



研究报告

表观遗传的化学干预对金龟子绿僵菌次生代谢产物影响的研究

黄永芳^{Δ1} 陈元元^{Δ1} 刘庆荣¹ 尉杰² 赵铨² 陆瑞利^{*1,2} 胡丰林^{*2}¹ 安徽农业大学理学院 安徽 合肥 230036² 安徽农业大学真菌生物技术教育部工程研究中心 安徽 合肥 230036

摘要:【背景】表观遗传酶类化学抑制剂对真菌的影响研究主要集中在次生代谢产物挖掘方面,而对大量已知次生代谢物含量的变化却关注较少。金龟子绿僵菌是一种常用杀虫真菌,能代谢出多种已知生物活性物质,其含量可能会影响到该菌与环境间关系及利用潜力。【目的】评估组蛋白去乙酰化酶和 DNA 甲基转移酶的化学抑制剂对金龟子绿僵菌代谢物安全性和可利用性的影响。【方法】在金龟子绿僵菌培养基中添加表观遗传酶类化学抑制剂,培养一定时间后用高分辨液质联用及标准品对照方法分析次生代谢产物变化。根据差异代谢物的生物活性评估化学抑制剂的影响。【结果】高分辨液质联用分析结果表明当抑制剂浓度达 500 $\mu\text{mol/L}$ 时,金龟子绿僵菌有 16 种主要次生代谢产物出现明显量的变化,包括 Destruxin A、A1、A2、B、B1、B2、E、E2、Ed、Didesmethyldestruxin C、Dihydrodestruxin A、Desmethyldestruxin B、12-Hydroxyovalicin、Subglutinol C、Fungerin 和 Ustilagic Acid C。其中,丁酸钠处理可使 15 种主要代谢物含量升高。苯甲酰胺可使 12 种主要代谢物含量升高。伏立诺他虽然仅能使 10 种主要代谢物含量升高,但部分代谢物的升高幅度明显高于前两者。2 种 DNA 甲基转移酶抑制剂可使金龟子绿僵菌代谢物中绿僵菌素类代谢物含量普遍下降。【结论】组蛋白去乙酰化酶抑制剂可引起金龟子绿僵菌主要代谢物含量普遍升高,而 DNA 甲基转移酶抑制剂使金龟子绿僵菌的绿僵菌素含量普遍下降。由于变化的代谢物都具有显著的杀虫、免疫抑制或抗菌抗癌等生物活性,因此上述化学抑制剂可增强或降低金龟子绿僵菌对环境昆虫毒性,同时也增加或降低其代谢物利用潜力。另外,Subglutinol C、Fungerin 和 Ustilagic Acid C 是首次在金龟子绿僵菌中被发现。

关键词: 金龟子绿僵菌, 组蛋白去乙酰化酶抑制剂, DNA 甲基转移酶抑制剂, 次生代谢产物, 高分辨液质联用

Foundation item: Natural Science Foundation of Anhui Province (1808085MC89)

^ΔThese authors equally contributed to this work

***Corresponding authors:** E-mail: LU Ruili: luruili@ahau.edu.cn; HU Fenglin: hufenglin@ahau.edu.cn

Received: 20-01-2021; **Accepted:** 23-02-2021; **Published online:** 30-03-2021

基金项目: 安徽省自然科学基金(1808085MC89)

^Δ对本文贡献相同

***通信作者:** E-mail: 陆瑞利: luruili@ahau.edu.cn; 胡丰林: hufenglin@ahau.edu.cn

收稿日期: 2021-01-20; **接受日期:** 2021-02-23; **网络首发日期:** 2021-03-30

The effect of chemical intervention of epigenetics on secondary metabolites of *Metarhizium anisopliae*

HUANG Yongfang^{Δ1} CHEN Yuanyuan^{Δ1} LIU Qingrong¹ WEI Jie² ZHAO Cheng²
LU Ruili^{*1,2} HU Fenglin^{*2}

1 College of Science, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China

2 Engineering Research Center of Fungal Biotechnology Ministry of Education, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China

Abstract: [Background] Studies about effects of epigenetic enzyme chemical inhibitors on metabolites of fungi mainly focus on new metabolites mining while content change of large number of known metabolites are less concerned. *Metarhizium anisopliae* is a common insecticidal fungus which can synthesize many known bioactive metabolites. Content variation of the metabolites can possibly affect the relationship between the fungus and the environment and its utilization potential. **[Objective]** To assess the effects of histone deacetylase and DNA methylase inhibitors on the safety and availability of metabolites of *M. anisopliae*. **[Methods]** Chemical inhibitors of epigenetic enzyme were added in medium of *M. anisopliae*. After a period of cultivation the metabolic changes were analyzed with high-performance liquid chromatography (HPLC) combined with high-resolution mass spectrometry (HRMS) and with some standards comparison. The effects of the inhibitors were evaluated by the bioactivities of the changed metabolites. **[Results]** Results of HPLC-HRMS showed that the content of 16 main metabolites of *M. anisopliae* changed significantly while the concentration of the inhibitors reached 500 $\mu\text{mol/L}$. The changed metabolites included destruxin A, A1, A2, B, B1, B2, E, E2, Ed, didesmethyldestruxin C, dihydrodestruxin A, desmethyldestruxin B, 12-hydroxyvalicin, subglutinin C, fungerin and ustilagic acid C. Sodium butyrate can increase 15 of the main metabolites production, and benzamide can increase 12 of the main metabolites production. Despite that SAHA can only increase 10 of the main metabolites production, some of the increased levels were much higher than the two formers. All the destruxins were decreased in the DNA methylase inhibitors treated *M. anisopliae*. **[Conclusion]** Chemical inhibitors of histone deacetylase can increase the contents of the main metabolites of *M. anisopliae* while inhibitors of DNA methylase can decrease all the destruxins in the fungus. Because of that all the main varied metabolites possess insecticidal, immunosuppressive, antibacterial, anti-cancer or other biological activities, the above inhibitors can strengthen or weaken the toxicity of the fungus against insects in the environment and increase or decrease metabolic utilization value of the fungus. Additionally, subglutinin C, fungerin and ustilagic acid C were identified for the first time from *M. anisopliae*.

Keywords: *Metarhizium anisopliae*, histone deacetylase inhibitors, DNA methylase inhibitors, secondary metabolites, liquid chromatography combined with high-resolution mass spectrometry

真菌表观遗传是近年来研究热点之一，其中有关次生代谢产物的研究，目前主要集中在新的代谢产物挖掘方面。有研究表明，敲除表观遗传酶类基因可释放真菌中某些沉默基因，产生新的次生代谢产物，如 Fan 等把昆虫病原真菌 *Metarhizium robertsii* 中组蛋白乙酰转移酶(Histone Acetyltransferase, HAT)基因 *Hat1* 敲除后，该菌代谢出 11 种新天然产物，包括 8 种异香豆素衍生物

和 2 种非核糖体肽^[1]。用表观遗传酶类化学抑制剂处理真菌也可产生类似效果，如 Chung 等在 *Beauveria felina* 的培养物中加入 500 $\mu\text{mol/L}$ 组蛋白去乙酰化酶抑制剂辛二酰苯胺异羟肟酸(伏立诺他, SAHA)，发现该菌代谢出 3 种新的环肽类化合物^[2]；利用 DNA 甲基转移酶抑制剂 5-氮杂胞嘧啶核苷和 RG-108，人们从链格孢属^[3]、黑曲霉^[4]、球孢白僵菌^[5]、树脂枝孢霉^[6]、*Cladosporium*

cladosporioides^[7]、*Metacordyceps indigotica*^[8]、*Diatrype* sp.^[9]、*Muscodor yucatanensis*^[10]、柑桔青霉菌^[11]、*Pestalotiopsis crassiuscula*^[12]和细脚棒束孢中诱导出新的次生代谢产物^[13-14]。然而, 相对于新的次生代谢产物挖掘, 表观遗传酶类化学抑制剂对真菌中大量已知代谢产物含量的影响也应该引起足够的重视, 因为有些已知次生代谢产物具有很强的生物活性, 其含量变化可直接影响到该菌对环境其他生物的作用, 如绿僵菌属真菌中有数十个已知结构的绿僵菌素类代谢物, 这些物质对昆虫等多种生物具有毒性^[15-16], 其含量变化可直接影响到该菌宿存环境周围的其他生物的生存。由于绿僵菌的有些次生代谢物具有开发药品的潜力^[16], 其含量的变化也会影响到该菌相关产品的开发。

自然界中自发的表观遗传酶类基因敲除现象并不多见, 而自然界各种化合物包括涉及表观遗传酶类化学抑制剂却无处不在, 如常见的组蛋白去乙酰化酶抑制剂丁酸钠是常用的饲料添加剂和食品风味剂, 在饲料中添加量一般都在 0.1% 以上^[17-18], 是本研究最高实验浓度的 18 倍以上; 组蛋白去乙酰化酶抑制剂苯甲酰胺是 200 余种药物或农药等化工产品的合成前体、中间体或分解产物^[19-20]; DNA 甲基转移酶抑制剂 5-氮杂胞嘧啶核苷和 5-氮杂-2'-脱氧胞嘧啶核苷是抗癌药物^[21-23]。这些物质广泛存在于我们的食物链和环境中, 可通过对各种生物表观遗传酶类作用而引起次生代谢产物变化, 进而影响到周围生物的安全性和代谢物的可利用性。

金龟子绿僵菌(*Metarhizium anisopliae*)是绿僵菌属真菌中应用于农作物和森林害虫生物防治最多的虫生真菌, 该菌能代谢出 40 余个生物活性化合物, 包括 14 个具有杀虫、细胞毒性、免疫抑制或抗癌活性的绿僵菌素类非核糖体肽^[15-16,24-25]。由于该菌被广泛用于包括玉米田、稻田和草原在内的多种害虫防治, 玉米秆、稻草和牧草又常用于牛羊

饲料^[26], 因此, 该菌代谢可能会受到高浓度饲料添加剂丁酸钠的影响, 同时, 金龟子绿僵菌还可在土壤等多种环境下宿存, 受到其他各类化学物质的影响。系统研究各类表观遗传酶类化学抑制剂对金龟子绿僵菌代谢的影响, 不仅有利于评估该生物杀虫剂在不同化学环境下的代谢物安全性, 也为金龟子绿僵菌中相关代谢物的开发利用提供参考, 同时也为各类化学品特别是具有表观遗传酶类抑制活性的化合物的生态安全评价提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂、仪器及培养基

色谱纯甲醇和乙腈, Tedia 公司。色谱纯甲酸, Agilent 公司; 分析纯二甲基亚砜, 北京索莱宝科技有限公司; 分析纯丁酸钠和苯甲酰胺, 南京杜莱生物技术有限公司; 分析纯 5-氮杂胞嘧啶核苷(5-Aza-C)、5-氮杂-2'-脱氧胞嘧啶核苷(5-Aza-2'-Dc)和伏立诺他(SAHA), 北京百奥莱博科技有限公司; 绿僵菌素 A, Alabiotech 公司。高效液相色谱仪(二元高压泵、高压梯度混合器和二级阵列检测器)、高分辨质谱仪、Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱(2.7 μm , 3.0 mm \times 100 mm), Agilent 公司; 立式冷冻干燥机, GOLD-SIM 公司; 超速离心机, Sigma 公司; 数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; 全温振荡培养箱, 哈尔滨东联电子公司。

SDY 培养基(g/L): 酵母浸出粉 10.0, 蛋白胨 10.0, 葡萄糖 40.0, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

1.2 菌株培养和酶抑制剂的加入

金龟子绿僵菌菌株 Ma23 由安徽农业大学虫生真菌研究中心提供。将保存的绿僵菌(20%甘油和 80%的纯水)菌种 1 mL 接种于冷却的 100 mL (装在 250 mL 的三角瓶中)已灭菌的 SDY 培养基中, 25 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 恒温摇床中培养 3 d, 作为液体菌种备用。

准备 93 个灭菌的 250 mL 三角瓶, 内装 100 mL SDY 灭菌培养基, 其中 3 个空白对照除培

培养基和菌种外,不添加任何试剂,其余 90 个按表 1 分别加入组蛋白去乙酰化酶抑制剂[丁酸钠、苯甲酰胺和伏立诺他(SAHA)]、DNA 甲基转移酶抑制剂(5-氮杂胞嘧啶核苷、5-氮杂-2'-脱氧胞嘧啶核苷)和对照溶剂二甲基亚砷。上述酶抑制剂在添加前预先配成 50 mmol/L 二甲基亚砷溶液,并用 0.22 μm 滤膜过滤除菌备用。添加结束后,将前面制备的液体菌种涡旋 3 min,每个三角瓶中接种 1 000 μL 液体菌种,然后放置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 恒温摇床中培养 12 d。

1.3 发酵物处理

将上述培养结束的样品从摇床中取出,分别用布氏漏斗真空抽滤,将所得的滤液放入分液漏斗,用等体积乙酸乙酯萃取 3 次,合并 3 次有机相,在真空旋转浓缩仪上蒸发至干,加入 2 mL 的色谱甲醇复溶,用 12 000 r/min 离心 5 min,取上清稀释 5 倍作为 HPLC-MS 分析样品。

1.4 高分辨液质联用分析

流动相: A=0.1%甲酸水溶液, B=0.1%甲酸乙腈溶液。洗脱条件: 0.0–8.0 min, 10%–40% B; 8.0–30.0 min, 40%–60% B; 30.0–50.0 min, 60%–100% B; 50.0–60.0 min, 100% B。进样量 5 μL , 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$, 流速 0.3 mL/min。二级阵列检测器为 200–600 nm 全波长扫描。质谱采用阳离子模式分析: 氮气温度 325 $^{\circ}\text{C}$, 干燥气流速 10 L/min, 鞘气流速 12 L/min, 雾化气压 40 psi; 毛细管电压为 4 000 V; 碎裂电压为 180 V, 分离电压 45 V; 质量采集范围为 0.1–1.7 kD; 二级质谱碰撞电压 40 eV, 对质荷比 ≥ 500 的离子采集二级质谱。

2 结果与分析

2.1 不同处理的总离子流色谱比较

不同处理的总离子流色谱比较发现, 50 $\mu\text{mol/L}$ 以下的组蛋白去乙酰化酶抑制剂、100 $\mu\text{mol/L}$ 以下的 DNA 甲基转移酶抑制剂, 以及不同浓度的 DMSO 处理与没有任何添加的金龟子绿僵菌培养液提取物没有明显区别, 但随着抑制剂浓度的升高, 其与对照差别逐渐明显。在添加浓度为 500 $\mu\text{mol/L}$ 时, 可看到组蛋白去乙酰化酶抑制剂丁酸钠、苯甲酰胺和伏立诺他(SAHA)处理的提取物中, 各种代谢物峰强度普遍高于对照, 特别是 SAHA 处理的图谱, 在保留时间为 12–15 min 处多出 2 个较大的峰(图 1)。从图 1 还可看到, DNA 甲基转移酶抑制剂 5-氮杂胞嘧啶核苷(5-Aza-C)和 5-氮杂-2'-脱氧胞嘧啶核苷(5-Aza-2'-Dc)处理, 其总离子流图上的峰明显变少, 表明 DNA 甲基转移酶抑制剂可降低绿僵菌次生代谢产物的化学多样性。

对主要差异峰的峰面积积分(表 2)发现丁酸钠处理后, 金龟子绿僵菌代谢物峰面积有 15 个升高, 其中升高超过 10%的有 7 个; 苯甲酰胺处理有 12 峰面积增大, 其中有 4 个峰面积增加超过 10%; SAHA 处理有 10 峰面积增大, 其中有 5 个峰面积增加超过 10%。值得注意的是, 在图 1 上看到的 SAHA 处理多出的 12.90 min 和 13.44 min 峰, 实际上在对照中也有, 只是对照的峰面积相对较低(仅有处理组的 1/6.5 和 1/63.6, 表 2), 说明 SAHA 可能仅仅是增加了某些基因的表达量, 并不一定能完全释放某些沉默的基因。

表 1 酶抑制剂的添加终浓度(自然 pH)

Table 1 Final concentration of the added enzyme inhibitors (natural pH)

抑制剂种类和浓度 Kinds of inhibitors and concentration	二甲基亚砷 DMSO	5-氮杂胞嘧啶核苷 5-Aza-C	5-氮杂-2'-脱氧胞嘧啶核苷 5-Aza-2'-Dc	伏立诺他 SAHA	丁酸钠 Sodium butyrate	苯甲酰胺 Benzamide
最终浓度 Final concentration	10	10	10	10	10	10
($\mu\text{mol/L}$)	50	50	50	50	50	50
	100	100	100	100	100	100
	500	500	500	500	500	500

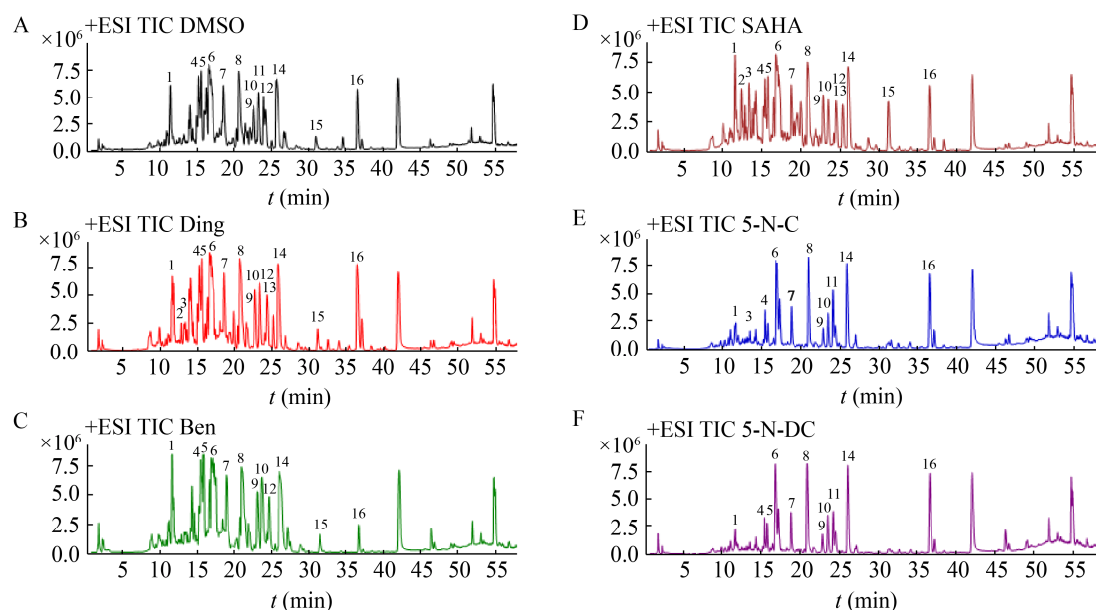


图 1 不同化学抑制剂处理的培养液提取物总离子流图

Figure 1 Total ion flow of extracts from fermentation broth treated with different chemical inhibitors

注: A: 500 $\mu\text{mol/L}$ 二甲基亚砜处理; B: 500 $\mu\text{mol/L}$ 丁酸钠; C: 500 $\mu\text{mol/L}$ 苯甲酰胺; D: 500 $\mu\text{mol/L}$ 伏立诺他; E: 500 $\mu\text{mol/L}$ 5-氮杂胞嘧啶核苷; F: 500 $\mu\text{mol/L}$ 5-氮杂-2'-脱氧胞嘧啶核苷。有编号的峰是含量变化较大的主要次生代谢产物峰

Note: A: 500 $\mu\text{mol/L}$ dimethyl sulfoxide (as control); B: 500 $\mu\text{mol/L}$ sodium butyrate; C: 500 $\mu\text{mol/L}$ benzamide; D: 500 $\mu\text{mol/L}$ vorinostat; E: 500 $\mu\text{mol/L}$ 5-azacytosine; F: 500 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza-2'-deoxycytosine, respectively. Numbered peaks are the main varied secondary metabolites

从表 2 中可看到 DNA 甲基转移酶抑制剂 5-氮杂胞嘧啶核苷和 5-氮杂-2'-脱氧胞嘧啶核苷处理使金龟子绿僵菌代谢物峰面积普遍降低,甚至彻底消失,这与最初的通过添加抑制剂释放被甲基化沉默的基因预期相差甚远,其原因可能有 2 个方面:一是真菌的 DNA 甲基化率非常低^[27],因此可释放的基因潜力有限;另一方面原因就是 DNA 甲基转移酶抑制剂干扰了金龟子绿僵菌非核糖体肽的合成过程中的甲基转移。实际上,绿僵菌中大部分绿僵菌素类物质含有 5-10 个甲基^[24-25],其结构差异主要是甲基位置和数量的差异。

2.2 变化组分的鉴定分析

为进一步评估化学抑制剂对金龟子绿僵菌代谢的影响,下面将对表 2 中的主要差异物进行鉴定。表 2 中差异物对应的一级和二级质谱及部分紫外光谱见图 2。

化合物 1 (图 2 的 1A)质荷比为 612.361 1, 是

$[\text{M}+\text{H}]^+$ 峰, 经计算对应的可能分子式是 $\text{C}_{29}\text{H}_{49}\text{N}_5\text{O}_9$, 误差为 +0.8 mD。该化合物的一级和二级质谱(286.192 7、471.281 6 和 499.276 6) (图 2 的 1B)与绿僵菌素 Ed (Destruxin Ed)标准品一致^[24]。数据库查询发现分子式 $\text{C}_{29}\text{H}_{49}\text{N}_5\text{O}_9$ 在金龟子绿僵菌中报道的对应化合物正是绿僵菌素 Ed, 并且该化合物由于含较多羟基在反相色谱中出峰较其他非核糖体肽早^[24-25], 此与本研究的出峰特点一致, 另外,其紫外光谱(图 2 的 1C)与标准品 Destruxin A 等绿僵菌素类物质一致, 都在 210 nm 以上没有明显特征吸收。从精确一级二级质谱、来源、极性和紫外光谱特征可确定该差异物是非核糖体肽 Destruxin Ed。

化合物 2 (图 2 的 2A)质荷比为 335.146 8 和 647.303 5, 分别是分子 $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_6$ 的 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 和 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ 峰, 误差分别为 +0.3 mD 和 -0.3 mD。数据库查询发现在金龟子绿僵菌中已有该分子式对

表 2 不同化学抑制剂处理的金龟子绿僵菌代谢物峰面积变化

Table 2 Peak area variations of metabolites of *Metarhizium anisopliae* treated with different chemical inhibitors

编号 No.	保留时间 Retention time (min)	质荷比 Mass charge ratio	对照峰面积 Peak area of the control (counts·S)	与对照峰面积的比率 Peak area rate against the control				
				丁酸钠 Sodium butyrate	苯甲酰胺 Benzamide	伏立诺他 SAHA	5-氮杂胞嘧啶核苷 5-Aza-C	5-氮杂-2'-脱氧胞嘧啶核苷 5-Aza-2'-Dc
1	11.62	612.361 1	17 668 000	1.07±0.05	1.32±0.06	1.22±0.05	0.27±0.01	0.26±0.01
2	12.90	335.146 8	520 469	3.99±0.16	0.35±0.02	6.47±0.29	0	0
3	13.44	235.145 2	297 676	12.54±0.45	5.05±0.22	63.63±2.48	8.37±0.35	5.12±0.24
4	15.39	580.334 4	22 642 918	1.08±0.04	1.01±0.03	0.84±0.02	0.42±0.02	0.42±0.02
5	15.70	596.365 8	13 460 555	1.10±0.05	1.05±0.04	0.85±0.03	0.09±0.00	0.10±0.01
6	16.71	594.350 8	41 297 478	1.08±0.04	1.04±0.05	1.02±0.04	0.74±0.03	0.74±0.03
7	18.71	564.339 8	32 788 935	1.03±0.05	1.05±0.05	0.86±0.03	0.40±0.02	0.44±0.02
8	20.76	578.355 8	49 505 085	1.06±0.06	1.05±0.05	1.00±0.05	0.65±0.03	0.65±0.03
9	22.82	580.370 9	27 142 436	1.12±0.06	1.07±0.05	1.02±0.06	0.20±0.01	0.23±0.01
10	23.44	580.370 4	39 974 122	1.02±0.05	1.14±0.07	0.69±0.03	0.31±0.01	0.39±0.02
11	24.15	443.280 4	28 029 601	0.06±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.74±0.04	0.60±0.03
12	24.45	580.371 1	30 468 819	1.07±0.06	1.11±0.05	1.00±0.05	0.22±0.01	0.26±0.01
13	25.25	592.371 2	4 773 032	3.86±0.17	0.64±0.03	5.71±0.23	0.09±0.00	0.10±0.01
14	25.88	594.387 7	4 7109 947	1.09±0.07	1.08±0.06	1.05±0.05	0.73±0.04	0.77±0.04
15	31.25	608.402 5	8 155 130	1.28±0.09	1.00±0.04	3.46±0.14	0.12±0.01	0.11±0.01
16	36.63	509.296 7	28 478 749	1.36±0.08	0.35±0.01	1.04±0.05	1.10±0.06	1.14±0.06

注：对照为添加 500 $\mu\text{mol/L}$ DMSO 的金龟子绿僵菌培养物。处理组中的抑制剂和 DMSO 浓度都为 500 $\mu\text{mol/L}$ 。峰面积是对照 3 倍以上的用加黑字体突出显示

Note: The control group are fermented *M. anisopliae* treated with 500 $\mu\text{mol/L}$ DMSO. The treatment group are fermented *M. anisopliae* treated with 500 $\mu\text{mol/L}$ inhibitors 500 $\mu\text{mol/L}$ DMSO. Peak areas were highlighted when more than 3 times of the control

应的化合物报道，即 12-Hydroxyovalicin^[24,25]，该化合物在 210 nm 以上没有明显特征吸收，有多个极性基团，此与本研究化合物的紫外特征及出峰较早的特点一致。从来源、精确质谱、极性和紫外特征可基本确定该化合物是 12-Hydroxyovalicin。该化合物具有抑制血管生成、抗癌和免疫抑制活性^[25,28]。丁酸钠或 SAHA 处理可使该代谢物含量提高 4 倍或 6 倍(表 2)，因此丁酸钠或 SAHA 处理可望在该代谢物生产利用中具有一定价值。

化合物 3 (图 2 的 3A)质荷比为 235.145 0，是 $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$ 的 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 峰，误差为 +1.1 mD。数据查询发现在一种绿僵菌 *Metarhizium* sp. 中有对应的化合物报道，并且其紫外光谱与图 2 中 3C 紫外光谱一致^[25,29]，从精确质谱、来源和紫外光谱可确定该化合物为 Fungerin。该化合物具有抗细菌、抗真

菌和乙酰胆碱酯酶抑制作用^[24,29]。由于本研究所用的抑制剂都能使该成分含量提高 5 倍以上，特别是 SAHA 处理可使该成分含量升高 63.6 倍，因此这些抑制剂有望在该代谢物的开发中起到增加产量的作用。

化合物 4 (图 2 的 4A)质荷比为 580.334 4 和 1 181.641 0，分别为 $\text{C}_{28}\text{H}_{45}\text{N}_5\text{O}_8$ 的 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 和 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ 峰，误差分别为 +0.3 mD 和 -1.8 mD。该化合物在 210 nm 以上没有明显紫外吸收，其的一级和二级质谱(368.251 9、439.293 8 和 467.284 1)(图 2 的 4B)与绿僵菌素 E2 (Destruxin E2)标准品一致^[25]。数据查询发现分子式 $\text{C}_{28}\text{H}_{45}\text{N}_5\text{O}_8$ 在金龟子绿僵菌中报道的化合物正是具有杀虫活性的 Destruxin E2，其紫外特征吸收波长为 204 nm^[24,30]，与本研究一致，显然 580.334 4 对应的代谢物是 Destruxin E2。

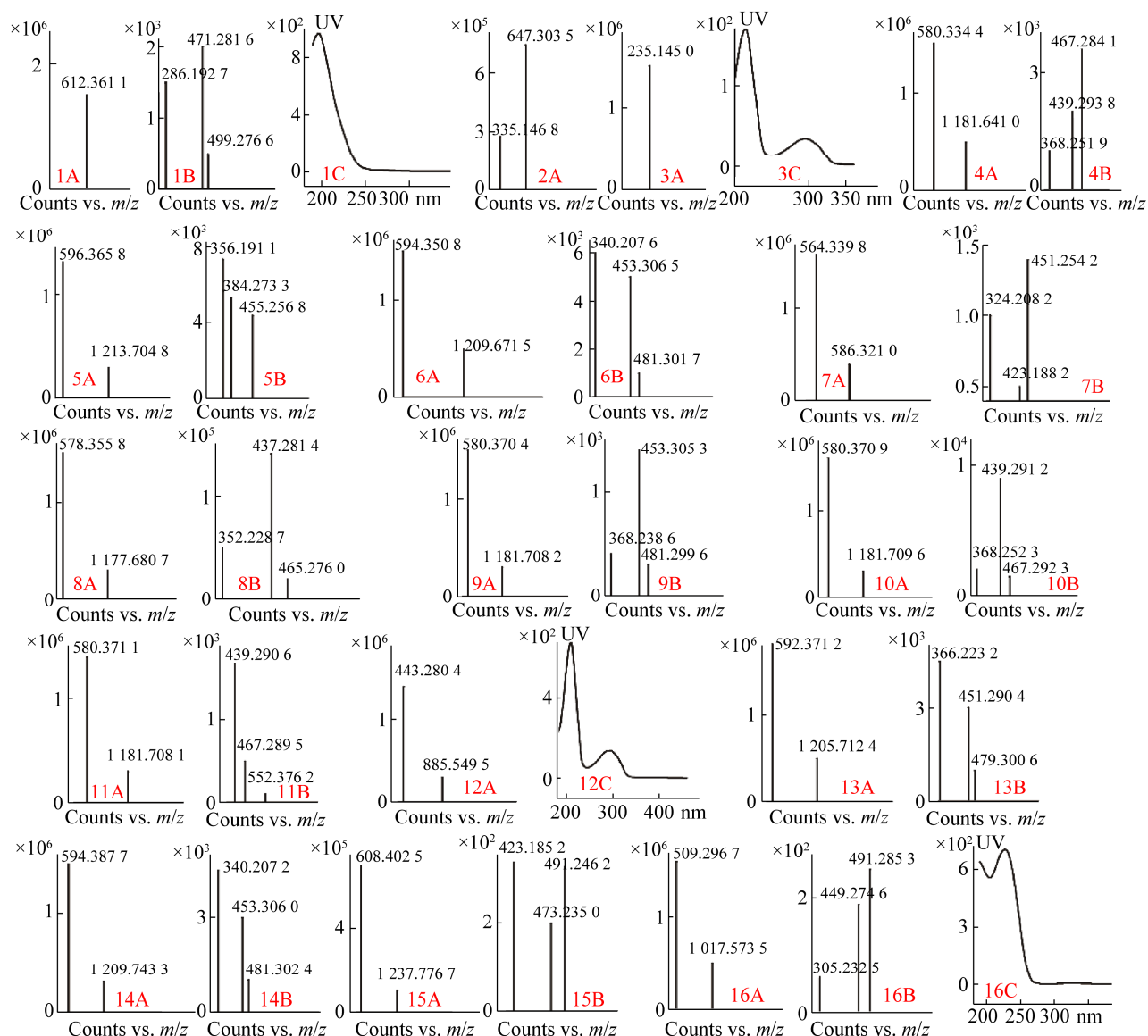


图 2 主要差异代谢物一级、二级质谱和部分紫外光谱

Figure 2 MS and MS/MS spectra and some Ultra violet spectra of the main changed metabolites

注: A: 一级质谱; B: 二级质谱; C: 紫外光谱

Note: A: Mass spectrum; B: Corresponding MS/MS spectrum; C: Ultraviolet spectrum

化合物 **5** (图 2 的 5A) 质荷比为 596.365 8 和 1 213.704 8, 分别为 $C_{29}H_{49}N_5O_8$ 的 $[M+H]^+$ 和 $[2M+Na]^+$ 峰, 误差分别为 -0.1 mD 和 -0.6 mD。该化合物在 210 nm 以上没有明显紫外吸收, 其一级和二级质谱(356.191 1、384.273 3 和 455.256 8) (图 2 的 5B) 与绿僵菌素 Desmethyldestruxin C 标准品一致^[25]。数据查询发现金龟子绿僵菌中已有杀

虫活性物质 Desmethyldestruxin C 报道^[24], 其紫外和质谱特征与本研究分子 $C_{29}H_{49}N_5O_8$ 完全一致。

化合物 **6** (图 2 的 6A) 质荷比为 594.350 8 和 1 209.671 5, 分别为 $C_{29}H_{47}N_5O_8$ 的 $[M+H]^+$ 和 $[2M+Na]^+$ 峰, 误差分别为 $+0.5$ mD 和 -2.6 mD。该化合物的一级和二级质谱(340.207 6、453.306 5 和 481.301 7) (图 2 的 6B) 与绿僵菌素 Destruxin E 标准

品一致^[25]。其紫外也符合绿僵菌素类特征,都在 210 nm 以上没有明显特征吸收。数据查询发现该分子式在金龟子绿僵菌中报道的化合物是具有杀虫活性和免疫抑制活性的 Destruxin E^[24]。从来源、质谱和紫外特征可确定 $C_{29}H_{47}N_5O_8$ 对应的化合物是 Destruxin E。

化合物 7 (图 2 的 7A)质荷比为 564.339 8 和 586.321 0,分别为 $C_{28}H_{45}N_5O_7$ 的 $[M+H]^+$ 和 $[M+Na]^+$ 峰,误差分别为 +0.6 mD 和 -0.1 mD。该化合物的一级和二级质谱(334.208 2、423.188 2 和 451.254 2) (图 2 的 7B)与绿僵菌素 Destruxin A2 标准品一致^[25]。其紫外光谱符合绿僵菌素类特征。数据查询发现金龟子绿僵菌中已有杀虫活性化合物 Destruxin A2 报道^[24]。从精确一级二级质谱、来源和紫外特征可确定 $C_{28}H_{45}N_5O_7$ 对应化合物为 Destruxin A2。

化合物 8 (图 2 的 8A)质荷比为 578.355 8 和 1 177.680 7,分别为 $C_{29}H_{47}N_5O_7$ 的 $[M+H]^+$ 和 $[2M+Na]^+$ 峰,误差分别为 +1.0 mD 和 -3.6 mD。该化合物的一级和二级质谱(352.228 7、437.281 4 和 465.276 0) (图 2 的 8B)与绿僵菌素 Destruxin A2 标准品一致^[25]。数据查询发现该分子式在金龟子绿僵菌中报道的化合物是 Destruxin A,该化合物具有杀虫活性、免疫抑制活性、强心和诱导促红细胞生成素表达的活性^[24],标准品对照分析发现该化合物的保留时间和质谱与 Destruxin A 完全一致,因此可确定质荷比 578.355 8 对应的化合物为 Destruxin A。

图 2 中在 Destruxin A 的质谱后有 3 个质荷比为 580.37 和 1 181.71 的化合物质谱(图 2 的 9A、10A、11A),其对应的都是 $C_{29}H_{49}N_5O_7$ 的 $[M+H]^+$ 和 $[2M+Na]^+$ 峰,误差分别为 +0.4、-6.0、-0.5、-7.4、+0.6、-4.8 mD。其一级和二级质谱(图 2 的 9B、10B、11B)分别与 Desmethyldestruxin B、Dihydrodestruxin A 和 Destruxin B2 标准品一致^[25]。其紫外都有绿僵菌素类化合物特征。显然这 3 个

化合物应该是金龟子绿僵菌中报道的具有杀虫活性的 Desmethyldestruxin B、Dihydrodestruxin A 和 Destruxin B2。据报道该 3 个化合物在反相色谱中洗脱顺序依次为 Desmethyldestruxin B、Dihydrodestruxin A 和 Destruxin B2^[25],因此可知本研究的保留时间为 22.82、23.44 和 24.45 min,质荷比为 580.37 的化合物分别是 Desmethyldestruxin B、Dihydrodestruxin A 和 Destruxin B2。

化合物 12 (图 2 的 12A)质荷比为 443.280 4 和 885.549 5,分别为 $C_{27}H_{38}O_5$ 的 $[M+H]^+$ 和 $[2M+H]^+$ 峰,误差分别为 +1.6 mD 和 +1.6 mD。数据查询发现该分子式在罗伯茨绿僵菌(*M. robertsii*)中有对应的免疫抑制剂 Subglutinol C 报道,其紫外光谱也与本研究(图 2 的 12C)一致^[24,31],因此可初步确定该化合物为 Subglutinol C。该化合物在对照中含量最高而在组蛋白去乙酰化酶抑制剂处理的样品中含量不足对照的 5%,说明组蛋白去乙酰化酶抑制剂降低了该化合物的合成,其原因有待深入研究。

化合物 13 (图 2 的 13A)质荷比为 592.371 2 和 1 205.712 4,分别为 $C_{30}H_{49}N_5O_7$ 的 $[M+H]^+$ 和 $[2M+Na]^+$ 峰,误差分别为 +1.4 mD 和 -3.2 mD。该化合物的一级和二级质谱(366.223 2、451.290 4 和 479.300 6) (图 2 的 13B)与绿僵菌素 Destruxin A1 标准品一致^[25]。其紫外都有绿僵菌素类化合物特征。数据查询发现该分子式在金龟子绿僵菌中报道的是具有杀虫活性的化合物 Destruxin A1^[24]。该化合物在丁酸钠或 SAHA 处理的培养液中含量分别增加了 3.8 倍和 5.7 倍。

化合物 14 (图 2 的 14A)质荷比为 594.387 7 和 1 209.743 3,分别为 $C_{30}H_{51}N_5O_7$ 的 $[M+H]^+$ 和 $[2M+Na]^+$ 峰,误差分别为 +1.6 mD 和 +3.7 mD。该化合物的一级和二级质谱(340.207 2、453.306 0 和 481.302 4) (图 2 的 14B)与绿僵菌素 Destruxin B 标准品一致^[25]。其紫外光谱有绿僵菌素类化合物特征。数据查询发现该分子式在金龟子绿僵菌中对应化合物是 Destruxin B^[24]。从来源、一级和二级质

谱及紫外光谱可确定 $C_{30}H_{51}N_5O_7$ 是 Destruxin B。该化合物具有杀虫、诱导植物产生抗毒素、抗心律失常、乙型肝炎表面抗原抑制剂、免疫抑制剂和强心剂等活性^[24]。

化合物 15 (图 2 的 15A)质荷比为 608.402 5 和 1 237.776 7, 分别为 $C_{31}H_{53}N_5O_7$ 的 $[M+H]^+$ 和 $[2M+Na]^+$ 峰, 误差分别为 +0.7 mD 和 -1.5 mD。该化合物的一级和二级质谱(423.185 2、473.246 2 和 491.235 0) (图 2 的 15B)与绿僵菌素 Destruxin B1 标准品一致^[25]。其紫外有绿僵菌素类化合物特征。数据查询发现该分子式在金龟子绿僵菌中对应的是具有杀虫活性的 Destruxin B1^[24]。从来源、一级和二级质谱及紫外光谱可确定 $C_{31}H_{53}N_5O_7$ 是 Destruxin B1。

化合物 16 (图 2 的 16A)质荷比为 509.296 7 和 1 017.573 5, 分别为 $C_{24}H_{44}O_{11}$ 的 $[M+H]^+$ 和 $[2M+H]^+$ 峰, 误差分别为 +1.1 mD 和 -10.1 mD, 其紫外最大特征吸收峰在 229 nm (图 2 的 16C), 数据查询发现该分子式和紫外光谱与 Ustilagic Acid C 完全一致^[32]。其二级质谱(305.232 5、449.274 6 和 491.285 3) (图 2 的 16B)也有 Ustilagic Acid C 的脱水和酯键断裂形成的特征碎片峰, 因此可确定该化合物为 Ustilagic Acid C。据报道 Ustilagic Acid C 由玉米黑粉菌(*Ustilago maydis*)在 5-氮杂胞嘧啶核苷诱导下产生, 具有弱的抗真菌活性^[32]。该成分虽然在丁酸钠、5-氮杂胞嘧啶核苷和 5-氮杂-2'-脱氧胞嘧啶核苷处理的绿僵菌代谢物中含量较高, 但在 DMSO 对照处理中含量也不少, 因此该成分应该是金龟子绿僵菌正常代谢物之一, 只是上述试剂处理促进其合成或积累。

3 讨论与结论

从前面的分析可以看到 500 $\mu\text{mol/L}$ 的组蛋白去乙酰化酶抑制剂丁酸钠、苯甲酰胺和伏立诺他, 以及 500 $\mu\text{mol/L}$ DNA 甲基转移酶抑制剂 5-氮杂胞嘧啶核苷和 5-氮杂-2'-脱氧胞嘧啶核苷可使金龟子绿僵菌 Ma23 菌株的代谢物含量发生明显变化, 但

2 类抑制剂对代谢物的影响截然相反, 前者使代谢物含量普遍升高, 后者使代谢物含量普遍下降。变化较大的次生代谢产物有 12 种绿僵菌素类非核糖体肽和 4 种非肽类物质。antiSMASH 软件预测显示, 金龟子绿僵菌基因(GCA_013305495.1)的 50 个次生代谢产物基因簇中非核糖体肽基因簇占 21 个。虽然非核糖体肽基因簇数量仅占次生代谢产物基因簇总数的 42%, 但抑制剂处理后非核糖体肽类代谢物却占变化的主要次生代谢产物的 75%, 显然非核糖体肽类基因表达更易受到表观遗传酶类抑制剂影响。这些非核糖体肽类物质大多属于真菌毒素或具有特定的药用活性物质^[24], 因此其含量的升高或降低会直接影响到其代谢物的利用或生物安全。值得注意的是丁酸钠可使供试真菌毒素等代谢物含量普遍升高, 作为一种常用的饲料添加剂和食品风味剂, 其在饲料中添加浓度一般是本研究的 18 倍以上^[17], 其是否会放大饲料和食品加工过程中真菌有毒代谢物的污染值得深入研究。

虽然 3 种组蛋白去乙酰化酶抑制剂都能使大多数代谢物含量升高, 但具体升高的化合物种类及升高程度并不相同: 丁酸钠处理可使 16 种主要代谢物的 15 种含量升高, 其中 12-Hydroxyovalicin、Fungerin 和 Destruxin A1 都升高 3 倍以上; 苯甲酰胺可使 16 种中的 12 种含量升高, 但升高 3 倍以上的仅有 Fungerin; SAHA 虽然仅能使 16 种中的 10 种含量升高, 但升高 3 倍以上的达 4 种, 包 Hydroxyovalicin、Fungerin、Destruxin A1 和 Destruxin B1, 并且部分代谢物的升高幅度明显高于前两者, 如 Fungerin 升高达 63.6 倍。除使不同代谢物含量升高外, 3 种抑制剂都使 Subglutinol C 含量降低到对照的 5% 以下, 可见, 这些组蛋白去乙酰化酶抑制剂的具体作用既有相同的地方也有不同的地方。Subglutinol C 是二萜类衍生物, 在金龟子绿僵菌中总共有 6 个萜类基因簇, 但报道的萜类物质并不多, 也无化学抑制剂对萜类合成影响的报道。

2 种 DNA 甲基转移酶抑制剂对金龟子绿僵菌代谢的影响基本一致, 除 2 种非肽类代谢物外, 其余 14 种代谢物含量普遍下降, 其原因一方面可能与真菌的 DNA 甲基化率非常低有关^[27], 另一方面可能与金龟子绿僵菌在非核糖体肽的合成过程中存在频繁的甲基转移有关, 大量绿僵菌素如 Dihydrodestruxin A、Destruxin B2 和 Desmethyldestruxin B 等仅有 1 个甲基位置差异^[24-25,33], 但是 DNA 甲基转移酶是如何影响到非核糖体肽合成过程中的甲基转移有待深入研究。

5 种抑制剂对金龟子绿僵菌代谢唯一共同的影响是促进了 Fungerin 合成, 其含量都升高 5 倍以上。Fungerin 是咪唑类生物碱, 是组氨酸衍生物^[34]。该化合物在抑制剂处理组中普遍增高, 表明不仅组蛋白去乙酰化酶抑制剂能影响到组氨酸代谢, DNA 甲基转移酶抑制剂也能影响到组氨酸的相关代谢。

虽然本研究首次在金龟子绿僵菌中发现 Subglutinol C、Fungerin 和 Ustilagic acid C, 但这 3 种化合物并不是因为抑制剂的作用而产生, 因为对照组中也有, 并且 Subglutinol C 在对照组中含量最高。

总之, 表观遗传的化学干预可使金龟子绿僵菌代谢物出现明显变化, 其中组蛋白去乙酰化酶抑制剂可普遍上调金龟子绿僵菌的绿僵菌素类代谢物及部分非肽类物质代谢, 而 DNA 甲基转移酶抑制剂可普遍下调金龟子绿僵菌的绿僵菌素类代谢物, 仅少数非肽类物质代谢物含量升高。由于这些代谢物具有显著的杀虫、免疫抑制或抗菌等生物活性, 其含量变化会直接影响到金龟子绿僵菌对环境生物的作用和自身利用价值。丁酸钠是一种较常用的饲料和食品添加剂, 可通过食物链进入环境中, 作为一种组蛋白去乙酰化酶抑制剂, 可明显提高金龟子绿僵菌的次生代谢产物的量, 该物质对环境其他产毒微生物代谢是否有类似影响值得深入研究。

REFERENCES

- [1] Fan A, Mi W, Liu Z, Zeng G, Zhang P, Hu Y, Fang W, Yin WB. Deletion of a histone acetyltransferase leads to the pleiotropic activation of natural products in *Metarhizium robertsii*[J]. Organic Letters, 2017, 19(7): 1686-1689
- [2] Chung YM, El-Shazly M, Chuang DW, Hwang TL, Asai T, Oshima Y, Ashour AL, Chang FR. Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, induces the production of anti-inflammatory cyclodepsipeptides from *Beauveria feline*[J]. Journal of Natural Products, 2013, 76(7): 1260-1266
- [3] Sun J, Takayoshi A, Noguchi H, Abe I. Induced production of mycotoxins in an endophytic fungus from the medicinal plant *Datura stramonium* L.[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2012, 22(20): 6397-6400
- [4] Fisch KM, Gillaspay AF, Gipson M, Henrikson JC, Hoover AR, Jackson L, Najar FZ, Wagele H. Chemical induction of silent biosynthetic pathway transcription in *Aspergillus niger*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2009, 36(9): 1199-1213
- [5] Yakasai A, Davison J, Wasil Z, Laura MH, Craig PB, Colin ML, Andrew M. Nongenetic reprogramming of a fungal highly reducing polyketide synthase[J]. Journal of the American Chemical Society, 2011, 133(28): 10990-10998
- [6] Khan AA, Bacha N, Ahmad B, Bakht J, Ali J. Synthesis of secondary metabolites by *Cladosporium resinae* (nrl-6437) under different growth media and chemical inducers and their pharmaceutical activity[J]. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 2017, 30(5): 1617-1624
- [7] Williams R, Henrikson J, Hoover A, Lee AE, Cichewicz RH. Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome[J]. Organic & Biomolecular Chemistry, 2008, 6(11): 1895-1897
- [8] Asai T, Yamamoto T, Chung YM, Chang FR, Wu RC, Yamashita K. Aromatic polyketide glycosides from an entomopathogenic fungus, *Cordyceps indigotica*[J]. Tetrahedron Letters, 2012, 53(3): 277-280
- [9] Bergmann S, Schumann J, Scherlach K, Corinna L, Axel BA, Hertweck C. Genomics-driven discovery of PKS-NRPS hybrid metabolites from *Aspergillus nidulans*[J]. Nature Chemical Biology, 2007, 3(4): 213-217
- [10] Qadri M, Nalli Y, Jain SK, Chaubey A, Ali A, Strobel GA. An insight into the secondary metabolism of *Muscador yucatanensis*: small-molecule epigenetic modifiers induce expression of secondary metabolism-related genes and production of new metabolites in the endophyte[J]. Microbial Ecology, 2017, 73(4): 954-965
- [11] Wang X. Chemical epigenetics alters the secondary metabolite composition of guttate excreted by an atlantic-forest-soil-derived *Penicillium citreonigrum*[J]. Journal of Natural Products, 2016, 73(5): 942-948
- [12] Yang XL, Huang L, Ruan XL. Epigenetic modifiers alter the secondary metabolite composition of a plant endophytic fungus, *Pestalotiopsis crassiuscula* obtained from the leaves

- of *Fragaria chiloensis*[J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2014, 16(4): 412-417
- [13] Savickiene J, Treigyte G, Jazdauskaite A, Borutinskaite V, Viktorija N. DNA methyltransferase inhibitor rg108 and histone deacetylase inhibitors cooperate to enhance nb4 cell differentiation and e-cadherin re-expression by chromatin remodelling[J]. Cell Biology International, 2012, 36(11): 1067-1078
- [14] Asai T, Chung YM, Sakurai H, Ozeki T, Chang FR, Yamashita K. Tenuipyrone, a novel skeletal polyketide from the entomopathogenic fungus, *Isaria tenuipes*, cultivated in the presence of epigenetic modifiers[J]. Organic Letters, 2012, 14(2): 513-515
- [15] Liu BL, Tzeng YM. Development and applications of destruxins: a review[J]. Biotechnology Advances, 2012, 30(6): 1242-1254
- [16] Zhao P, Xue Y, Li X, Zu X, Zhao Z, Quan C, Gao W, Feng S. Fungi-derived lipopeptide antibiotics developed since 2000[J]. Peptides, 2019, 113: 52-65
- [17] Zhao HB. Research progress on the effect of sodium butyrate on poultry intestinal health[J]. Feed Research, 2020, 8: 120-123 (in Chinese)
赵怀宝. 丁酸钠对家禽肠道健康影响的研究进展[J]. 饲料研究, 2020, 8: 120-123
- [18] Sonia F, Nicola V, Matteo C, Andrea B, Chiara R, Daniel P, Barbara P, Greta L, Carla M, Renata D, et al. Microbiota changes induced by microencapsulated sodium butyrate in patients with inflammatory bowel disease[J]. Neurogastroenterology & Motility, 2020, 32(10): e13914
- [19] Deng X, Wang N, Meng L, Zhou S, Huang J, Xing J, He L, Jiang W, Li Q. Optimization of the benzamide fragment targeting the S2' site lead stopotent dipeptidylpeptidase-IV inhibitors[J]. Bioorganic Chemistry, 2020, 94: e103366
- [20] Straniero V, Suigo L, Casiraghi A, Sebastián-Pérez V, Hrast M, Zanutto C, Zdovec I, Morghen CD, Radaelli A, Valoti E. Benzamide derivatives targeting the cell division protein FtsZ: modifications of the linker and the benzodioxane scaffold and their effects on antimicrobial activity[J]. The Journal of Antibiotics, 2020, 9(4): e9040160
- [21] Wang XR, Yang X, Wang Y, Wu XH, Tang M, Luo CL. Inducing apoptosis of bladder cancer cell T24 by 5-azacytidine combine with adenovirus hepa CAM via inhibiting p-AKT[J]. Journal of Chongqing Medical University, 2014, 39(6): 762-767 (in Chinese)
王晓荣, 杨雪, 王胤, 吴小侯, 唐敏, 罗春丽. 5-氮杂胞嘧啶核苷联合 hepaCAM 腺病毒通过抑制 p-AKT 诱导膀胱癌细胞 T24 凋亡[J]. 重庆医科大学学报, 2014, 39(6): 762-767
- [22] Fang ZX, Huang ZC. Effects of 5-Aza-2'-deoxycytidine on proliferation of human gastric cancer BCG-823 cells and the expression of *HOXA5* gene[J]. Journal of Chinese Physician, 2016, 12: 1825-1828 (in Chinese)
- 房志学, 黄忠诚. 5-氮杂-2'-脱氧胞苷对人胃癌 BCG-823 细胞系增殖及 *HOXA5* 基因表达的影响[J]. 中国医师杂志, 2016, 12: 1825-1828
- [23] Ammanamanchi S, Brattain MG. 5-azacytidine and 5-aza-2[prime]-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy[J]. Oncogene, 2002, 21(35): 5483-5495
- [24] Taylor & Francis Group, Dictionary of Natural Products 29.1[M]. CRC Press, Abingdon, England, 2020
- [25] Taibon J, Sturm S, Seger C, Sonja, Parth M, Strasser H, Stuppner H. Development of a fast and selective UHPLC-DAD-QTOF-MS/MS method for the qualitative and quantitative assessment of destruxin profiles[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014, 406(29): 7623-7632
- [26] Peng GX, Zhang SL, Xia YX. *Metarhizium anisopliae* CQMa421 and its application status[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2020, 36(6): 850-857
彭国雄, 张淑玲, 夏玉先. 金龟子绿僵菌 CQMa421 农药及应用情况[J]. 中国生物防治学报, 2020, 36(6): 850-857
- [27] Mondo SJ, Dannebaum RO, Kuo RC, Louie KB, Grigoriev IV. Widespread adenine N6-methylation of active genes in fungi[J]. Nature Genetics, 2017, 49(6): 964-968
- [28] Kuboki H, Tsuchida T, Wakazono K, Isshiki K, Kumagai H, Yoshioka T. Mer-*f*3, 12-hydroxy-ovalicin, produced by *Metarrhizium* sp. *f*3[J]. The Journal of Antibiotics, 1999, 52(6): 590-593
- [29] Koizumi Y, Arai M, Tomada H, Omura I. Fungerin, a fungal alkaloid, arrests the cell cycle in M phase by inhibition of microtubule polymerization[J]. The Journal of Antibiotics, 2004, 57(7): 415-420
- [30] Loutelier C, Cherton JC, Lange C, Traris M, Vey A. Studies on the dynamics of the production of destruxins by *Metarhizium anisopliae* direct high-performance liquid chromatographic and fast atom bombardment mass spectrometric analysis correlated with biological activity tests[J]. Journal of Chromatography A, 1996, 738: 181-189
- [31] Kato H, Tsunematsu Y, Yamamoto T, Namiki T, Kishimoto S, Noguchi H, Watanabe K. New natural products isolated from *Metarhizium robertsii* ARSEF 23 by chemical screening and identification of the gene cluster through engineered biosynthesis in *Aspergillus nidulans* A1145[J]. The Journal of Antibiotics, 2016, 69: 561-566
- [32] Yang XL, Awakawa T, Wakimoto T, Abe I. Induced production of the novel glycolipid ustilagic acid C in the plant pathogen *Ustilago maydis*[J]. Tetrahedron Letters, 2013, 54: 3655-3657
- [33] Pais M, Das BC, Ferron P. Dipeptides from *Metarhizium anisopliae*[J]. Phytochemistry, 1981, 20: 715-723
- [34] Przybyla D, Nubbemeyer U. 4,5-Disubstituted 1-methylimidazoles via cyclization of defined α -aminoketones: synthesis of fungerin and analogues I[J]. Synthesis, 2017, 49(4): 770-774