

# 黑殭菌素在蟲生真菌致病過程中所扮演的角色

蔡勇勝、高穗生

## 前 言

Jenkins 及 Grzywacz 在 2000 年發表報告指出品質管制在真菌及病毒性生物防治劑開發計畫中之重要性，並列出真菌性產品之最低品質要求，包括菌種保存、產品污染問題的控制及產品活性等。就真菌性殺蟲劑之產品活性而言，活性所代表就是殺蟲作用。蟲生真菌之殺蟲機制包括毒素的毒性、酵素的作用、機械破壞、菌體與蟲體對養份的競爭、寄主防禦系統被菌感染而遭受破壞等，其中毒素之作用被認為與致病力關係最為直接，或可做為蟲生真菌活性強弱之檢測指標(Moore & Prior, 1993, Parry, 1995)。在諸多蟲生真菌毒素中，以黑殭菌素(destrotoxins)被研究最多，Strasser 等人(2000)整理過去文獻資料，在同一期雜誌中討論蟲生真菌代謝物安全性的問題，文中對黑殭菌素的討論有近 5 頁之多。是本文嘗試由相關報告整理出黑殭菌素在致病過程中所扮演的角色，藉以瞭解蟲生真菌代謝物與殺蟲作用間的關係，探討是否能利用該毒素之種類、活性作為品質管制之檢測標準。

## 黑殭菌素

黑殭菌素由 5 個胺基酸：丙氨酸(-alanine)、丙氨酸(alanine)、纈氨酸(valine)、異白氨酸(isoleucine)、脯氨酸(proline)及 羧酸(-hydroxy acid)組成之環狀芳香胍鍵為骨架(cyclodepsipeptide)，依其化學結構可區分為 A、B、C、D、E、F 六大類，其中以黑殭菌素 A、B、E 較常見，目前為止已被分離鑑定出 28 種，且大部分由黑殭菌(*Metarhizium anisopliae*)產生，故稱之為黑殭菌素(中國大陸則由英文直譯為破壞素)。M. *anisopliae* 產生黑殭菌素之可能途徑如(圖 1.)，過程中會先合成其先驅物(protodestroxin)，此先驅物在所有氨基上之氫皆沒有被甲基取代，當丙氨酸上之氮基行甲基取代後形成去甲基黑殭菌素

---

行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所技術專刊第 9104 號。

B (desmethyl destruxin B), 去甲基黑殭菌素 B 在纈氨酸上之氨基再次甲基化後形成黑殭菌素 B。若黑殭菌素 B 上之 2-甲基丁酸之側鏈甲基氧化成羥基即為黑殭菌素 C, 黑殭菌素 C 再氧化成羧酸即為黑殭菌素 D。若黑殭菌素 B 的 2-甲基丁酸之甲基脫去成烯基即為黑殭菌素 A, 黑殭菌素 A 再氧化則為黑殭菌素 E。由於黑殭菌素之合成不需核糖體參與, 是由多功能合成 (multifunctional peptide synthetase) 來催化, 其合成鍵 (peptide bond) 所需之能量為 1/6。

除此之外, 十字花科作物之黑斑病菌 (*Alternaria brassicae*)、粉紅單端孢菌 (*Trichothecium roseum*)、盤蛇孢菌 (*Ophiosphaerella herpotricha*) 也有能產生黑殭菌素 B、同黑殭菌素 B (homodestruxin B) 及之報導, 並被認為與 *A. brassicae* 之致病力有關 (Buchwaldt & Green, 1992)。另一種蟲生真菌; 座殼孢菌 (*Aschersonia* sp) 最近也被發現可分離出黑殭菌素 A1, A4, A5 與同黑殭菌素 B (Krasnoff & Gibson, 1996)。

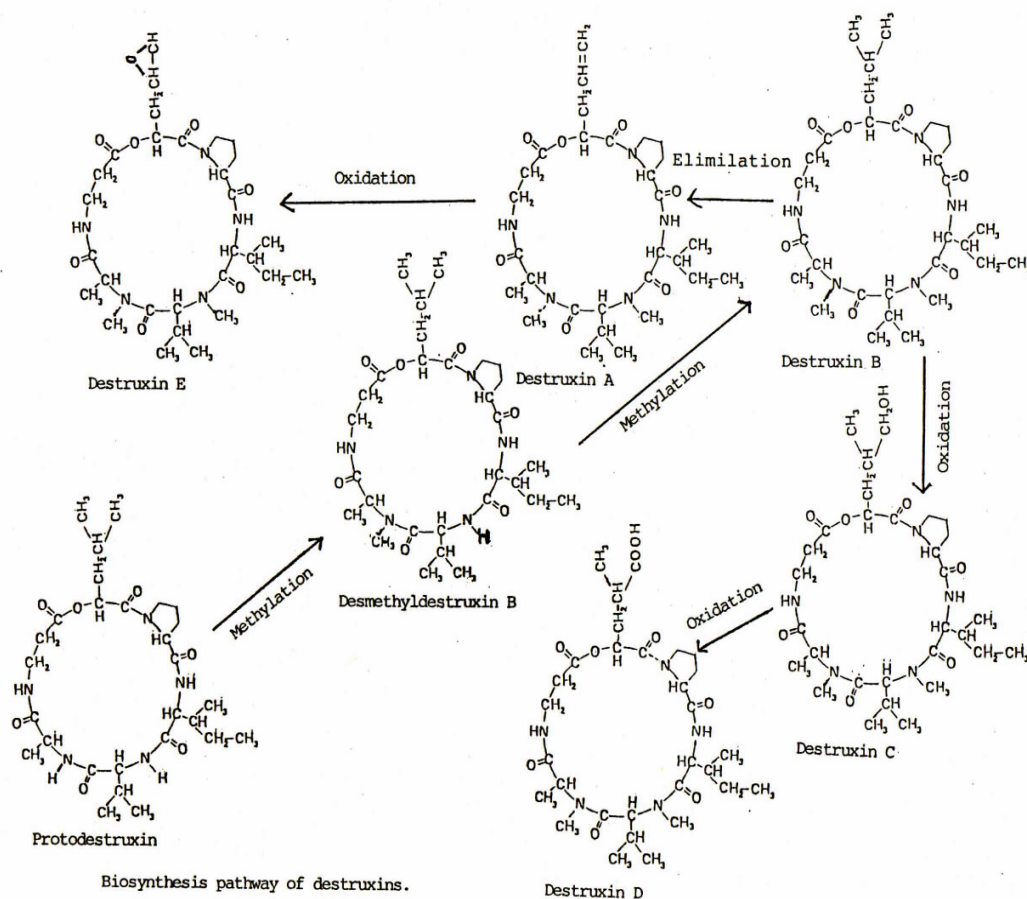


圖1. 黑殭菌素合成之可能途徑 (李, 1988)。

## 影響黑殭菌素產生的因子

黑殭菌素之產生量及種類會因菌種、菌株之不同而有所差異，其產生並受昆蟲體內或培養基內營養成份影響，更有部份 *M. anisopliae* 菌株甚至不會產生黑殭菌素(Amiri-Besheli et al., 2000、Kaijiang & Roberts, 1986、Kershaw et al., 1999)。在李氏(1988)進行之研究結果中，發現 *M. anisopliae* 在固態發酵時有較高之黑殭菌素產量，以固態發酵方式比較在長糯米、丸糯米、蓬來米、在來米、小麥、洋芋、甘藷等不同培養基上的產差異量，結果在糯米培養基上的產量最高，而長糯米又較丸糯米為佳。缺乏麥芽糖及有機態氮會使黑殭菌素產量減少，但部分氨基酸(如丙氨酸、異白氨酸、脯氨酸...等)及無機態氮(硫酸銨)的添加卻不利於黑殭菌素之產生。另亦發現有機氮中以 Neopeptone 最好，次為 Bactopeptone、Peptone(萃取自肉類)、大豆肉粉 Peptone(萃取自酪素)、魚粉及酵母抽出液。

除了培養基成份外，李氏也發現溫度、培養基含水份、光照條件也會影響 *M. anisopliae* 在固態培養基上產生黑殭菌素的量。Kershaw 等人(1999)以液體培養基培養 *M. anisopliae* var. *anisopliae* ME1 菌株，在接種 2 天後方能測得黑殭菌素的產生，種類包括黑殭菌素 A、B、A2、E 及去甲基黑殭菌素 B(圖 2.)，其中以黑殭菌素 A 及黑殭菌素 E 產量較高，且兩毒素產生時間一致，接種後 6-9 天是其產量高峰(圖 3.)。不過另一株菌 *M. anisopliae* var. *anisopliae*(V245)在 24 小時內黑殭菌素 A 與黑殭菌素 E 產量即已達高峰，且兩者明顯有時間上的差異(表 1.)，將此菌接種大蠟蛾(*Galleria mellonella*)的蟲體上卻僅能測得黑殭菌素 A 及黑殭菌素 B，接種 *M. anisopliae* var. *majus* 的蟲體則只發現黑殭菌素 A(表 2. ; Amiri-Besheli et al., 2000)。

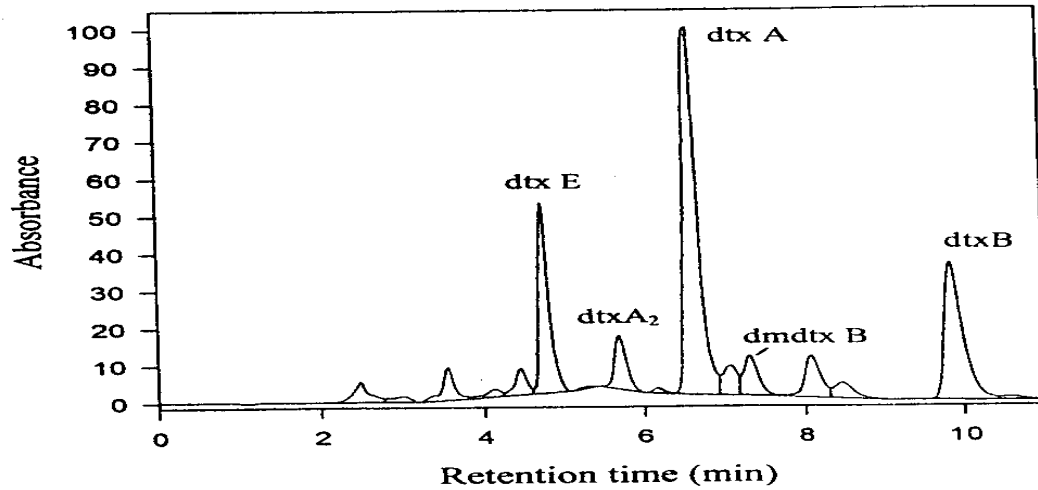


圖2. 黑殭菌ME1菌株產生之黑殭菌素經RP HPLC分析之結果。

FIG.2. Chromatogram from analytical RP HPLC showing the separation of destruxins from a culture of *M. anisopliae* var. *anisopliae* ME1.

(Kershaw et al., 1999)

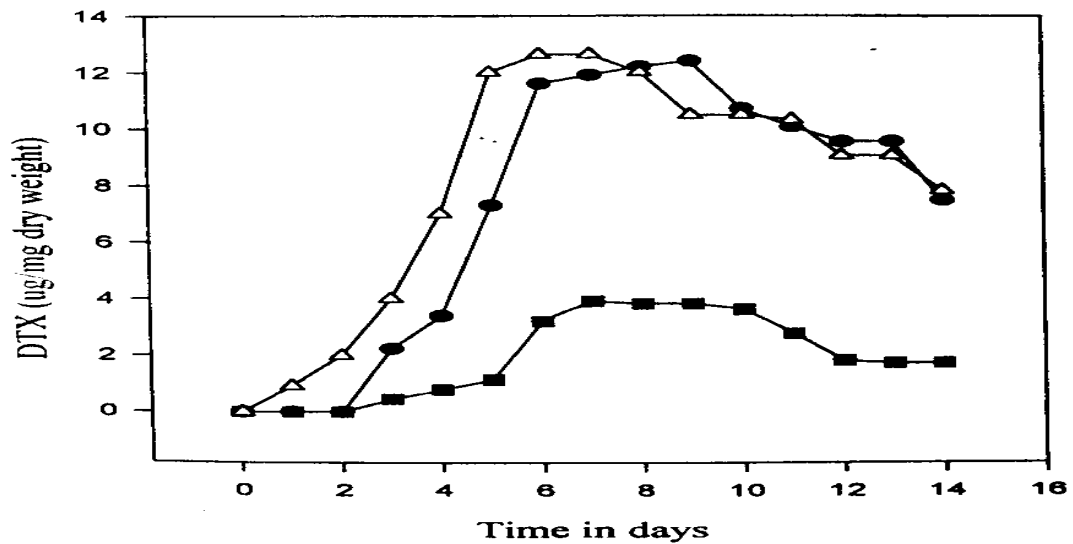


圖3. *M. anisopliae* var. *anisopliae* ME1 菌株之黑殭菌素A及黑殭菌素E產量比較。

FIG.3. Mycelial dry weight ( ), destruxin(DTX)A ( ) and E ( ) titers in liquid culture of *M. anisopliae* var. *anisopliae* ME1.

(Kershaw et al., 1999)

表1. 黑殭菌(V245) 菌株在液體培養下不同時間之黑殭菌素產量比較

Table 1. Time course for production of destruxins by *M. anisopliae*(V245) in liquid media

Incubation time(d)	PH of CF.	Biomass from culture (g l <sup>-1</sup> )	Crude toxin Activity		Destruxin profile(mg l <sup>-1</sup> )			
			from C.F. (mg l <sup>-1</sup> )	of C.F. (RT, min)	Dtx A	Dtx B	Dtx E	Ratio of A:B:E
4	4.2	4.3	84	90	5	0.7	10	7:1:14
8	3.8	7.9	192	120	24	5	40	4.8:1:8
12	4.4	8.2	204	200	31	0.7	43	31:1:43
16	3.4	9.2	250	180	42	5	23	8.4:1:4.6
20	3.3	9.8	254	150	42	5	19	8.4:1:3.8
24	3.4	10.0	188	120	19	2	5	9.5:1:2.5
30	3.4	9.0	220	90	21	3	5	7:1:1.6

CF=culture filtrate.

RT=time take for *Galleria* to recover from the anaesthetic effect of destruxins . (10 μl CF injected per larvae)

(Amiri-Besheli et al., 2000)

表2. 黑殭菌素接種 *Metarhizium* spp. 後大蠟蛾蟲體內之產生情形

Table 2. Destruxins isolated from sixth instar larvae of *Galleria mellonella* infected with different *Metarhizium* species and varieties

	Dtx A (μg /insect)	Dtx B (μg /insect)	Dtx E (μg /insect)
<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> (V304)	0.06	ND	ND
<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> (Ma23)	0.11	0.13	ND
<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> (Me1)	0.165	0.1	ND
<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> (V245)	0.44	0.5	ND
<i>M. anisopliae</i> var. <i>majus</i> ARESF 297	0.024	ND	ND
<i>M. anisopliae</i> var. <i>majus</i> ARESF 1092	1.0	ND	ND
<i>M. flavoviride</i> DSM 137	ND	ND	ND

ND=destruxins not detected

(Amiri-Besheli et al., 2000)

## 昆蟲對黑殭菌素的反應

早在 1960 年代已發現黑殭菌素對某些昆蟲有相當的毒性(Roberts, 1966), 不同昆蟲注射黑殭菌素所造成的症狀也不相同, 大多數鱗翅目昆蟲最明顯的症狀是立即發生痙攣(tetanic phase)。Samuels 等人(1986)將黑殭菌素注射到菸草天蛾(*Mandula sexta*)五齡幼蟲體內, 發現蟲體會持續痙攣的狀態。蟲體對黑殭菌素的反應在低濃度時是可恢復的, 超過一定濃度時則會造成蟲體死亡, 但 Kershaw 等人(1999)認為這種痙攣反應雖然與血液循環、氣體交換及體內功能干擾有關, 不過仍無證據證實與蟲體死亡有直接關係。

不同蟲體對黑殭菌素反應不一, 同一蟲體對不同黑殭菌素之敏感程度也有所差異(Brousseau et al., 1996、Thomsen & Eilenberg, 2000)。以樅色捲蛾(*Choristoneura fumiferana*)為例, 該蟲對黑殭菌素 B 明顯較黑殭菌素 A 敏感, 以五齡幼蟲進行測試, 其  $LD_{50}$  值差近 15 倍(表 3.)。除了致死作用外, 若以低於致死濃度之劑量處理樅色捲蛾, 發現蟲體發育時間有拉長的現象(Brousseau et al., 1996)。直翅目(Orthoptera)和鞘翅目(Coleoptera)昆蟲雖然對黑殭菌素也有感受性, 但注射黑殭菌素 A 和黑殭菌素 B 後並無痙攣現象產生(Roberts, 1981)。

將黑殭菌素溶液噴佈在馬鈴薯葉子上, 二十八星瓢蟲(*Epilachna sparsa*)之幼蟲取食後, 會造成食慾不振現象(phagode pressant)。相同方法處理科羅拉多甲蟲, 也得到相同的結果, 四齡幼蟲中只有少數可以發育完全, 少數發育完全之雌蟲壽命縮短, 且產卵數減少(Roberts, 1981)。拒食反應也可從處理昆蟲體壁產生(Amiri et al., 1999)。另 Fargues 等人(1985)以黑殭菌素配合 *M. anisopliae* 孢子使用, 發現對犀角金龜(*Oryctes rhinoceros*)之半致死天數( $LT_{50}$ )可由 11.2 天縮短為 6.7 天(1g/g, 10 孢子/幼蟲)。

證據顯示黑殭菌素也可抑制沙漠飛蝗(*Schistocerca gregaria*)馬氏管(Malpighian tubule)液體的泌流及菸草天蛾前胸腺脫皮激素之分泌, 這些抑制作用似乎與鈣離子存在與否無關(James et al., 1993)。但 Dumas 等人(1996)以黑殭菌素 E 處理大蠟蛾中腸及馬氏管時, 發現表皮細胞和微絨毛(microvilli)上會發生形態改變(頂端膨大進而產生液泡), 細胞最後破裂並喪失功能, 不過當有鈣離子( $Ca^{2+}$ )存在時液泡產生量會減少。黑殭菌素對昆蟲腸道表皮細胞的破壞與蘇力菌(*Bacillus thuringiensis*) $\delta$ -內毒素( $\delta$ -endotoxin)之作用相似, 將兩者混合使用後之殺蟲作用有協力效應(表 4.; Brousseau et al., 1998)。

表3. 黑殭菌素A及黑殭菌素B對不同齡期柞蠹幼蟲之毒性比較

Table 3. Destruxins Lethal Doses for *Chorisstoneura fumiferana* Larvae

Instar	LD <sub>50</sub> (CI95%)	LD <sub>95</sub> (95%)	Slope±SE <sup>a</sup>	Mean weight (mg)±SE
III A	0.116(0.103-0.132)	0.414(0.321-0.592)	2.97±0.27	
B	0.098(0.088-0.108)	0.299(0.255-0.391)		1.150±0.256
IV A	0.350(0.313-0.392)	1.033(0.857-1.324)	3.50±0.30*	
B	0.090(0.081-0.101)	0.277(0.238-0.330)		3.910±2.261
V A	1.520(1.411-1.640)	4.093(3.440-5.252)	3.82±0.37*	
B	0.103(0.095-0.112)	0.315(0.276-0.369)		14.770±2.261

Note : (A) Given in  $\mu$ g/larva. Time: 72 hr. LD:Lethal dose. CI: Confidence interval. SE: Stanard error.

(B) Given in  $\mu$ g/mg of larval mean weight Time:72hr.

<sup>a</sup>Values with an asterisk indicate parallelism of their regression lines according to X<sup>2</sup> parallelism test

( P >0.05). SE: Standard error.

(Brousseau et al., 1996)

表4. 黑殭菌素混合蘇力菌施用對柞蠹之毒力測試

Table 4. Effects of various combinations of destruxins and *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* on *Chorisstoneura fumiferana* fifth instar

<i>Destruxins</i>		<i>Bacillus thuringiensis</i>		Combination		$\chi^2$ <sup>c</sup>	Combined effects
Dose ( $\mu$ g/larva)	Mortality <sup>a</sup> (%)	Dose (IU/larva)	Mortality <sup>a</sup> (%)	Observed mortality <sup>a</sup> (%)	Expected mortality <sup>a</sup> (%)		
0.30	4.7	0.10	1.2	17.1	4.1	s.	Synergism
0.50	12.2	0.10	2.0	28.9	14.0	s.	Synergism
0.50	10.8	0.55	60.8	79.9	65.0	n.s.	Independent
0.68	13.5	0.53	40.4	71.8	48.4	s.	Synergism
1.00	18.9	0.53	39.4	71.7	50.9	s.	Synergism
1.28	42.2	0.39	15.4	72.6	51.1	s.	Synergism
1.28	38.3	0.53	41.2	80.0	63.7	s.	Synergism
1.50	53.1 <sup>b</sup>	0.69	83.3 <sup>b</sup>	100.0 <sup>b</sup>	92.1 <sup>b</sup>	n.s.	Independent
1.65	55.1	0.53	40.4	90.1	73.2	s.	Synergism
2.10	83.0 <sup>b</sup>	0.69	83.3 <sup>b</sup>	100.0 <sup>b</sup>	97.2 <sup>b</sup>	n.s.	Independent

<sup>a</sup> Mean of three replicates.

<sup>b</sup> Mean of two replicates.

<sup>c</sup>  $\chi^2$  test (df = 1, P < 0.05); s., significant; n.s., nonsignificant.

(Brousseau et al., 1998)

黑殭菌素不單對昆蟲有毒性，對脊椎動物也有一定的毒性。Strasser 等人(2000)在其文章中即提到 Kodaria 在 1961 年時曾將黑殭菌素的水溶液注入鼠的腹膜內，發現黑殭菌素 A 比黑殭菌素 B 有更強的毒性，其造成立即昏厥死亡的最低量分別是 1.35 和 16.9mg/kg 體重。

## 對昆蟲免疫系統的影響

*M. anisopliae* 感染寄主昆蟲的過程由分生孢子附著到寄主體表開始，接下來產生發芽管，並藉由酵素分解及機械壓力的作用穿透富幾丁質的昆蟲體壁，侵入的菌絲在蟲體內繼續生長、分化，最後造成寄主死亡。過程中，侵入的菌絲如何克服昆蟲免疫系統的抵抗，是極為關鍵的問題。昆蟲對外來物的抵抗主要依賴吞噬作用(phagocytosis)及黑色素(melanin)或小節(nodule)之形成，*M. anisopliae* 如何避開寄主昆蟲免疫系統的攻擊，有文獻證實與黑殭菌素之產生有關，但也有報告證實不產生黑殭菌素的 *M. anisopliae* 菌株對寄主昆蟲也具強致死作用 (Amiri-Besheli et al., 2000)，顯然黑殭菌素的存在與否並非是 *M. anisopliae* 抗寄主昆蟲免疫系統之決定因素，但黑殭菌素存在時對寄主昆蟲免疫系統確實有抑制作用。

### 一、黑殭菌素對吞噬作用的影響

Pendland 等人(1993)認為侵入昆蟲體內之 *M. anisopliae* 或 *Beauveria bassiana* 菌絲體，一開始缺乏細胞壁或吞噬細胞能辨識之抗原表面，所以可避開吞噬細胞之吞噬。但 Andreas 等人(1996)則有不同的看法，依其在蠟蛾上實驗結果，發現在侵染早期的菌絲體會被大蠟蛾體內原生質血球(plasmatocytes)吞噬，侵染後期昆蟲體腔內雖有較多的菌絲體，卻無吞噬現象發生，Andreas 等人所以認為當蟲生真菌侵入昆蟲體內後，會產生抑制吞噬細胞作用之物質。

進一步以黑殭菌素處理蠟蛾原生質血球，證實確有抑制其吞噬活性之表現。當蠟蛾原生質血球經低於致死濃度(10 µg / larvae)之黑殭菌素 A 和黑殭菌素 E 處理後，其吞噬作用明顯受抑制，且抑制作用有隨濃度提高而增加之情形，不過約 80%原生質血球會在處理後死亡，顯然抑制作用之發生應是直接的細胞毒害。當每隻蠟蛾幼蟲注射 10<sup>4</sup>個 *M. anisopliae* 芽孢 2 天後，對再接再種之 *M. anisopliae* 芽孢之吞噬作用顯著下降，但對矽膠珠之吞噬作用只有少許程度的下降，此結果顯示吞噬作用的抑制有選擇性，並非僅是單一的吞噬細胞毒害問題。Dumas 等人(1996)依其研究結果也認為黑殭菌素會與胞膜上的 receptor 分子結合，影響吞噬細胞



的辨別及吞噬能力。

## 二、對黑色素及小節形成的影響

小節形成是因血球之聚集，黑色素往往位在其核心中，所以黑色素之產生被認為與小節形成有關。又黑色素的產生受酚類氧化酵素 (phenoloxidase) 調控，是前酚類氧化酵素系統 (proPO system (prophenoloxidase system) 被認為是昆蟲和其他節肢動物抵抗外來微生物之重要因子，因此系統之最終產物大部分是黑色素。前酚類氧化酵素系統會被  $\alpha$ -1,3- 聚葡萄糖 ( $\alpha$ -1,3-glucans)、脂多糖類 (lipopolysaccharides)、肽糖 (peptidoglycan)、蛋白酶 (proteases) 和加熱... 等因子活化，使前酚類氧化酵素 (prophenoloxidase) 轉變成酚類氧化酵素促進黑色素形成，黑色素本身與其中間產物芳香族醌類化合物類 (aromatic quinines) 具有抗真菌、細菌之作用 (Rowley et al., 1990)。

當黑殭菌素混合物存在時可抑制前酚類氧化酵素系統之活化作用，Huxham 等人 (1989) 以昆布多糖 (laminarin) 處理美洲蜉蝣 (Periplaneta americana) 和沙漠飛蝗血球，發現酚類氧化酵素的活性提高近 50 倍，添加黑殭菌素 A 及黑殭菌素 B 後酚類氧化酵素活性則明顯下降，且下降程度隨黑殭菌素濃度之增加而加大 (黑殭菌素濃度為  $2 \mu\text{g/ml}$  時其作用為昆布多糖處理組之 45%，當濃度提高為  $10 \mu\text{g/ml}$  時其作用僅為昆布多糖處理組之 13%)，但此抑制作用在添加一種黑殭菌素拮抗物質菸鹼酸 (helvolic acid) 後即不存在 (表 5.)。

另以酵母聚醣 (zymosan) 處理蜉蝣血球，小節之產生數量也明顯增多，但其刺激作用會因黑殭菌素 A 及黑殭菌素 B 的存在而減弱。黑殭菌素 E 可啟動小龍蝦 (*Pacifastacus leniusculus*) 血球之解顆粒化作用 (degranulation)，使小節形成受抑制，但此作用之發生需有鈣離子的存在，且會被離子抑制物質 SITS (4-acetamido-4'-isothiocyanatostilbene-2,2'-disulphonic acid disodium salt) 影響 (Lage et al., 1990)。

表5. 黑殭菌素對沙漠飛蝗及美洲蜉蟻血球之酚類氧化酵素活性抑制作用

Table 5. Effect of a mixture of destruxins A and B on the visualization of phenoloxidase-positive haemocytes in monolayer

	mean/mm <sup>2</sup> (+ SE)	% Control	n
<b>Locust</b>			
Control without laminarin*	0.25 (0.03)	2	27
Control plus laminarin*	10.02 (0.27)	100	33
2 µg/ml (destruxins A and B)	4.55 (0.20)	45	45
5 µg/ml	3.74 (0.16)	37	26
10 µg/ml	1.35 (0.10)	13	35
30 µg/ml (helvolic acid)†	10.58 (0.75)	100	38
<b>Cockroach</b>			
Control without laminarin*	0.25 (0.04)	1	77
Control plus laminarin*	16.25 (0.27)	100	93
2 µg/ml (destruxins A and B)	7.06 (0.25)	43	40
5 µg/ml	6.37 (0.13)	39	30
10 µg/ml	1.51 (0.10)	9	60

n: Number of fields counted from three experiments.

\*All cultures contained 0.2% dimethylsulphoxide.

†The effects of helvolic acid obtained commercially or purified from our own culture medium by re-crystallisation of the TLC fraction using cold methanol were identical.

(Huxham et al., 1989)

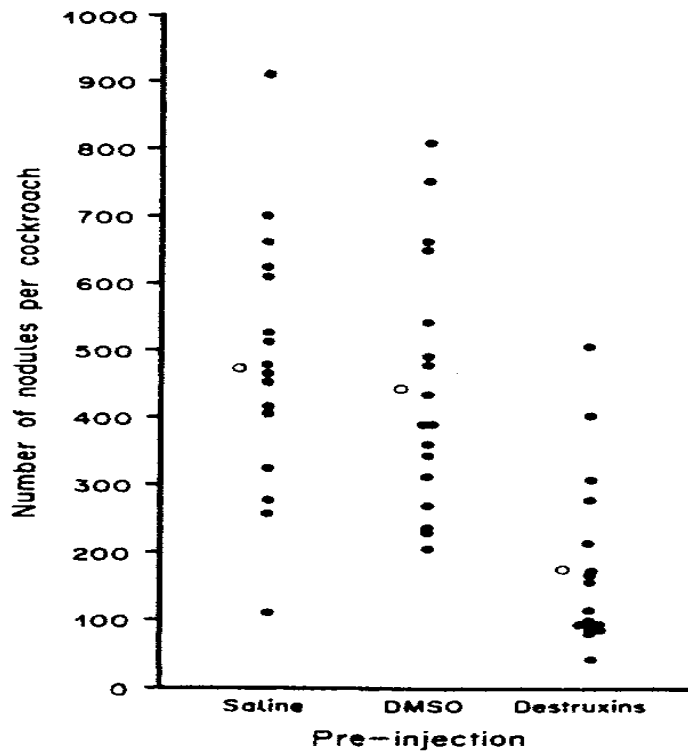


圖4. 黑殭菌素對蜉蟻組織小節形成之抑制作用。

FIG. 4. Effect of destruxins A and B on zymosan-induced nodule formation in the *Periplaneta americana* cockroach.

(Huxham et al., 1989)

## 結 論

從蒐集的文獻中証實黑殭菌素對寄主免疫系統的確有抑制現，也能造成寄主蟲體的麻痺痙攣，甚至於致蟲體於死等作用，似乎在 *M. anisopliae* 致病過程中扮演極為重要的角色。但從 Andreas 等人(1996)在其實驗中提到黑殭菌素對蠟蛾細胞之致死濃度遠高於  $10 \mu\text{g} / \text{larvae}$ ，而 Amiri-Besheli 等(2000)以 *M. anisopliae* 接種蠟蛾後，從蟲體上能測到之黑殭菌素量不到  $1 \mu\text{g} / \text{larvae}$ ，黑殭菌素能致蟲於死的作用另人懷疑。另黑殭菌素如真能在感染初期抑制寄主昆蟲免疫系統的作用，使 *M. anisopliae* 能順利完成侵染過程，此又與 Kershaw 等(1999)的研究結果矛盾，在其中研究結果中黑殭菌素產生是在 2 天後，不產生黑殭菌素的菌株也一樣能感染蟲體，造成死亡。單就上兩項疑問，黑殭菌素似乎與致病力強弱很難劃上穩定關係，更不用提用來當產品品質管制之檢測依據。除此之外，若仔細分析各篇報告，不難發現，不同研究人員所發表的結果存有差異，甚有相左者，顯示對黑殭菌素的研究尚有許多努力的地方。

## 參 考 文 獻

- 1.李泰林 1988. 以米為基質利用固態發酵生產黑殭菌毒素 destruxin。國立台灣大學農業化學研究所碩士論文 58 pp.
- 2.Amiri, B., L. Ibrahim, and T. M. Butt. 1999. Antifeedant properties of destruxins and their use with the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* for improved control of crucifer pests. *Biocontrol Science and Technology* 9, 487 -498.
- 3.Amiri-Besheli, B., B. Khambay, S. Cameron, M. L. Deadman, and T. M. Butt. 2000. Inter- and intra-specific variation in destruxin production by insect pathogenic *Metarhizium* spp., and its significance to pathogenesis. *Mycological Research* 104, 447-452.
- 4.Andreas, V., V. Matha, and P. Gotz. 1996. Inhibition of phagocytic activity of plasmatocytes isolated from by entomogenous fungi and their secondary metabolites. *Journal of Insect Physiology* 43, 475 -483.
- 5.Brousseau, G., G. Charpentier, and S. Belloncik. 1998. Effect of *Bacillus thuringiensis* and destruxins (*Metarhizium anisopliae* mycotoxins) combinations on spruce budworm(Lepidoptera:tortricidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 72, 262-268.
- 6.Brousseau, G., G. Charpentier, and S. Belloncik. 1996. Susceptibility of spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* Clemens, to destruxins, cyclodepsipeptidic mycotoxin of *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 68, 180 -182.
- 7.Buchwaldt, L., and H. Green. 1992. Phytotoxicity of destruxin B and its possible role in the pathogenesis of *Alternaria brassicae*. *Plant pathology* 41, 55 -63.
- 8.Dumas, C., M. Ravallec, V. Matha, and A. Vey. 1996. Comparative study of the cytological aspects of the mode of action of destruxins and other peptidic fungal

- metabolites on target epithelial cells. *Journal of Invertebrate Pathology* 67, 137-146.
9. Fargues, J., P. H. Robert, and A. Vey. 1985. Influence of destruxins on disease development of *Metarhizium anisopliae* in scarabid larvae. *Entomophaga* 30:353 -364.
  10. Huxham, I. M., A. M. Lackie, and N. J. McCorkindale. 1989. Inhibitory effects of cyclodesipeptides, destruxins from the fungus *Metarhizium anisopliae*, on cellular immunity in insects. *Journal of Insect Physiology* 35, 97 -105.
  11. James, P. J., M. J. Kershaw, S. E. Reynolds, and A. K. Charnley. 1993. Inhibition of desert locust (*Schistocerca gregaria*) Malpighian tubule fluid secretion by destruxins, cyclic peptide toxins from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* *Journal of Insect Physiology* 39, 797 -807.
  12. Jenkins, N. E., and D. Grzywacz. 2000. Quality control of fungal and viral biocontrol agents-assurance of product performance. *Biocontrol Science and Technology* 10, 753 -777.
  13. Kaijiang, L., and D. W. Roberts. 1986. The production of destruxins by the entomogenous fungus, *Metarhizium anisopliae* var. *major*. *Journal of Invertebrate Pathology* 47, 120 -122.
  14. Kershaw, M. J., E. R. Moorhouse, R. Bateman, S. E. Reynolds, and A. K. Charnley. 1999. The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. *Journal of Invertebrate Pathology* 74, 213 -223.
  15. Krasnoff, S., and D. M. Gibson. 1996. New destruxins from the entomopathogenic fungus *Aschersonia* sp. *Journal of Natural Products*. 59, 485-489.
  16. Moore, D., and C. Prior. 1993. The potential of mycoinsecticides. 1993. *Biocontrol News and Information* 14, 31N -40N.
  17. Lage, C., P. o. Thornqvist, A. Vey, M. W. Johansson, and K. Soderhall. 1990. The effect of the fungal toxin destruxin E on isolated crayfish haemocytes. *Journal of Insect Physiology* 36, 785-789.
  18. Parry, M. 1995. A review of mycochemical and insect interactions. *Biocontrol News and Information* 16, 27N -33N.
  19. Pendland, J., D. Lopez -Lastra., and D. G. Boucias. 1993. Laminarin -binding sites on cell wall of the entomopathogen *Nomuraea rileyi* associated with growth and adherence to host tissues. *Mycologia* 86, 327 -335.
  20. Roberts, D. W. 1981. Toxins of entomopathogenic fungi. In "Microbial Control Pest and Plant Diseases 1970 -1980." Ed. By Burges, H. D. pp441 -464. Academic Press. New York.
  21. Roberts, D. W. 1966. Toxins of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: production in submerged and surface cultures, and in inorganic and organic nitrogen media. *Journal of Invertebrate Pathology* 8, 212-221.
  22. Rowley, A. F., J. L. Brookman, and N. A. Ratcliffe. 1990. Possible involvement of the prophenoloxidase system of the locust, *Locusta migratoria*, in antimicrobial activity. *Journal of Invertebrate Pathology* 56, 31-38.
  23. Samuels, R. I., S. E. Reynolds, and A. K. Charnley. 1986. Mode of action of destruxins. In "Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology." Ed. by Samson, R. A., J. M. Valak, and D. Peters. Foundation of the Fourth International Colloquium of Invertebrate Pathology.
  24. Strasser, H., A. Vey, and T. M. Butt. 2000. Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to the bioactive metabolites of *Metarhizium*, *Tolyocladium* and *Beauveria* species? *Biocontrol Science and Technology* 10, 717 -735.
  25. Thomsen, J., and J. Eilenberg. 2000. Time-concentration mortality of *Pieris brassicae* and *Agrotis segetum* larvae from different destruxins. *Environmental Entomology* 29, 1041 -1047.