

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (1) :33 - 41; 4 January 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.01.005

代谢组学方法鉴定球孢白僵菌孢子萌发和杀虫毒力相关的标记物

罗飞飞, 李淑林, 陈龙云, 张万存, 王滨, 黄勃, 胡丰林*

安徽省微生物防治省重点实验室, 安徽农业大学, 安徽 合肥 230036

摘要: 【目的】识别球孢白僵菌萌发和杀虫毒力相关的标记物。 【方法】本研究对 7 个球孢白僵菌菌株的孢子进行萌发率和对茶毛虫毒力进行测定, 采用基于 LC-MS 的代谢组学方法, 识别菌丝和孢子提取物中与萌发和毒力有关的标记物。 【结果】高毒力菌株的菌丝中具有高含量的 carnitine、hercynine、acetylcarnitine、 α, α -trehalose; Octa-Me、arg-arg-gln、phosphatidylethanolamine [PE (18:2/0:0)]、phosphatidylcholine [PC (18:3/0:0)] 和 PC (18:2/0:0)。高萌发率菌株的孢子中具有高含量的 2,3-dimethylmaleate、acetylcarnitine、propionyl-carnitine 和 PC (18:2/0:0)。高毒力菌株的孢子中具有高含量的 histamine、2,5-pyrrolidinedicarboxylic acid; Diamide、carnitine、acetylcarnitine、propionyl-carnitine、butyrylcarnitine、PE (18:2/0:0)、PC (16:1/0:0) 和 PC (18:3/0:0)。此外, 对菌丝中杀虫相关的环肽 beauverolides, beauvericins 和 bassianolide 进行相对含量比较分析, 发现单独一种肽的含量高低与菌株对茶毛虫的毒力没有直接关系, 但高毒力的 Bb1898 菌株中的 9 种肽同时具有较高的含量暗示它们可能发挥协同作用。 【结论】毒力和萌发的共同标记物是脂酰肉碱和磷脂, 它们可能具有维持附着胞膨压和为穿透寄主提供能量的功能。其它标记物, 如在高毒力菌丝中发现的 hercynine 和 α, α -trehalose; 高萌发率孢子中的 2,3-dimethylmaleate, 高毒力孢子中的 histamine 和 2,5-pyrrolidinedicarboxylic acid Diamide, 它们的作用原理有待进一步研究。

关键词: 球孢白僵菌, 代谢组学, 液质联用, 萌发, 毒力, 标记物

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2014) 01-0033-09

球孢白僵菌 (*Beauveria bassiana*) 是世界上最重要的昆虫病原真菌之一, 可在人工培养基上进行大规模的商业化生产, 但在实际应用中人们发现, 球孢白僵菌孢子产品常常由于生产菌种退化、生产工艺或储藏条件不当, 使得孢子萌发率下降, 对害虫的毒力减弱, 大大降低球孢白僵菌的应用效果。为解决这些问题, 国内外学者投入了大量精力, 对球孢白僵

菌的抗逆因子及毒力因子进行研究, 先后在球孢白僵菌中发现了与孢子产量和耐热性有关的 G 蛋白信号调节基因 *Bbrgs1*^[1]、与胁迫保护和调节疏水性基因表达有关的蛋白激酶 (MAPK) 编码基因 *Bbhog1*^[2]、与附着胞的形成和穿透昆虫表皮有关的 *Bbmph1*^[3] 基因等。研究还发现脂酶 (lipase)、几丁质酶 (chitinase) 和类枯草杆菌蛋白酶 (Pr1) 等在球

基金项目: 国家“863 计划” (2011AA10A203, 204); 安徽省自然科学基金 (11040606M69, KJ2012A107)

* 通信作者。Tel/Fax: + 86-551-65786887; E-mail: hufenglin@ hotmail.com

作者简介: 罗飞飞 (1989 -), 男, 安徽蚌埠人, 硕士研究生, 研究方向为微生物与生物制药。

收稿日期: 2013-05-05; 修回日期: 2013-06-23

孢白僵菌孢子活力保持及毒力中也具有重要作用^[4-6]。然而,上述有关球孢白僵菌孢子活力和毒力的因子仅仅是相关功能的必要条件之一而非充分条件,例如球孢白僵菌某些菌株虽具有较高的 Pr1 活性但毒力却较低^[7]。除大分子酶类因子外,真菌毒素也是球孢白僵菌的重要毒力因子之一^[8]。虽然目前已有较多关于球孢白僵菌的萌发和毒力相关研究报道,但仍缺乏全面而系统的有关球孢白僵菌孢子萌发和毒力的标记物研究。

在细胞中,酶是基因表达的产物,酶的反应速率受到小分子底物和代谢产物浓度的影响,同时有些小分子还是代谢的调节因子,小分子代谢物可提供细胞的全面代谢信息^[9]。基于小分子代谢物分析的代谢组学方法可实现高通量地分析具有表型、基因型或功能差异样品间小分子代谢物差异,并可进一步建立代谢物差异与关键酶差异及基因差异间关系。该方法,已被广泛用于功能基因研究^[10]和各种疾病标记物的鉴别^[11-13],然而该方法目前尚未应用于球孢白僵菌中有关萌发和毒力的代谢标记物研究。为了系统地揭示有关球孢白僵菌孢子萌发和毒力标记物,进一步为孢子萌发和致毒性的机制研究提供依据。本研究将在 HPLC-TOFMS 的分析基础上,用代谢组学方法识别不同萌发率和毒力的球孢白僵菌菌株中菌丝和孢子的标记代谢物,有关研究将不仅能加快菌株筛选速率和进行产品质量实时控制,提高生防效率,而且有益于虫生真菌代谢物功能的研究,具有较大的实践价值和理论价值。

1 材料和方法

1.1 菌株和培养

球孢白僵菌 Bb13、Bb36、Bb202、Bb398、Bb538、Bb1898 和 Bb1448 均来自安徽农业大学微生物防治重点实验室。球孢白僵菌接种在 SDAY 培养基(葡萄糖 40 g/L,蛋白胨 10 g/L,酵母粉 10 g/L,琼脂 20 g/L)上,25℃培养15 d,用 0.03%吐温 80 冲洗菌落,孢子悬液经灭菌的脱脂棉过滤后计数并稀释至 2×10^6 spores/mL,取 200 μ L 均匀涂布在铺有玻璃纸的 SDAY 培养基上,25℃培养15 d。

1.2 主要仪器和试剂

高分辨液质联用分析仪(Agilent 6210 Time of Flight LC/MS),包括 Agilent1100 高效液相色谱

(HPLC),二极管阵列检测器(DAD),飞行时间质谱仪(TOF)和电喷雾离子源(ESI),购于美国 Agilent 公司;分析型色谱柱 Agilent Eclipse XDB-C18 (5 μ m, 2.1 mm \times 150 mm),购于美国 Agilent 公司;电子天平(AN0635),购于上海民桥精密科学仪器公司;FreeZone12 冷冻干燥系统,购于自美国 Labonconco 公司;2K-15 超速离心机,购于 Sigma 公司;KQ5 200DE 型数控超声波清洗器,购于昆山市超声仪器有限公司。色谱纯甲醇和乙腈,购于美国 Tedia 公司。色谱纯甲酸,购于 Agilent 公司。

1.3 萌发率测试

1×10^6 spores/mL 孢子悬液取 10 μ L 滴在涂有 SDAY 培养基的载玻片上,25℃培养14 h后,在普通光学显微镜下 400 \times 观察,选取 3 个视野,芽管长度 \geq 孢子直径即认为萌发,每个菌株 3 个重复。

1.4 毒力测试

3 龄茶毛虫幼虫浸沾在 20 mL 的 1×10^7 spores/mL 孢子悬液或 0.03%吐温 80 (对照) 3 s 后,放入装有叶片的一次性杯中,用纱布封口,在 25℃,相对湿度 $>90\%$ 的环境下饲养14 d,每隔 24 h 更换新鲜叶片并记录死亡个数。每个菌株 3 个重复,每个重复 10 只幼虫。

1.5 样品处理

菌株培养15 d后将菌落刮入50 mL离心管,加入 20 mL 0.03%吐温 80 涡旋3 min,经 20 μ m 滤布过滤至 50 mL 离心管,再用 20 mL 蒸馏水冲洗菌丝,菌丝装入 5 mL 离心管,放入液氮中冷冻,随后 -80°C 保存。孢子悬液 $5700 \times g$ 离心 10 min,用 2 mL 蒸馏水将沉淀涡旋打散再装入 5 mL 离心管, $5600 \times g$ 离心 10 min,孢子沉淀 -80°C 保存。每个菌株 5 个重复。菌丝和孢子冻干 48 h 后将菌丝粉碎。菌株分别称取 10 mg 冻干的菌丝和孢子,各加入 2 mL 80% 甲醇涡旋 30 s,超声提取 1 h 后 4°C 静置 10 h。提取物 $5600 \times g$ 离心 10 min,取 1.8 mL 上清,真空浓缩干燥,置 -80°C 保存。HPLC-MS 分析前用 300 μ L 90% 甲醇超声复溶并经 0.22 μ m 滤膜过滤。

1.6 HPLC-MS 分析

色谱条件:进样体积 5 μ L,柱温 40°C ,流速 0.3 mL/min,流动相:A = 0.1% 甲酸的水溶液,B = 0.1% 甲酸的乙腈,洗脱程序:0-5 min,5% B;5-50 min,5% - 100% B;50-60 min,100% B。质谱条件:阳离子模式,氮气用作干燥气,氮气温度

350℃, 氮气流速12 L/min, 雾化气压35 psi, 毛细管电压4000 V, 碎裂电压215 V, 锥孔电压60 V, 质量采集范围50 - 1000 Da。

1.7 数据处理和统计分析

LT₅₀ 计算及萌发率和毒力分析的 One-way ANOVA 和 post hoc analysis (Tukey LSD) 使用 SPSS 19.0 ($P < 0.05$)。原始 LC-MS 数据用 MassHunter software (Agilent Technologies, USA) 的 Molecular Feature Extraction (MFE) 运算进行自动峰检测和色谱去卷积 (deconvolution), 信噪比小于 5 的峰将被去除, 再将每个样品的峰表导出。数据上传至 MetaboAnalyst^[14-15] 进行峰对齐和滤噪, 质量偏差 0.01Da, 时间偏差 0.5min, 数据进行 sum 标准化及 pareto scaling 处理^[13]。正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal projection on latent structures discriminant analysis, OPLS-DA) 使用 SIMCA-P 12.0 (Umetrics, Umeå, Sweden), t-test 和盒须图使用 MetaboAnalyst。

1.8 代谢物识别

代谢物识别是根据: (1) 将 Masshunter 基于化合物质谱特征、精确质荷比和同位素模式识别计算的分子式与本室积累的昆虫病原真菌天然产物数据库和网络数据库 (Dictionary of Natural Products (DNP), METLIN 等) 搜索匹配, 确定潜在的标记物; (2) 用代谢物的质量碎片与 METLIN 和 MASSBANK 中相同的或具有类似结构的化合物的质谱比对; (3) 通过代谢物的洗脱顺序 (极性) 与其结构性质进行验证; (4) 查阅关于真菌尤其昆虫病原真菌的代谢物报道验证。

2 结果

2.1 菌株的萌发率和毒力

球孢白僵菌菌株 Bb36、Bb398 和 Bb1448, 与其它菌株的孢子萌发率差异显著, 图 1-A。Bb36 ($3.39 \pm 0.45\%$)、Bb202 ($42.28 \pm 1.70\%$)、Bb538 ($45.37 \pm 2.06\%$)、Bb1898 ($83.13 \pm 2.55\%$)、Bb398 ($13.84 \pm 3.24\%$)、Bb1448 ($28.47 \pm 1.75\%$)、Bb13 ($43.54 \pm 1.88\%$)。所测菌株的孢子萌发率范围在 3.39% - 83.13%, Bb202、Bb538、Bb1898 和 Bb13 的萌发率较高。菌株 Bb36 和 Bb1448 的孢子对茶毛虫的毒力 (LT₅₀) 与其它菌株相比差异显著且毒力最弱, 图 1-B。Bb36 (12.47 ± 0.08 d)、Bb202 ($2.72 \pm$

0.08 d)、Bb538 (2.80 ± 0.16 d)、Bb1898 (2.37 ± 0.16 d)、Bb398 (2.46 ± 0.25 d)、Bb1448 (>14 d)、Bb13 (3.84 ± 0.07 d)。所测菌株的 LT₅₀ 范围为 2.37 d - >14 d。萌发率最高的菌株 Bb1898 具有最高的毒力, Bb1448 的萌发率虽大于 Bb398 但其毒力却最弱。

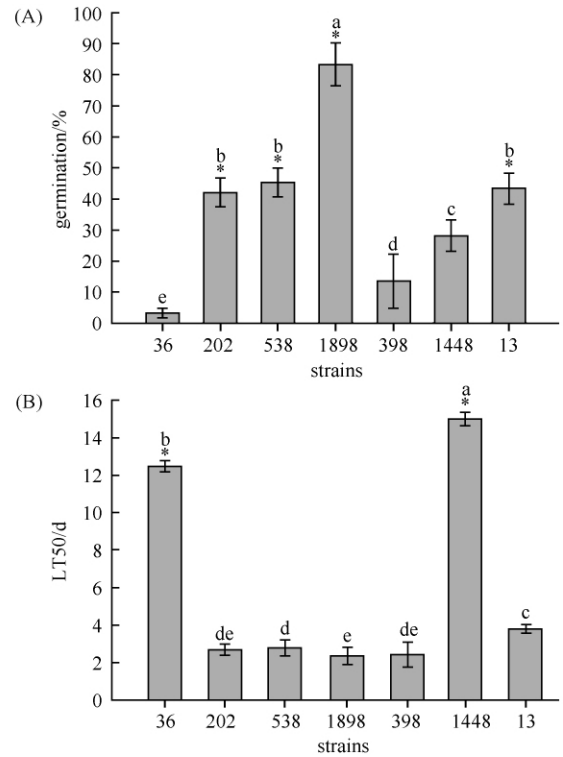


图 1. 球孢白僵菌 7 个菌株的孢子萌发率 (A) 和毒力 (B)
Figure 1. Spore germination rate (A) and virulence (B) of seven *B. bassiana* isolates under the same condition. * $P < 0.05$ on the ANOVA followed by Turkey's post hoc test (mean \pm S. D.).

2.2 LC-MS 的代谢组学分析

为了识别对分组影响最大的差异代谢物, 我们对菌丝和孢子的 LC-MS 数据作了 OPLS-DA, 模型构建使用 1 个预测成分和 4 个正交成分。通常 R^2X 、 R^2Y 和 Q^2 都大于 0.5, 表明模型具有较高的准确性和预测能力^[16]。随后用 S-plot 识别与分组相关的潜在标记物, S plot 中 $w(1)$ 和 $p(\text{corr})$ 分别 $\geq |0.05|$ 和 $|0.45|$ 并且经 t-test 后, $P < 0.05$ 的代谢物最终被识别为标记物。

2.2.1 菌丝中毒力的标记物: 图 2-A 显示球孢白僵菌菌丝提取物按毒力的差异构建的 OPLS-DA score plot, $R^2X = 0.455$, $R^2Y = 0.993$, $Q^2 = 0.878$ 。高毒力菌株和低毒力的菌株在 OPLS1 上清晰地分为两

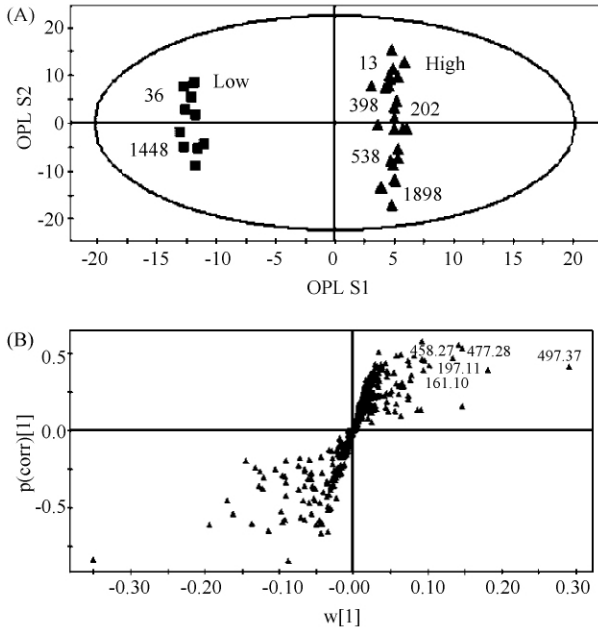


图 2. 菌丝提取物中高毒力对低毒力的 OPLS-DA score plot (A) 及相应的 S-plot (B)

Figure 2. OPLS-DA score plot (A) of high virulence vs. low virulence strains, and complementary S-plot (B) derived from a LC-MS data set of mycelia extracts. The number in score plot and S-plot indicates the strain number and molecular mass of biomarker, respectively.

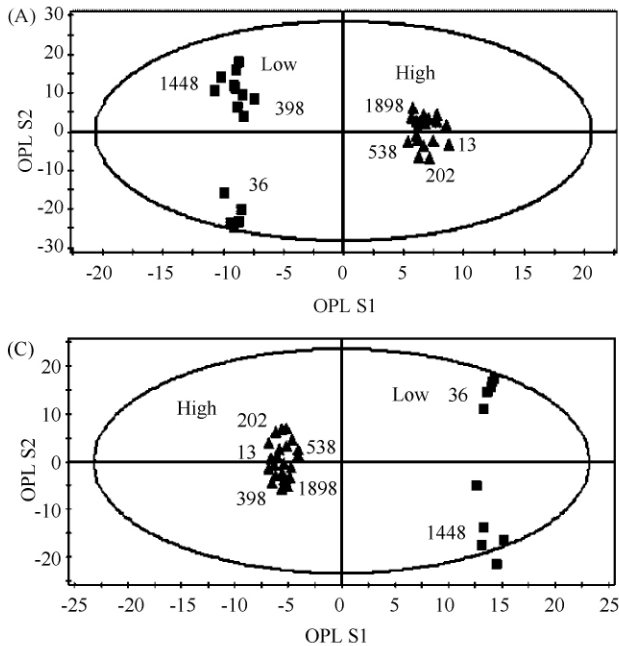


图 3. 孢子提取物中高萌发率对低萌发率 (A), 高毒力对低毒力 (C) 的 OPLS-DA score plots, 及相应的 S-plots (B, D)

Figure 3. OPLS-DA score plots of high germination vs. low germination strains (A), high virulence vs. low virulence strains (C), and complementary S-plots (B, D) derived from a LC-MS data set of spore extracts. The number in score plots and S-plots indicates the strain number and molecular mass of biomarker, respectively.

组。OPLS-DA 模型相对应的 S-plot 显示两组样品中与分组最相关的代谢物 (图 2-B), 识别的标记物列于表 1。高毒力菌株 Bb202、Bb538、Bb1898、Bb398 和 Bb13 中含有高含量的 carnitine、hercynine、acetylcarnitine、 α 、 α -trehalose; Octa-Me、arg-arg-gln、PE (18:2/0:0)、PC (18:3/0:0) 和 PC (18:2/0:0)。

2.2.2 孢子中萌发和毒力的标记物: 对球孢白僵菌孢子提取物的 LC-MS 数据集分别按萌发率和毒力的差异构建 OPLS-DA 模型, $R^2X = 0.503$, $R^2Y = 0.988$, $Q^2 = 0.781$, 图 3-A; $R^2X = 0.502$, $R^2Y = 0.993$, $Q^2 = 0.839$, 图 3-C。高萌发率和低萌发率的菌株, 以及高毒力和低毒力的菌株在 OPLS1 上明显分开, 相对应的 S-plot 显示两组样品中与分组最相关的代谢物 (图 3-B, D), 识别的标记物列于表 1。

高萌发率菌株 Bb202、Bb538、Bb1898 和 Bb13 中含有高水平的 2, 3-dimethylmaleate、acetylcarnitine、propionyl-carnitine 和 PC (18:2/0:0)。Histamine、2,5-pyrrolidinedicarboxylic acid; Diamide、carnitine、acetylcarnitine、propionyl-carnitine、butyryl carnitine、PE (18:2/0:0)、PC (16:1/0:0) 和 PC (18:3/0:0) 在高毒力菌株 Bb202、Bb538、Bb1898、Bb398

表 1. 球孢白僵菌中萌发及毒力的标记物
Table 1. Biomarkers of germination and virulence of *B. bassiana*

tentative identity	molecular formula	retention time /min	detected mass	theoretical mass	mycelia virulence	conidia	
						germination	virulence
histamine	C ₅ H ₉ N ₃	1. 63	111. 07991	111. 07965			+
2, 3-dimethylmaleate	C ₆ H ₈ O ₄	1. 62	144. 04235	144. 04226		+	
2,5-pyrrolidinedicarboxylic acid diamide	C ₆ H ₁₁ N ₃ O ₂	1. 63	157. 08527	157. 08513			+
carnitine	C ₇ H ₁₅ NO ₃	1. 19	161. 10492	161. 10519	+		+
hercynine (histidine betaine)	C ₉ H ₁₅ N ₃ O ₂	1. 08	197. 11628	197. 11643	+		
acetylcarnitine	C ₉ H ₁₇ NO ₄	1. 28	203. 11556	203. 11576	+	+	+
propionyl-carnitine	C ₁₀ H ₁₉ NO ₄	2. 01	217. 13138	217. 13141		+	+
butyryl carnitine	C ₁₁ H ₂₁ NO ₄	4. 1	231. 14657	231. 14706			+
octamethyl- α , α -trehalose	C ₂₀ H ₃₈ O ₁₁	13. 4	454. 24117	454. 24141	+		
arg-arg-gln	C ₁₇ H ₃₄ N ₁₀ O ₅	14. 29	458. 27242	458. 27136	+		
PE (18:2/0:0)	C ₂₃ H ₄₄ NO ₇ P	32. 93	477. 28479	477. 28554	+		+
PC (16:1/0:0)	C ₂₄ H ₄₈ NO ₇ P	31. 89	493. 31672	493. 31684			+
unkonwn 1	C ₂₈ H ₅₁ NO ₆	35. 25	497. 37033	497. 37164	+	+	+
PC (18:3/0:0)	C ₂₆ H ₄₈ NO ₇ P	31. 07	517. 31582	517. 31684	+		+
PC (18:2/0:0)	C ₂₆ H ₅₀ NO ₇ P	33. 35	519. 33192	519. 33249	+	+	

“+” refers to identified biomarkers in mycelia or conidia extracts from seven isolates. Abbreviations: PE, phosphatidylethanolamine; PC, phosphatidylcholine.

和 Bb13 含量较高。孢子中高萌发率和毒力的共同标记物是 acetylcarnitine 和 propionyl-carnitine。

2.3 菌丝中杀虫肽的含量

球孢白僵菌菌丝中含有多种具有杀虫活性的环肽,如 beauverolides、beauvericins 和 bassianolide (图 4)。Bb13 具有高含量的 beauverolide La、beauverolide B、beauverolide C 和 beauverolide Ka。Bb1448 具有高含量的 beauverolide La、beauverolide A、beauverolide B、beauverolide C 和 beauverolide Ka。Bb1898 除了 beauverolide A,其余肽类含量都较高。在 Bb202 中,这 10 中环肽的含量都较低。Bb36 含有中等含量的 beauverolide B、beauverolide C 和 beauverolide Ka。Bb398 具有较高水平的 beauverolide C 和 beauverolide Ka。Bb538 含有中等含量的 beauverolide C。其中,beauverolide A 只在低毒力的 Bb1448 中具有高含量,而 beauverolide D、beauvericin、beauvericin A、beauvericin B 和 bassianolide 只在高毒力的 Bb1898 中含量较高。这些结果表明,菌丝中 1 种杀虫肽的含量高低与菌株对茶毛虫的毒力没有直接关系,但高毒力的 Bb1898 中 9 种肽同时具有较高的含量暗示它们可能发挥协同作用。

3 结论和讨论

本研究发现,球孢白僵菌孢子和菌丝中,共同的毒力标记物是脂酰肉碱和磷脂,表明脂代谢对毒力具有重要影响。真菌细胞质中的脂肪酸先活化为脂酰 CoA,然后转运到过氧化物酶体,发生氧化分解生成乙酰 CoA,再生成乙酰肉碱转运到线粒体中,最后重新生成乙酰 CoA 参与三羧酸循环^[17]。据报道,脂酰 CoA 的肉碱转运对病原真菌的附着胞形成和菌丝侵染具有重要影响^[18-19]。

高毒力孢子中, acetylcarnitine 和 butyryl carnitine 含量较高,暗示它们可能是乙酰 CoA 的储备形式。当外界环境适宜时,脂酰肉碱转化为乙酰 CoA 进入三羧酸循环,为侵染昆虫供应能量。此外,孢子中的脂酰肉碱较高表明细胞质中具有高含量的脂酰 CoA,脂酰 CoA 可与三磷酸甘油生成磷脂酸,再生成甘油磷脂 (glycerophospholipid),这与高毒力孢子中具有高含量的磷脂一致。磷脂是细胞膜的组成成分,它可能与附着胞的形成有关。研究发现,病原真菌附着胞形成的巨大膨压主要由于细胞中积累了大量的甘油,甘油在附着胞形成过程迅速合成。

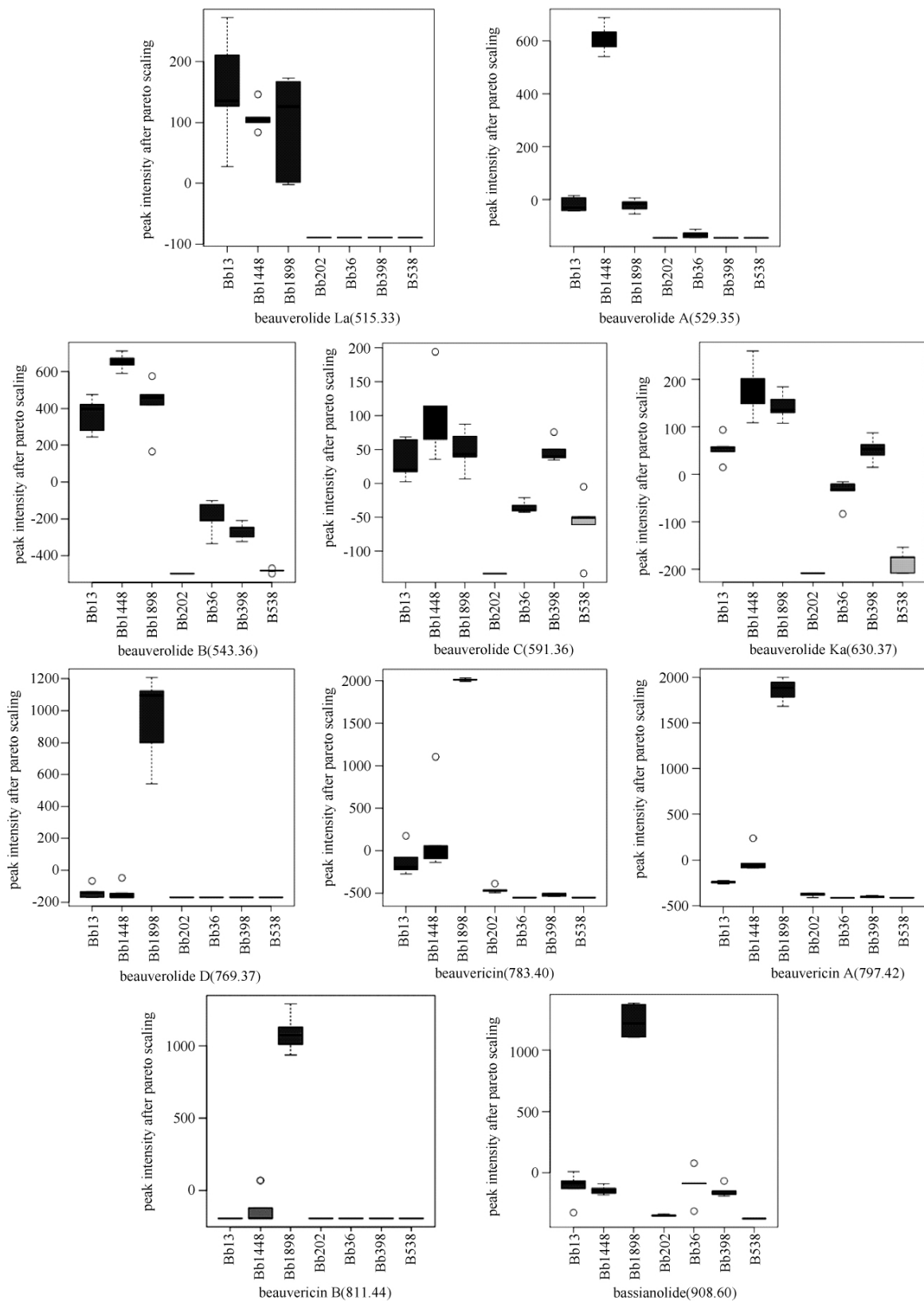


图 4. 菌丝中 beauverolides、beauvericins 和 bassianolide 的相对含量盒须图

Figure 4. Box-and-whisker plots of relative content of beauverolides, beauvericins and bassianolide in mycelia extracts from seven isolates of *B. bassiana*. The number in bracket indicates molecular mass.

在成熟的附着胞中含有大量脂酶, 脂质体在附着胞的一端脂解, 释放甘油^[20-21]。在金龟子绿僵菌 (*Metarhizium anisopliae*) 中有一个蛋白 MPL 1 调节脂代谢, 脂滴的水解产物被转移至附着胞内维持膨压, 缺失该基因, 附着胞的膨压和孢子毒力显著降低^[22]。孢子中毒力标记物还有 histamine 和 2, 5-pyrrolidinedicarboxylic acid Diamide, 它们的作用机制尚属未知。

高毒力菌丝中具有高含量的 carnitine、acetylcarnitine 和磷脂, 表明脂代谢增强可能提高了菌丝的生长速率, 有利于迅速侵占虫体, 加速寄主死亡。据报道, betaine 的结合物 tyrosine betaine 在绿僵菌中具有胁迫保护剂和微生物-寄主信号识别的作用^[23]。本研究发现高毒力菌丝中 histidine betaine 含量较高, 暗示该化合物可能是通过增强球孢白僵菌的抗寄主免疫胁迫能力而增强毒力。菌丝中其它毒力标记物 octamethyl- α , α -trehalose、arg-arg-gln, 它们的作用机制有待研究。

高萌发率孢子中, acetylcarnitine、propionyl-carnitine 和磷脂含量较高, 表明脂代谢也与孢子萌发有关, 这属首次报道, 原理有待进一步证实。而且萌发特有的标记物 2, 3-dimethylmaleate 的作用机制也属未知。

昆虫病原真菌成功侵染寄主, 需要孢子能够在寄主表皮上附着、萌发、穿透, 还要能耐受昆虫血腔中的高渗透压^[24]和抵抗寄主的免疫防御等。本研究表明决定球孢白僵菌毒力的关键是附着和穿透的能力, 因为毒力强的孢子中含有较高的脂酰肉碱和磷脂, 它们维持附着胞的膨压和为穿透寄主提供能量。球孢白僵菌含有多种具有杀虫活性的肽类, 从本研究结果来看, 虽然一种或少数几种对它的毒力并不起决定性作用, 但若多种肽类同时具有高含量就可以进一步提高寄主的死亡速率。综上所述, 本研究用基于 LC-MS 的代谢组学方法识别了球孢白僵菌的萌发和毒力标记物, 这将有助于提高菌株的筛选速率和产品质量控制。

参考文献

[1] Fang WG, Scully LR, Zhang L, Pei Y, Bidochka MJ. Implication of a regulator of G protein signalling (BbRGS1) in conidiation and conidial thermotolerance of the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS*

Microbiology Letters, 2008, 279 (2) : 146-156.

- [2] Zhang YJ, Zhao J, Fang WG, Zhang J, Luo Z, Zhang M, Fan Y, Pei Y. Mitogen-activated protein kinase hog1 in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* regulates environmental stress responses and virulence to insects. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75 (11) : 3787.
- [3] Zhang YJ, Zhang JQ, Jiang XD, Wang GJ, Luo ZB, Fan YH, Wu ZQ, Pei Y. Requirement of a mitogen-activated protein kinase for appressorium formation and penetration of insect cuticle by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76 (7) : 2262-2270.
- [4] Fang WG, Feng J, Fan YH, Zhang YJ, Bidochka MJ, Leger RJS, Pei Y. Expressing a fusion protein with protease and chitinase activities increases the virulence of the insect pathogen *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2009, 102 (2) : 155-159.
- [5] Silva WOB, Santi L, Berger M, Pinto AFM, Guimarães JA, Schrank A, Vainstein MH. Characterization of a spore surface lipase from the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochemistry*, 2009, 44 (8) : 829-834.
- [6] Supakdamrongkul P, Bhumiratana A, Wiwat C. Characterization of an extracellular lipase from the biocontrol fungus, *Nomuraea rileyi* MJ, and its toxicity toward *Spodoptera litura*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2010, 105 (3) : 228-235.
- [7] Safavi SA, Shah FA, Pakdel AK, Rasoulia GR, Bandani AR, Butt TM. Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, 270 (1) : 116-123.
- [8] Hu F, Li Z. Secondary metabolites and their bioactivities of *Cordyceps* and its related fungi. *Mycosystema*, 2007, 26 (4) : 607-632. (in Chinese)
- 胡丰林, 李增智. 虫草及相关真菌的次生代谢产物及其活性. *菌物学报*, 2007, 26 (4) : 607-632.
- [9] Zhang WW, Li F, Nie L. Integrating multiple 'omics' analysis for microbial biology: application and methodologies. *Microbiology-Sgm*, 2010, 156 : 287-301.
- [10] Krastanov A. Metabolomics - The state of art.

- Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2010, 24 (1) : 1537-1543.
- [11] Pasikanti KK, Esuvaranathan K, Ho PC, Mahendran R, Kamaraj R, Wu QH, Chiong E, Chan ECY. Noninvasive urinary metabonomic diagnosis of human bladder cancer. *Journal of Proteome Research*, 2010, 9 (6) : 2988-2995.
- [12] Sabatine MS, Liu E, Morrow DA, Heller E, McCarroll R, Wiegand R, Berriz GF, Roth FP, Gerszten RE. Metabolomic identification of novel biomarkers of myocardial ischemia. *Circulation*, 2005, 112 (25) : 3868-3875.
- [13] Zhao XJ, Fritsche J, Wang JS, Chen J, Rittig K, Schmitt-Kopplin P, Fritsche A, Haring HU, Schleicher ED, Xu GW, Lehmann R. Metabonomic fingerprints of fasting plasma and spot urine reveal human pre-diabetic metabolic traits. *Metabolomics*, 2010, 6 (3) : 362-374.
- [14] Xia JG, Psychogios N, Young N, Wishart DS. MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37: W652-W660.
- [15] Xia JG, Wishart DS. Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst. *Nature Protocols*, 2011, 6 (6) : 743-760.
- [16] Aa J. Analysis of metabolomic data: principal component analysis. *Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2010, 15 (5) : 481-489. (in Chinese)
阿基业. 代谢组学数据处理方法——主成分分析. *中国临床药理学与治疗学*, 2010, 15 (5) : 481-489.
- [17] Strijbis K, Distel B. Intracellular acetyl unit transport in fungal carbon metabolism. *Eukaryotic Cell*, 2010, 9 (12) : 1809-1815.
- [18] Ramos-Pamplona M, Naqvi NI. Host invasion during rice-blast disease requires carnitine-dependent transport of peroxisomal acetyl-CoA. *Molecular Microbiology*, 2006, 61 (1) : 61-75.
- [19] Yang J, Kong L, Chen X, Wang D, Qi L, Zhao W, Zhang Y, Liu X, Peng Y-L. A carnitine-acylcarnitine carrier protein, MoCre1, is essential for pathogenicity in *Magnaporthe oryzae*. *Current Genetics*, 2012, 58 (3) : 139-148.
- [20] Wang ZY, Thornton CR, Kershaw MJ, Debaio L, Talbot NJ. The glyoxylate cycle is required for temporal regulation of virulence by the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular Microbiology*, 2003, 47 (6) : 1601-1612.
- [21] Wang ZY, Jenkinson JM, Holcombe LJ, Soanes DM, Veneault-Fourrey C, Bhambra GK, Talbot NJ. The molecular biology of appressorium turgor generation by the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Biochemical Society Transactions*, 2005, 33: 384-388.
- [22] Wang CS, Leger RJS. The *Metarhizium anisopliae* perilipin homolog MPL1 regulates lipid metabolism, appressorial turgor pressure, and virulence. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282 (29) : 21110-21115.
- [23] Carollo CA, Calil ALA, Schiave LA, Guaratini T, Roberts DW, Lopes NP, Braga GUL. Fungal tyrosine betaine, a novel secondary metabolite from conidia of entomopathogenic *Metarhizium* spp. fungi. *Fungal Biology*, 2010, 114 (5-6) : 473-480.
- [24] Wang CS, Duan ZB, Leger RJS. MOS1 osmosensor of *Metarhizium anisopliae* is required for adaptation to insect host hemolymph. *Eukaryotic Cell*, 2008, 7 (2) : 302-309.

Identification of spore germination and virulence related biomarkers from *Beauveria bassiana* using an LC-MS-based metabolomic technique

Feifei Luo, Shulin Li, Longyun Chen, Wancun Zhang, Bin Wang, Bo Huang, Fenglin Hu*

Anhui Provincial Key Laboratory of Microbial Control, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui Province, China

Abstract: [Objective] To identify biomarkers associated with germination and virulence of *Beauveria bassiana*. [Methods] Spore germination rate and virulence of seven *B. bassiana* isolates against *Euproctis pseudoconspersa* were determined, and an LC-MS-based metabolomic analysis was applied to identify the biomarkers from mycelia and conidial extracts associated with spore germination and virulence. [Results] The metabolites of carnitine, hercynine, acetylcarnitine, α, α -trehalose; Octa-Me, arg-arg-gln, phosphatidylethanolamine (PE (18:2/0:0)), phosphatidylethanolamine (PC (18:3/0:0)) and PC (18:2/0:0)) were higher in the mycelia of highly virulent isolates than those less virulent strains. Conidia of isolates with a high germination rate were characterized by containing higher levels of 2, 3-dimethylmaleate, acetylcarnitine, propionyl-carnitine and PC (18:2/0:0). Histamine, 2,5-pyrrolidinedicarboxylic acid; Diamide, carnitine, acetylcarnitine, propionyl-carnitine, butyrylcarnitine, PE (18:2/0:0), PC (16:1/0:0) and PC (18:3/0:0) were higher in the conidia of highly virulent isolates. Furthermore, relative content comparison of insecticidal cyclopeptides, such as beauverolides, beauvericins and bassianolide in mycelia showed that the content of a single peptide was not highly related to fungal virulence. However, the contents of 9 peptides were found higher in the highly virulent isolate Bb1898, suggesting that they might exert synergetic effects against insect hosts. [Conclusion] The common biomarkers related to fungal virulence and germination are acyl carnitine and phospholipid which may play roles in maintaining appressorium turgor pressure and providing energy for penetrating the host cuticle.

Keywords: *Beauveria bassiana*, metabolomics, LC-MS, germination, virulence, biomarker

(本文责编:王晋芳)