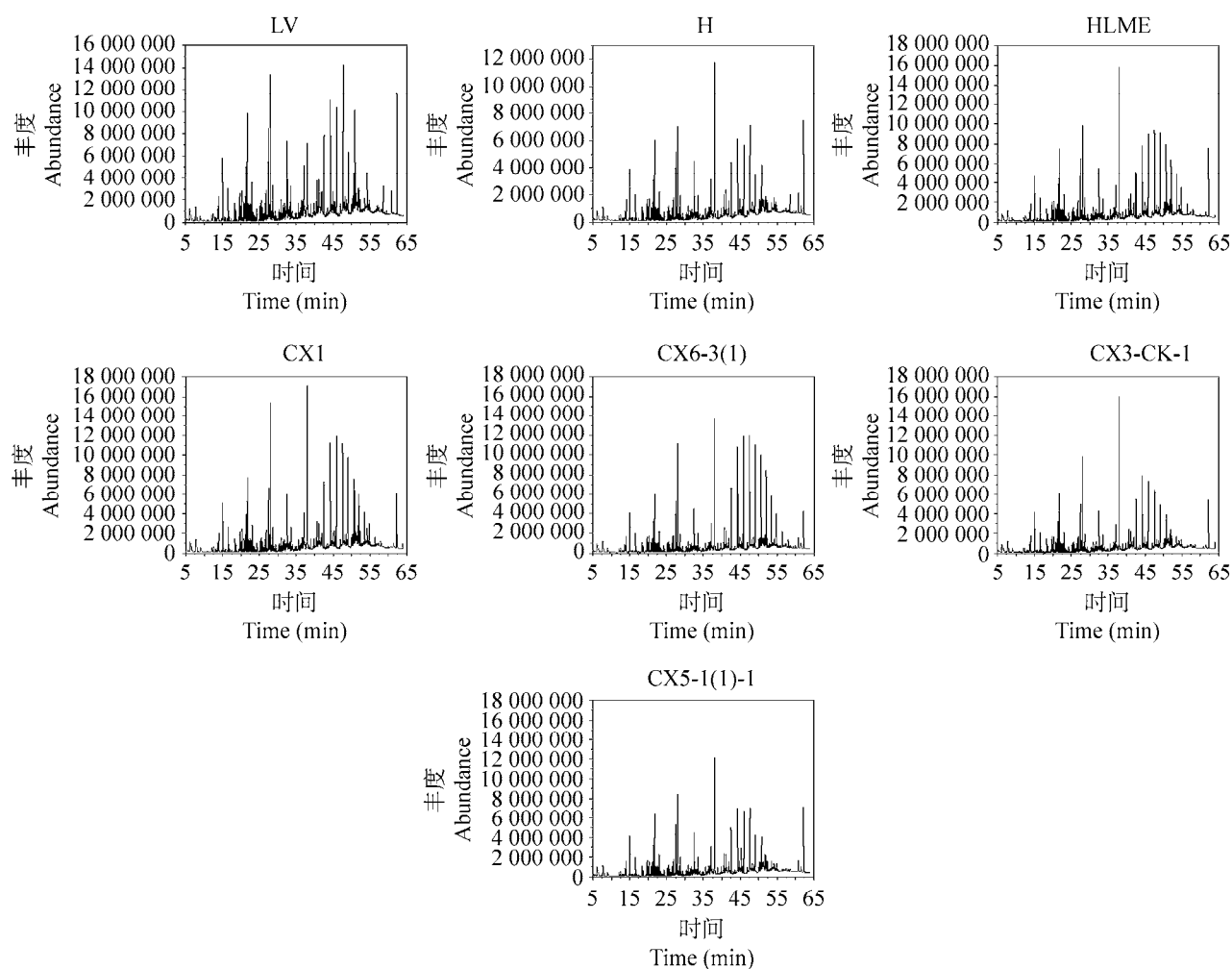


图3 各样品 GC-MS 总离子流图

Fig. 3 GC-MS total ion chromatogram of each sample.

分(表2), 其中芳香族类化合物 17 种, 倍半萜类化合物 34 种, 其他类化合物 33 种。3 组沉香样品共有化学成分 30 种。LV、H 和 HLME 乙醚提取检出物占总相对百分含量分别为 50.22%、48.71%和 49.88%, 其芳香类成分相对含量之和分别为 15.15%、17.29%和 12.13%, 倍半萜类成分相对含量之和分别为 10.61%、11.19%和 11.4%, CK2 组芳香类成分相对含量之和为 7.95%。LV、H 和 HLME 这 3 组共有的芳香族类化合物有 9 种, 共有的倍半萜类化合物高达 14 种, 说明倍半萜类化合物的种类相对稳定。CK2 组共鉴定出 13 种化合物, 其中没有沉香 3 大主要活性化学成分。

3 讨论

对白木香木屑进行固体催化, 结果显示其化学成分均发生了变化, 6 组实验组与 CK1 对照组相比较, 出现了 4 种实验组共有而对照组没有的物质, 分别为己二酸二(2-乙基己)酯、2,6-二叔丁基对甲苯酚、2,6-二异丙基苯基特戊酸酯和单硬脂酸甘油酯。陈晓颖等(2018)分析沉香的挥发性成分, 在其挥发油化学成分中发现二异辛酯邻苯二甲酸, 本研究结果中的己二酸二(2-乙基己)酯可能是其前体物质。吴晓鹏等(2016)通过 GC-MS 技术分析沉香挥发油, 发现沉香挥发油中包含 2,6-二叔丁基对甲苯酚, 与本研所得结

表 1 真菌对白木香固体催化后乙醚提取物中的化学成分
Table 1 The chemical composition of the ether extract of *Aquilaria sinensis* wood solid-catalyzed by the fungi

编号 No.	保留时间 RT (min)	化合物 Compound	分子式		分子量 Molecular weight	相对含量 Relative content (%)				CX3-CK-1	CX5-1(1)-1	CK1
			Molecular formula			LV	H	HLME	CX6-3(1)			
1	6.113	2-甲基-3-戊醇	C ₆ H ₁₄ O		102	0.20	0.19	0.18	0.24	0.23	0.25	0.23
2	18.269	3-Pentanol, 2-methyl- 十二烷-2-基苯	C ₁₈ H ₃₀		246	0.49	0.56	0.53	0.50	0.65	0.53	0.51
3	26.375	Benzene, (1-methylundecyl)- 塞瑟尔烯	C ₁₅ H ₂₄		204	0.39	0.28	0.17	-	0.49	-	-
4	27.982	Seychellene 2,6-二叔丁基对甲苯酚	C ₁₅ H ₂₄ O		220	4.00	3.63	3.66	2.33	2.48	2.78	-
5	28.207	Butylated hydroxytoluene 2-辛基-1-癸醇	C ₁₈ H ₃₈ O		270	0.25	0.17	-	-	-	0.17	0.15
6	37.991	1-Decanol, 2-octyl- 邻苯二甲酸二丁酯	C ₁₆ H ₂₂ O ₄		278	8.23	6.67	7.32	6.30	8.26	6.66	7.08
7	38.064	Dibutyl phthalate 正十五烷酸	C ₁₅ H ₃₀ O ₂		242	2.01	-	-	-	-	-	-
8	41.328	Pentadecanoic acid 亚油酸	C ₁₈ H ₃₂ O ₂		280	0.95	-	-	-	0.32	-	-
9	41.400	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)- 2-己基癸醇	C ₁₆ H ₃₄ O		242	-	-	-	-	0.25	-	-
10	41.415	1-Decanol, 2-hexyl- 顺-7-十四烯醛	C ₁₄ H ₂₆ O		210	0.32	-	-	-	-	-	-
11	41.844	7-Tetradecenal, (Z)- 硬脂酸	C ₁₈ H ₃₆ O ₂		284	0.59	0.17	0.14	0.13	0.46	0.28	0.22
12	45.773	Octadecanoic acid 己二酸二(2-乙基己)酯	C ₂₂ H ₄₂ O ₄		370	0.17	0.49	0.57	0.50	0.75	0.59	-
13	47.164	Hexanedioic acid, bis (2-ethyl hexyl) ester 1-O-十四烷基甘氨酸酯	C ₁₇ H ₃₆ O ₃		288	-	0.15	-	-	-	0.43	0.36
14	47.435	1,2-Propanediol,3-(tetradecyloxy)- 2-Ethylbutyric acid, eicosyl ester	C ₂₆ H ₅₂ O ₂		396	0.26	-	-	-	0.25	-	-

待续

15	47.820	2-单棕榈酸甘油 Hexadecanoic acid, 2-hydroxy- 1-(hydroxymethyl) ethyl ester	C ₁₉ H ₃₈ O ₄	330	5.16	-	3.98	2.64	3.23	3.40	3.55
16	50.276	2-Ethylbutyric acid, 2,4,4-trimethylpentyl ester	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228	0.59	-	0.50	0.61	-	-	-
17	50.520	Hexanoic acid, heptadecyl ester	C ₂₃ H ₄₆ O ₂	354	0.43	0.49	-	-	-	-	-
18	50.959	单硬脂酸甘油酯	C ₂₁ H ₄₂ O ₄	358	2.69	4.07	1.58	1.22	1.48	1.65	-
19	51.104	Octadecanoic acid, 2,3-dihydroxypropyl ester 2,6-二异丙基苯基特戊酸酯	C ₁₇ H ₂₆ O ₂	262	0.78	0.57	0.44	0.48	0.31	0.43	-
20	52.004	2-Tert-Butyl-4,6-bis (3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzyl) phenol 三十烷醇	C ₃₀ H ₆₂ O	438	0.22	0.24	-	-	-	0.22	0.24
21	52.310	1-Triacontanol 反式角鲨烯	C ₃₀ H ₅₀	410	0.25	0.34	0.39	0.32	0.35	0.43	0.46
22	54.283	Squalene 5-羟基-4',7-二甲氧基黄酮 4H-1-Benzopyran-4-one, 5-hydroxy-7-methoxy-2-(4-methoxyphenyl)-	C ₁₇ H ₁₄ O ₃	298	1.32	1.28	1.14	-	-	-	-
23	58.591	麦角甾醇	C ₂₈ H ₄₄ O	396	1.59	1.46	-	-	-	-	-
24	60.869	Ergosterol 谷甾醇	C ₂₉ H ₅₀ O	414	0.85	1.10	-	0.61	-	0.90	-
芳香族类		Gamma-Sitosterol									
Aromatic compounds					15.21	12.99	13.26	9.61	12.19	10.17	8.22
总计					31.74	21.86	20.60	15.88	19.51	18.72	12.80
Total											

注：-, 表示未检测到
Note: -, not detected.

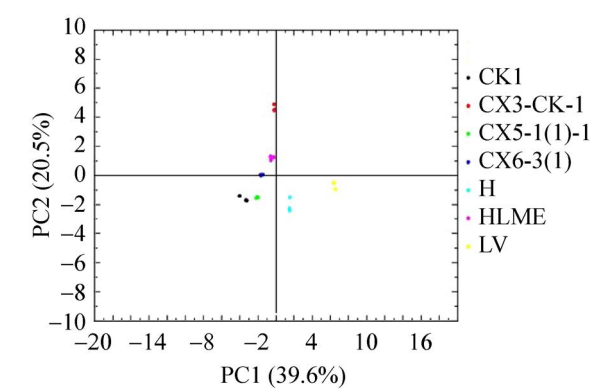


图 4 七组白木香木屑乙醚提取物 PCA 主成分分析 X 轴和 Y 轴的值是可以由相应轴解释的百分比

Fig. 4 Principal component analysis (PCA) of ether extracts from 7 groups of balsam wood sawdust. The X-axis and Y-axis values are the percentages that can be explained by the corresponding axis.

果一致。2,6-二异丙基苯基特戊酸酯为首次在白木香中发现,可能是沉香中一种新的芳香族化合物或者是其他芳香族化合物的前体物质。

白木固体催化试验中没有生成色酮类与倍半萜类化学物质,很可能是因为是在离体条件下白木香没有产生自我防御反应,使其本该在树体中产生的诸多物质没有与侵染的菌体产生互利共生等反应,不足以生产一些代谢产物和次生代谢产物,不足以生成这类沉香物质。但有芳香族类化合物生成,这说明了通过真菌对白木香白木进行固体催化可以生成某些沉香物质,这一现象对白木香促结香真菌的筛选有很大的帮助。以往对促白木香结香真菌的筛选需要通过人工接种至成年白木香树体上,通过 6 个月至 2 年的时间,

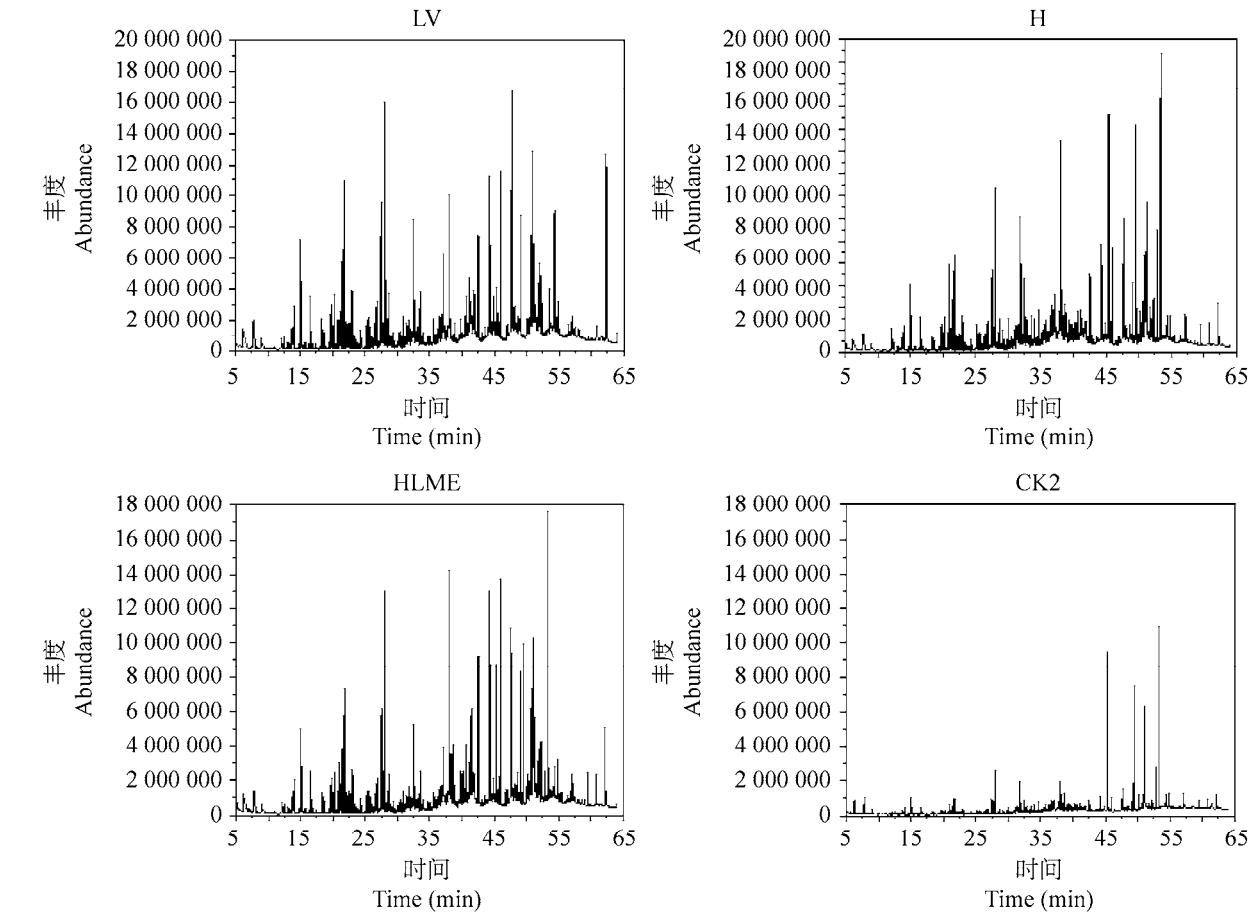


图 5 各样品 GC-MS 总离子流图

Fig. 5 GC-MS total ion chromatogram of each sample.

表 2 4 个样品乙醚提取物中的化学成分
Table 2 Chemical components in ether extracts of 4 samples

编号 No.	保留时间 RT (min)	化合物 Compound	分子式 Molecular formula	分子量 Molecular weight	相对含量 Relative content (%)			
					LV	H	HLME	CK2
1	6.216	2-甲基-3-戊醇 3-Pentanol, 2-methyl-	C ₆ H ₁₄ O	102	0.56	0.48	0.18	0.19
2	12.141	苯甲醛 Benzaldehyde	C ₇ H ₆ O	106	0.45	0.59	0.52	-
3	18.267	[(S)-1-((S)-1-Isopropyl-but-3-enyloxy)-ethyl]-benzene	C ₁₅ H ₂₂ O	218	-	-	0.36	0.50
4	20.909	苄基丙酮 2-Butanone, 4-phenyl-	C ₁₀ H ₁₂ O	148	0.43	1.27	0.80	-
5	25.124	榄香烯 Cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2,4-bis(1-methylethenyl)-, [1S-(1.alpha.,2.beta.,4.beta.)]-	C ₁₅ H ₂₄	204	0.21	0.36	0.20	-
6	25.740	沉香醇 1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0.18	-	0.21	-
7	26.370	α -愈创木烯 Alpha-Guaiene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.58	0.25	0.22	-
8	27.830	(4-甲氧苯基)-2-丁酮 Benzene, 1-methoxy-4-pentyl-4-	C ₁₂ H ₁₈ O	178	-	-	0.14	-
9	27.958	2,6-二叔丁基对甲苯酚 Butylated hydroxytoluene	C ₁₅ H ₂₄ O	220	2.19	2.51	3.51	4.05
10	28.106	α -布黎烯 Azulene, 1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-1,4-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-, [1S-(1.alpha.,7.alpha.,8a.beta.)]-	C ₁₅ H ₂₄	204	0.17	0.16	0.15	-
11	29.195	α -榄香醇 Cyclohexanemethanol,4-ethenyl-alpha, alpha,4-trimethyl-3-(1-methylethenyl)-, [1R-(1 alpha,3 alpha,4 beta)]-	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.35	0.26	0.12	-
12	29.949	α -檀香醇 Alpha-Santalol	C ₁₅ H ₂₄ O	220	0.27	0.39	0.20	-
13	31.164	(+)- γ -古芸烯 (+)-Gurjunene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.30	-	-	-
14	31.168	(+)-香橙烯 Aromandendrene	C ₁₅ H ₂₄	204	-	0.36	0.14	-
15	31.295	沉香螺醇 Agarospinol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.64	0.35	0.54	-
16	31.415	γ -桉叶油醇 Gamma-Eudesmol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.50	0.64	0.62	-
17	31.425	茅苍术醇 Hinesol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	-	0.52	0.60	-
18	31.657	β -柏木烯 1H-3a,7-Methanoazulene,octahydro-3,8,8-trimethyl-6-methylene-, (3R,3aS,7S,8aS)-	C ₁₅ H ₂₄	204	0.20	-	-	-

待续

续表 2

19	31.819	愈创醇 Guaiol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.42	-	0.31	-
20	31.894	β-桉叶醇 2-Naphthalenemethanol,decahydro- alpha,alpha,4a-trimethyl-8-methylene-, [2R-(2 alpha,4a alpha,8a beta)]-	C ₁₅ H ₂₆ O	222	1.76	1.98	1.55	-
21	32.096	(-)-异长叶醇 1,4-Methanoazulene-9-methanol,decahydro- 4,8,8-trimethyl-,(1S,3aR,4S,8aS,9S)-	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.71	0.54	-	-
22	32.200	别孕烯醇酮 Pregnan-20-one, 3-hydroxy-	C ₂₁ H ₃₄ O ₂	318	0.22	-	-	-
23	32.785	绿花白千层醇 Himbaccol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.31	0.38	0.37	-
24	32.940	环桉烯醇 3b-Cycloeucalenol	C ₃₀ H ₅₀ O	426	0.49	-	-	-
25	32.989	蒎烯 6,6-trimethyl-(1theta)-bicyclo[3.1.1]hept-2-en	C ₁₀ H ₁₆	136	0.42	-	-	-
26	33.000	α-律草烯 Humulene	C ₁₅ H ₂₄	204	-	0.40	0.20	-
27	33.319	孕烯醇酮 Pregnenolone	C ₂₁ H ₃₂ O ₂	316	0.17	0.20	0.21	-
28	33.725	新戊酸 6 一烯酯 Limonen-6-ol, pivalate	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	236	0.16	-	-	-
29	34.018	乙基-四甲基环戊二烯 Ethyltetramethylcyclopentadiene	C ₁₁ H ₁₈	150	0.39	-	-	-
30	34.636	八氢四甲基萘甲醇 2-Naphthalenemethanol,2,3,4,4a,5,6,7,8- octahydro-alpha,alpha,4a,8-tetramethyl-, [2R-(2 alpha,4a beta,8 beta.)]-	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.52	0.47	0.49	-
31	35.345	甲基-2-雄烯-3,17-二醇 5-alpha-androst-2-en-17-beta-ol, 17-methyl-(5α,17β)-17-	C ₂₀ H ₃₂ O	288	-	0.13	-	-
32	35.427	二甲基-2,3-二氢-1H-茛 1H-Indene, 2,3-dihydro-1,6-dimethyl- 1,6-	C ₁₁ H ₁₄	146	-	0.25	-	-
33	35.480	四甲基环癸二烯甲醇 Hedycaryol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.34	-	0.33	-
34	35.659	罗汉柏烯 2,4a,8,8-Tetramethyldecahydrocyclopr- opa[d]naphthalene	C ₁₅ H ₂₆	206	-	0.28	-	-
35	35.945	穿心莲内酯 Andrographolide	C ₂₀ H ₃₀ O ₅	350	0.13	0.18	0.64	-
36	36.624	β-檀香醇 Beta-Santalol	C ₁₅ H ₂₄ O	220	0.53	0.54	-	-
37	36.744	蓝桉醇 1H-Cycloprop[e]azulen-4-ol, decahydro-1,1,4,7-tetramethyl-, [1aR-(1a alpha,4 beta,4a beta, 7 alpha,7a beta,7b alpha)]-	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.53	0.56	0.57	-

待续

								续表 2
38	36.814	胆甾醇豆蔻酸酯 Cholest-5-en-3-ol (3 beta)-, tetradecanoate	C ₄₁ H ₇₂ O ₂	596	0.17	0.57	-	-
39	36.954	异愈创木醇 Bulnesol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.69	0.76	0.73	-
40	36.981	四甲基环癸二烯甲醇 3,7-Cyclodecadiene-1-methanol, alpha,alpha,4,8-tetramethyl-, [s-(Z,Z)]	C ₁₅ H ₂₆ O	222	-	0.61	0.51	-
41	37.015	羊角拗醇 Card-20(22)-enolide,3,5,14,19- tetrahydroxy-, (3b,5b)-	C ₂₃ H ₃₄ O ₆	406	0.26	-	0.16	-
42	37.138	Acetate,(2,5,5,8a-tetramethyl-1,2,3,5, 6,7,8,8a-octahydro-1-naphthalenyl) ester	C ₁₆ H ₂₆ O ₂	250	0.53	-	-	-
43	37.740	甲基 4,7-十八碳二炔酸酯 4,7-Octadecadiynoic acid, methyl ester	C ₁₉ H ₃₀ O ₂	290	0.26	-	-	-
44	37.822	(+)-苜蓿烯 (+)-Sativene	C ₁₅ H ₂₄	204	-	0.55	0.50	-
45	37.972	邻苯二甲酸丁基正葵酯 1,2-Benzenedicarboxylic acid, butyl decyl ester	C ₂₂ H ₃₄ O ₄	362	2.13	4.89	4.29	2.64
46	38.064	正十五酸 Pentadecanoic acid	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	242	-	-	1.75	2.56
47	38.640	16-羟基巨大戟醇 1H-2,8a-Methanocyclopenta[a] cyclopropa[e]cyclodecen-11-one, 1a,2,5,5a,6,9,10,10a-octahydro- 5,5a,6-trihydroxy-1,4-bis(hydroxymet)	C ₂₀ H ₂₈ O ₆	364	1.03	-	-	-
48	38.645	异绒白乳菇醛 Isovelleral	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	232	-	-	0.88	-
49	38.760	表蓝桉醇 Epiglobulol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.30	-	-	-
50	38.972	马兜铃烯 (-)-Aristolene	C ₁₅ H ₂₄	204	-	0.40	0.33	-
51	39.235	木香烃内酯 Germacra-1(10),4,11(13)-trien- 12-oic acid,6 alpha-hydroxy-, Gamma-lactone, (E,E)-	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	232	0.41	0.27	-	-
52	39.579	1,5-二苯基-3-戊酮 3-Pentanone, 1,5-diphenyl-	C ₁₇ H ₁₈ O	238	0.32	0.27	-	-
53	40.230	3-Oxatricyclo[20.8.0.0(7,16)]triaconta- 1(22),7(16),9,13,23,29-hexaene	C ₂₉ H ₄₂ O	406	0.37	-	-	-
54	40.247	甲基 6,9-十八碳二炔酸酯 6,9-Octadecadiynoic acid, methyl ester	C ₁₉ H ₃₀ O ₂	290	-	0.26	0.47	-
55	41.345	亚油酸 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280	-	-	0.81	0.72
56	41.370	顺式-十八碳烯酸 Cis-Vaccenic acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282	0.18	0.23	2.40	0.71
								待续

续表 2

57	41.714	三十七醇 1-Heptatriacotanol	C ₃₇ H ₇₆ O	536	0.31	-	-	-
58	41.726	十二烯基丁二酸酐 2-Dodecen-1-yl(-) succinic anhydride	C ₁₆ H ₂₆ O ₃	266	-	0.31	-	-
59	41.788	硬脂酸 Octadecanoic acid	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284	0.26	0.30	0.32	-
60	42.379	1-Penten-3-one, 1,5-diphenyl-	C ₁₇ H ₁₆ O	236	0.25	0.13	-	-
61	42.752	香橙烯氧化物 Aromadendrene oxide-(1)	C ₁₅ H ₂₄ O	220	0.31	0.16	0.28	-
62	45.357	8-Naphthol, 1-(benzyloxy)-	C ₁₇ H ₁₄ O ₂	250	9.87	7.10	2.25	0.76
63	45.771	己二酸二乙基己基酯 Hexanedioic acid, bis (2-ethylhexyl) ester	C ₂₂ H ₄₂ O ₄	370	-	0.27	0.33	0.25
64	47.420	1-十六烷基-2,3-二氢-1H-茚 1H-Indene, 1-hexadecyl-2,3-dihydro-	C ₂₅ H ₄₂	342	0.17	-	-	-
65	47.769	甘油-棕榈酸酯 Hexadecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl) ethyl ester	C ₁₉ H ₃₈ O ₄	330	1.33	-	2.80	5.05
66	49.557	Propenoic acid, 3-(4-benzyloxyphenyl)-, ethyl ester	C ₁₈ H ₁₈ O ₃	282	-	6.16	2.67	-
67	49.594	Benzene, (1-methoxy-4-methyl-3-pentenyl)-	C ₁₃ H ₁₈ O	190	0.93	-	-	-
68	49.641	对甲氧基苯基丙酮 2-Propanone, 1-(4-methoxyphenyl)-	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	164	-	0.76	0.17	-
69	50.168	Coumarin, 6-benzyloxy-3,4-dihydro-4,4-dimethyl-	C ₁₈ H ₁₈ O ₃	282	1.06	0.50	0.52	-
70	50.308	3-苯甲氧基苯甲醇 3-Benzyloxybenzyl alcohol	C ₁₄ H ₁₄ O ₂	214	-	0.48	-	-
71	50.927	硬脂酸甘油单酯 Octadecanoic acid, 2,3-dihydroxypropyl ester	C ₂₁ H ₄₂ O ₄	358	0.98	-	1.71	3.08
72	50.570	甘油单油酸酯 9-Octadecenoic acid (Z)-,2,3-dihydroxypropyl ester	C ₂₁ H ₄₀ O ₄	356	-	0.15	0.26	-
73	51.096	2-苄氧基苯酚 Phenol, 2-(phenylmethoxy)-	C ₁₃ H ₁₂ O ₂	200	10.56	5.66	6.67	-
74	51.813	羟基香茅醛 Octanal, 7-hydroxy-3,7-dimethyl-	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	172	-	-	0.53	-
75	52.299	反式角鲨烯 Squalene	C ₃₀ H ₅₀	410	0.36	0.58	0.81	0.41
76	54.285	对丁基苯酚 Phenol, 4-butyl-	C ₁₀ H ₁₄ O	150	0.35	-	-	-
77	54.322	3-[2-(4-羟基苯基)乙基]苯酚 1-(4-Hydroxyphenyl)-2-(3-hydroxyphenyl) ethane	C ₁₄ H ₁₄ O ₂	214	-	0.31	0.48	-
78	54.400	3-[4-(苄氧基)苯基]丙酸 Benzenepropionic acid, 4-benzyloxy-	C ₁₆ H ₁₆ O ₃	256	-	0.38	-	-

待续

续表 2								
79	54.476	1,4-二羟基萘醌 Succinic acid, diamide, N,N'-methyl-N,N'-phenyl	C ₁₀ H ₆ O ₄	190	0.13	-	-	-
80	54.830	1-甲氧基-4-辛基苯 Anisole, p-octyl-	C ₁₅ H ₂₄ O	220	-	-	0.79	-
81	57.188	(1,2-二甲氧基乙基)苯 Benzene, (1,2-dimethoxyethyl)-	C ₁₀ H ₁₄ O ₂	166	-	0.51	-	-
82	59.546	豆甾醇 Stigmasterol	C ₂₉ H ₄₈ O	412	0.58	0.48	0.68	-
83	60.835	γ-谷甾醇 Gamma-Sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O	414	0.73	0.52	0.69	0.25
84	62.210	2-tert-Butyl-4,6-bis(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzyl) phenol	C ₄₀ H ₅₈ O ₃	586	1.26	1.09	1.91	-
倍半萜类 Sesquiterpenoid					10.61	11.19	11.40	-
芳香族类 Aromatic compounds					15.15	17.29	12.13	7.95
总计 Total					50.22	48.71	49.88	21.17

注：-, 表示未检测到
Note: -, not detected.

然后再对所得变色物质进行化学成分分析来确认是否是沉香物质, 从而确定这一类真菌是否是促结香真菌, 这一系列操作复杂且周期长久。利用真菌催化白木香白木可大大缩短其促白木香结香真菌的筛选时间, 有助于促白木香结香真菌库的快速扩展(刘闯 2021)。

2-(2-苯乙基)色酮类、倍半萜类和芳香族类化合物是沉香的主要活性化学成分(马永青等 2017), 也是衡量人工接菌诱导白木香产生药材沉香品质的关键化学参数(谭小明等 2018)。沉香药材的质量直接受到沉香挥发油的主要组分之一倍半萜类化合物相对含量高低的影响。赵艳艳和房志坚(2013)研究发现沉香挥发油以倍半萜类和芳香族类成分为主的沉香为人工接菌诱导形成, 而且倍半萜类的含量与诱导时间成正比(刘洋洋等 2014)。3 种真菌接种至白木香树体 6 个月后, 均形成了大量沉香特征类物质, 如倍半萜化合物以及多种芳香族类化合物。相关研究表明用 *Trichoderma* sp. 提取物来刺激马来沉香悬浮体系 *Aquilaria malaccensis*, 所得沉香物质最

多, 其提取物化学成分包括 β-桉叶醇、香橙烯氧化物和异愈创木醇(Mei *et al.* 2013)。王东光等(2016)利用黑绿木霉和拟康木霉菌种诱导白木香结香所得沉香物质, 其提取物化学成分与本实验结果中 LV 样品对应菌种实验结果基本一致。用黄绿墨耳真菌诱导白木香离体侧根, 诱导出酮类化合物, 与本研究 HLME 样品对应菌种实验结果一致, 本研究用 H 样品所对应的脉孢菌 *Neurospora* sp. 菌液来诱导白木香结香为国内首次报道, 其乙醚提取物经过 GC-MS 分析检测出的物质与黄绿墨耳真菌和木霉属真菌乙醚提取物所得结果无显著差异(刘闯 2021)。

本研究通过筛选出来的真菌对白木香木屑进行固体催化, 短时间内生成了许多沉香前体物质, 这对高效快速地筛选促白木香结香真菌具有指导意义, 同时对剖析在沉香形成过程中真菌或真菌产生的代谢产物是如何促进或是参与沉香物质的形成及传统中药沉香的研发提供理论依据, 促进了沉香相关产业的发展。

[REFERENCES]

- Angela S, Birgit R, Ulrike P, Eva W, 2002. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiology Ecology*, 39(1): 23-32
- Chen XY, Huang YQ, Chen YC, Zhou X, Gao XX, Zhang WM, 2018. Grey correlation analysis of volatile components and antitumor activity of eaglewood. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 40(1): 224-227 (in Chinese)
- Fu LG, 1991. The red book of Chinese plants. Science Publishing, Beijing. 1-736 (in Chinese)
- Liu C, 2021. Isolation and identification of dominant bacteria on the body surface of agarwood pretreatment and its influence on aroma. Master Thesis, Central South University of Forestry and Technology, Changsha. 1-61 (in Chinese)
- Liu XY, Wang YL, Wang H, Wang LL, Mei WL, Dai HF, Wang J, 2022. GC-MS analysis of essential oil from the four leaves of *Aquilaria sinensis*. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 43(1): 196-206 (in Chinese)
- Liu YY, Yang Y, Lin B, Zhang Z, 2014. Analysis of chemical constituents of essential oil of agarwood produced by whole-tree agarwood-inducing technique. *Chemistry & Bioengineering*, 31(5): 67-71 (in Chinese)
- Ma YQ, Yuan LH, Liu YL, 2017. Advances in the chemical constituents and analytical methods of agarwood. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University*, 34(2): 181-192 (in Chinese)
- Mei WL, Yang DL, Wang H, Yang JL, Zeng YB, Guo ZK, Dong WH, Dai HF, 2013. Characterization and determination of 2-(2-phenylethyl) chromones in agarwood by GC-MS. *Molecules*, 18(10): 12324-12345
- Tan XM, Sun XP, Zhou YQ, Gao HW, Liu ZJ, Tang HZ, 2018. Research progress of endophytic fungi inducing the formation of agilawood from *Aquilaria sinensis*. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, 2018(10): 177-182 (in Chinese)
- Wang DG, Zhang NN, Yang ZJ, Liu XJ, Hong Z, Xu DP, 2016. Effects of 20 fungal species on compositions of essential oils from *Aquilaria sinensis* trees. *Journal of South China Agricultural University*, 37(5): 77-83 (in Chinese)
- Wu F, Zhou LW, Yang ZL, Bau T, Li TH, Dai YC, 2019. Resource diversity of Chinese macrofungi: edible, medicinal and poisonous species. *Fungal Diversity*, 98: 1-76
- Wu XP, Yang JL, Mei WL, Wang J, Ma ZL, Dai HF, 2016. GC-MS analysis of volatile constituents from five batches of artificial Chinese eaglewood in Huazhou. *Journal of Tropical Biology*, 7(4): 500-509, 516 (in Chinese)
- Yang Y, Han Y, Chen Y, Rao DD, Chen GD, 2021. Research progress on artificial agarwood-induction techniques and chemical constituents of *Aquilaria sinensis*. *Tropical Forestry*, 49(3): 15-18, 14 (in Chinese)
- Zhang XH, Mei WL, Chen P, Deng YY, Dai HF, 2009. Isolation, identification and antimicrobial activity of endophytic fungi in *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg. *Journal of Microbiology*, 29(3): 6-10 (in Chinese)
- Zhao YY, Fang ZJ, 2013. GC-MS analysis of volatile oil components from aquilariae lignum resinatum concreted by a new artificial method. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 36(6): 929-933 (in Chinese)

[附中文参考文献]

- 陈晓颖, 黄跃前, 陈玉婵, 周欣, 高晓霞, 章卫民, 2018. 沉香挥发性成分与其抗肿瘤活性的灰色关联度分析. *中成药*, 40(1): 224-227
- 傅立国, 1991. 中国植物红皮书. 北京: 科学出版社. 1-736
- 刘闯, 2021. 沉香预处理体表优势菌分离鉴定及其对结香影响. 中南林业科技大学硕士论文, 长沙. 1-61
- 刘欣怡, 王雅丽, 王昊, 王露露, 梅文莉, 戴好富, 王军, 2022. 4 种沉香树叶片挥发油化学成分 GC-MS 分析. *热带作物学报*, 43(1): 196-206
- 刘洋洋, 杨云, 林波, 张争, 2014. 四批通体香沉香药材的挥发油成分分析. *化学与生物工程*, 31(5): 67-71
- 马永青, 袁丽华, 刘永利, 2017. 沉香化学成分与分析方法研究进展. *沈阳药科大学学报*, 34(2): 181-192
- 谭小明, 孙雪萍, 周雅琴, 高红伟, 刘振杰, 唐红珍, 2018. 内生真菌诱导沉香形成的研究进展. *黑龙江农业科学*, 2018(10): 177-182
- 王东光, 张宁南, 杨曾奖, 刘小金, 洪舟, 徐大平, 2016. 20 种真菌对白木香挥发油成分的影响. *华南农业大学学报*, 37(5): 77-83
- 吴晓鹏, 杨锦玲, 梅文莉, 王军, 马子龙, 戴好富, 2016. 5 批化州产沉香挥发性成分的 GC-MS 分析. *热带生物学报*, 7(4): 500-509, 516
- 杨影, 韩豫, 陈彧, 饶丹丹, 陈国德, 2021. 白木香人工结香技术和化学成分研究进展. *热带林业*, 49(3): 15-18, 14
- 张秀环, 梅文莉, 陈苹, 邓媛元, 戴好富, 2009. 白木香内生真菌的分离鉴定及其抑菌活性. *微生物学杂志*, 29(3): 6-10
- 赵艳艳, 房志坚, 2013. 一种新的人工结香沉香挥发油成分 GC-MS 分析. *中药材*, 36(6): 929-933