

绿僵菌素的分离制备及其对蛴螬的毒力

胡琼波^{1,2}, 任顺祥^{1,2,*}, 刘树艳^{1,2}

(1. 华南农业大学资源环境学院, 广州 510642; 2. 生物防治教育部工程研究中心, 广州 510642)

摘要: 以金龟子绿僵菌金龟子变种 *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* 菌株 MaQ10 发酵液为材料, 采用萃取、浓缩、制备色谱及重结晶技术, 分离纯化出 5 种绿僵菌素的晶体, 经与标准样品以及参考文献相对照, 此 5 种晶体与绿僵菌素 A、A₂、B、C 和 E 相吻合。进而, 采用浸渍法测定了绿僵菌素 A 和 B 对大等鳃金龟 *Exolontha serrulata* (Gyllenhal) 和卵圆齿爪鳃金龟 *Holotrichia ovata* Chang 1 龄幼虫的触杀毒力。结果表明: 绿僵菌素 A 和 B 对大等鳃金龟的触杀活性, 在处理 96~120 h 内最高, LC₅₀ 分别为 78.1571 mg/L 和 88.7562 mg/L; 处理浓度为 300 mg/L 时, LT₅₀ 分别为 13.4159 h 和 10.5331 h。绿僵菌素 A 和 B 对卵圆齿爪鳃金龟的触杀活性, 在处理 96 h 时最高, LC₅₀ 分别为 66.5308 mg/L 和 79.4309 mg/L; 处理浓度为 300 mg/L 时, LT₅₀ 分别是 13.6399 h 和 9.9451 h。

关键词: 绿僵菌素; 分离制备; 毒力; 大等鳃金龟; 卵圆齿爪鳃金龟

中图分类号: Q965 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2007)05-0461-06

Purification of destruxins produced by *Metarhizium anisopliae* and bioassay of their insecticidal activities against grubs

HU Qiong-Bo^{1,2}, REN Shun-Xiang^{1,2,*}, LIU Shu-Yan^{1,2} (1. College of Natural Resources and Environments, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Engineering Research Centre of Biological Control, Ministry of Education, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Five crystal destruxins were purified from the fermentation broth of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* strain MaQ10 via preparative HPLC and re-crystallization, which were classified to destruxin A, B, C, E and A₂, respectively. Contact toxicities of destruxins A and B against the grubs *Exolontha serrulata* (Gyllenhal) and *Holotrichia ovata* Chang were bioassayed by immersing the insects in aqueous dilutions. The results indicated that at 96 and 120 h after treatment, the LC₅₀s of destruxins A and B were estimated as 78.1571 mg/L and 88.7562 mg/L towards *E. serrulata* and 66.5308 mg/L and 79.4309 mg/L towards *H. ovata*, respectively. At the concentration of 300 mg/L, the LT₅₀s of destruxins A and B were 13.4159 h and 10.5331 h towards *E. serrulata*, and 13.6399 h and 9.9451 h towards *H. ovata*, respectively.

Key words: *Metarhizium anisopliae* destruxins; purification; toxicity; *Exolontha serrulata*; *Holotrichia ovata*

绿僵菌素(destruxins)是金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 产生的一类环缩羧肽类毒素, 具有较强而又多样化的生物活性(Pedras *et al.*, 2002; 胡琼波和任顺祥, 2004)。B 族绿僵菌素具有不同程度的植物毒性, 是芸苔链格孢菌 *Alternaria brassica* 对芸苔属 *Brassica* 植物的主要致病因子(Pedras *et al.*, 2002); 绿僵菌素的抗病毒、抗癌活性, 以及其他药用价值等也有报道(Yeh *et al.*,

1996; Chen *et al.*, 1997; Yoshimoto and Imoto, 2002; Nakagawa *et al.*, 2003); 绿僵菌素的杀虫活性研究报道更多, 已经证明了绿僵菌素对鳞翅目、同翅目、双翅目、等翅目、直翅目和鞘翅目的 20 多种害虫有毒杀和拒食作用(胡琼波和任顺祥, 2004), 但是绿僵菌素对蛴螬的生物活性研究未有报道。绿僵菌素作用机理的新颖性更是受到了普遍重视, 尽管目前尚不清楚它准确的作用靶标, 但是它对囊泡膜型质子

基金项目: 国家“十五”攻关项目(2004BA509B0604); 广东省自然科学基金项目(010312)

作者简介: 胡琼波, 男, 1963 年生, 湖南岳阳人, 博士, 副教授, 主要从事昆虫真菌研究工作, E-mail: hqbscau@126.com

* 通讯作者 Author for correspondence, Tel.: 8620-85288313, Fax: 8620-85280292, E-mail: rensxcn@yahoo.com.cn

收稿日期 Received: 2006-07-05; 接受日期 Accepted: 2007-04-16

泵(vacuolar-type H^+ -ATPase)的抑制活性(Yoshimoto and Imoto, 2002; Vazquez *et al.*, 2005),以及对昆虫血细胞免疫活性的破坏作用(Vilcinskas *et al.*, 1997a, 1997b; Vey *et al.*, 2002),使其展现了良好的新药开发潜力和科学研究价值。我国具有非常丰富的虫生真菌资源,在它的开发利用方面取得了很大成功,但是在虫生真菌毒素研究领域非常薄弱,开展绿僵菌素的研究将有助于本学科的全面发展。

蛴螬是国内外公认难以防治的土栖性害虫,多达 30 000 余种,我国目前已记录约 1 800 种,植物地下部受害的 86% 由蛴螬造成,近年来,蛴螬发生越来越严重,为了控制它的危害,不得不依赖高毒杀虫剂(姚学庆等, 2003)。虽然,人们早在 1879 年就开始利用绿僵菌分生孢子防治蛴螬,但是由于防治效果的不稳定性和缓效性,而限制了它的广泛应用。研究绿僵菌素对蛴螬的生物活性,将有利于蛴螬生防技术的发展。

本研究旨在探索绿僵菌素的分离制备方法,及其对蛴螬的生物活性,以便拓宽虫生真菌的研究范畴,为绿僵菌素的开发利用、以及寄主昆虫-虫生真菌体系相互作用的深入研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 绿僵菌素的分离制备

1.1.1 供试菌株与培养:供试菌株为金龟子绿僵菌金龟子变种 *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* 菌株 MaQ10,该菌株系作者于 2003 年从大等鳃金龟 *Exolontha serrulata* (Gyllenhal) 虫尸上分离的绿僵菌素高产菌株(Hu *et al.*, 2006)。

从斜面菌种上挑取分生孢子,用灭菌吐温-80 溶液配成孢子悬浮液,再接入 Czapek-Dox-0.5% Peptone 培养液(蛋白胨 5 g, $NaNO_3$ 3 g, K_2HPO_4 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, KCl 0.5 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g, 蔗糖 30 g, 琼脂 15~20 g, 水 1 000 mL),使孢子浓度保持 10^7 /mL 左右,然后在 180 r/min 和 26℃ 下振荡培养 3 天,再按 1:9 比例将种子液接入发酵液(麦芽糖 25.5 g, 蛋白胨 7.5 g, β -丙氨酸 0.2 g, 葡萄糖 5 g, 水 1 000 mL, 调整 pH 值至 8.0。Liu *et al.*, 2000)中扩大培养 8 天(240 r/min),然后将发酵物离心去渣,保留滤过液备用。后续培养在 1 000 mL 三角瓶中进行,共发酵 10 L。

1.1.2 萃取与浓缩:将滤过液调整 pH 值至 3.0,用

等体积的乙酸乙酯和二氯甲烷混合物(1:1, v/v)萃取 3 次,收集有机相并在旋转蒸发器(RE-52A, 上海亚荣生化仪器厂)上浓缩,得到粗毒素。

1.1.3 分离与纯化:将粗毒素用乙腈溶解稀释,然后在制备型高效液相色谱上进一步分离。色谱条件如下:Agilent 1100 高效液相色谱仪,配以 G1311A 泵, G1313A AIS 自动进样器, G1379A 脱气机和 G1315B DAD 紫外检测器。色谱柱为反相柱 Zorbax TK1037 型(9.4 mm \times 150 mm 5 μ m)。馏份收集器采用 Gilson FC203B(USA)。流动相:50%(v/v)乙腈,流速 0.5 mL/min;进样量 100 μ L/次,检测波长 215 nm。按保留时间收集馏份。

制备色谱分离的各馏份,经蒸发浓缩,再用苯和正己烷重结晶,分离毒素晶体。

1.1.4 绿僵菌素的鉴定:绿僵菌素 A 采用 Sigma 公司的标准样品,通过高效液相色谱法(HPLC)鉴定。其他绿僵菌素则通过液-质联用(HPLC-MS)技术进行鉴定,条件如下:仪器:LCQ^{DECA} 液-质联用仪(FINNIGAN, USA)。HPLC:P4000 泵, AS3000 自动进样器, UV6000LP 紫外检测器, 50%(v/v)乙腈/水洗脱,检测波长 215 nm。MS:采用 APCI 正、负离子分析(APCI \pm C),加热毛细管温度 250℃,蒸发温度 350℃,鞘气流速 70 单位,辅助气流速 10 单位,加热毛细管电压 15 V,放电电压 6 kV,放电电流 5 mA。

1.2 对蛴螬的毒力测定

1.2.1 供试昆虫及其饲养:以卵圆齿爪鳃金龟 *Holotrichia ovata* Chang 和大等鳃金龟幼虫为供试昆虫。

于 2~3 月捕捉金龟子成虫,经鉴定后隔离饲养于温棚之内,令其产卵,再于 4~5 月采集 1 龄蛴螬,在实验室内饲养 1 天后,选择健康、大小一致的虫子用于试验。

1.2.2 毒力测定:采用浸渍法测定绿僵菌素 A 和 B 对蛴螬的触杀毒力。用 0.01% 的吐温-80 溶液将绿僵菌素稀释为一个等比梯度:300、150、75、37.5 和 18.75 mg/L,对照为 0.01% 的吐温-80 溶液。

将供试蛴螬在药液或对照液中浸泡 10 s,晾干后放入塑料杯中,杯内装 100 g 经过灭菌的土壤,每杯养虫 1 头,杯中放入若干粒发芽麦粒作为饲料,在 25℃ 下饲养。每个处理 10 头蛴螬,重复 3 次(30 头),同样实验重复 2 次。每隔 24 h 检查结果。记录死亡虫数,采用 DPS 统计软件分析实验结果,求毒力方程和半致死浓度 LC_{50} 及半致死时间 LT_{50} 。

2 结果与分析

2.1 绿僵菌素的分离制备

MaQ10 菌株发酵液的粗提物在 HPLC 中主要有 5 个峰(图 1)。将该 5 个主峰收集后,通过苯/正己烷重结晶获得了峰 4 和峰 5 的晶体,前者为白色针状结晶,后者为白色絮状结晶;其他 3 个峰,因为量很少,不便重结晶,浓缩干燥后均得到白色粉状物。经过内标法 HPLC,发现峰 4 与绿僵菌素 A 的标准样品重叠一致,因此判定该峰所得晶体是绿僵菌素 A,它的保留时间(retention time)是 15.6 min。其他 4 个峰分别通过液-质联用技术得以进一步鉴定,它们的质谱分析图(图 2)中横轴表示荷质比(m/z),其数值

是质子质量与被测物质分子量之和,即峰 1 的分子量是 $594.4 - 1 = 593.4$,峰 2 的分子量是 $610.5 - 1 = 609.5$,依理,峰 3 和峰 5 的分子量分别是 563.4 和 593.4。可见,峰 1 与峰 5 的分子量相同,二者互为同分异构体,参照已经发表的文献(Pais *et al.*, 1981; Jegorov *et al.*, 1998)分析,只有绿僵菌素 B 与峰 5 的分子量正好都是 593,再根据它们的极性差异判断,绿僵菌素 E 的极性大于绿僵菌素 B,在反相 HPLC 中绿僵菌素 E 的保留时间短于绿僵菌素 B,因此断定峰 1 为绿僵菌素 E,而峰 5 为绿僵菌素 B。峰 2 的分子量及其较大的极性与绿僵菌素 C 吻合,而峰 3 的分子量和极性与绿僵菌素 A₂ 相吻合,因此判断该两种化合物分别为绿僵菌素 C 和 A₂。

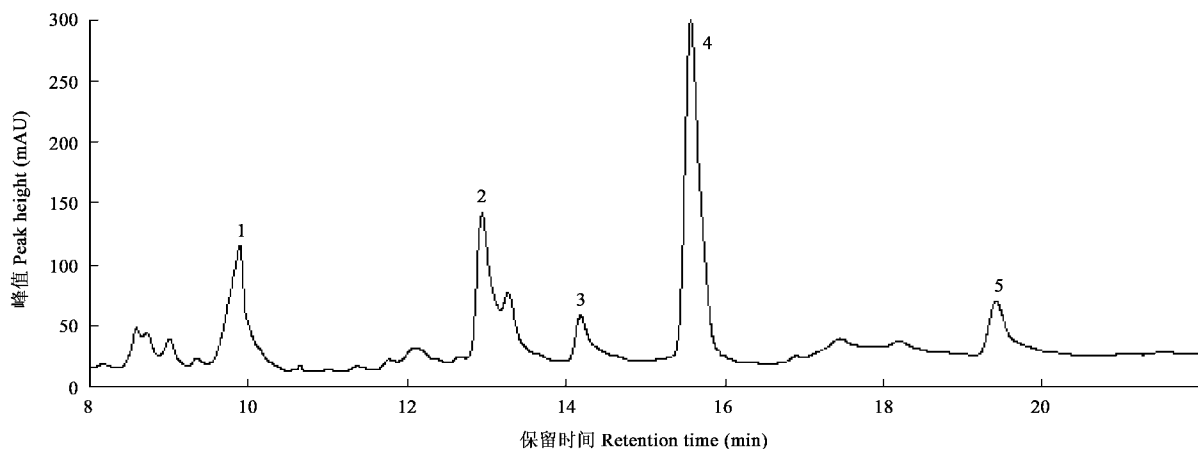


图 1 MaQ10 菌株发酵液萃取物的 HPLC 图谱

Fig. 1 Profiles of HPLC of extracts from broth of strain MaQ10

2.2 绿僵菌素对大等鳃金龟的触杀活性

绿僵菌素对 1 龄大等鳃金龟幼虫具有较强的触杀作用,在处理一定时间后,即出现中毒死亡现象,

累积死亡虫数在处理 96~120 h 达到最大值(表 1)。毒力方程经卡方测验达到显著水平($P < 0.05$) (表 2),说明拟合良好。绿僵菌素 A 在处理 24~

表 1 不同浓度绿僵菌素 A 和 B 处理后不同时间蛴螬的累积死亡数

Table 1 Accumulative number of the grubs killed by destruxins A and B at different time after immersion in tier concentrations of aqueous dilutions

绿僵菌素 Destruxin	浓度 (mg/L)	大等鳃金龟 <i>Exolontha serrulata</i>						卵圆齿爪鳃金龟 <i>Holotrichia ovata</i>						
		0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	
A	18.75	60	5	7	7	7	7	60	6	7	7	7	7	7
	37.5	60	11	13	14	14	14	60	9	12	14	16	16	
	75	60	21	22	24	24	24	60	22	24	24	28	28	
	150	60	34	41	46	46	46	60	32	42	47	51	51	
	300	60	40	46	52	55	55	60	41	47	54	57	57	
B	18.75	60	4	7	7	7	7	60	5	7	9	9	9	
	37.5	60	9	12	17	17	17	60	7	11	18	18	18	
	75	60	17	22	28	28	28	60	16	24	27	28	28	
	150	60	31	36	40	41	41	60	32	37	41	41	41	
	300	60	36	41	44	45	46	60	39	42	47	50	50	
对照 CK	0	60	0	0	0	0	0	60	0	0	0	0	0	

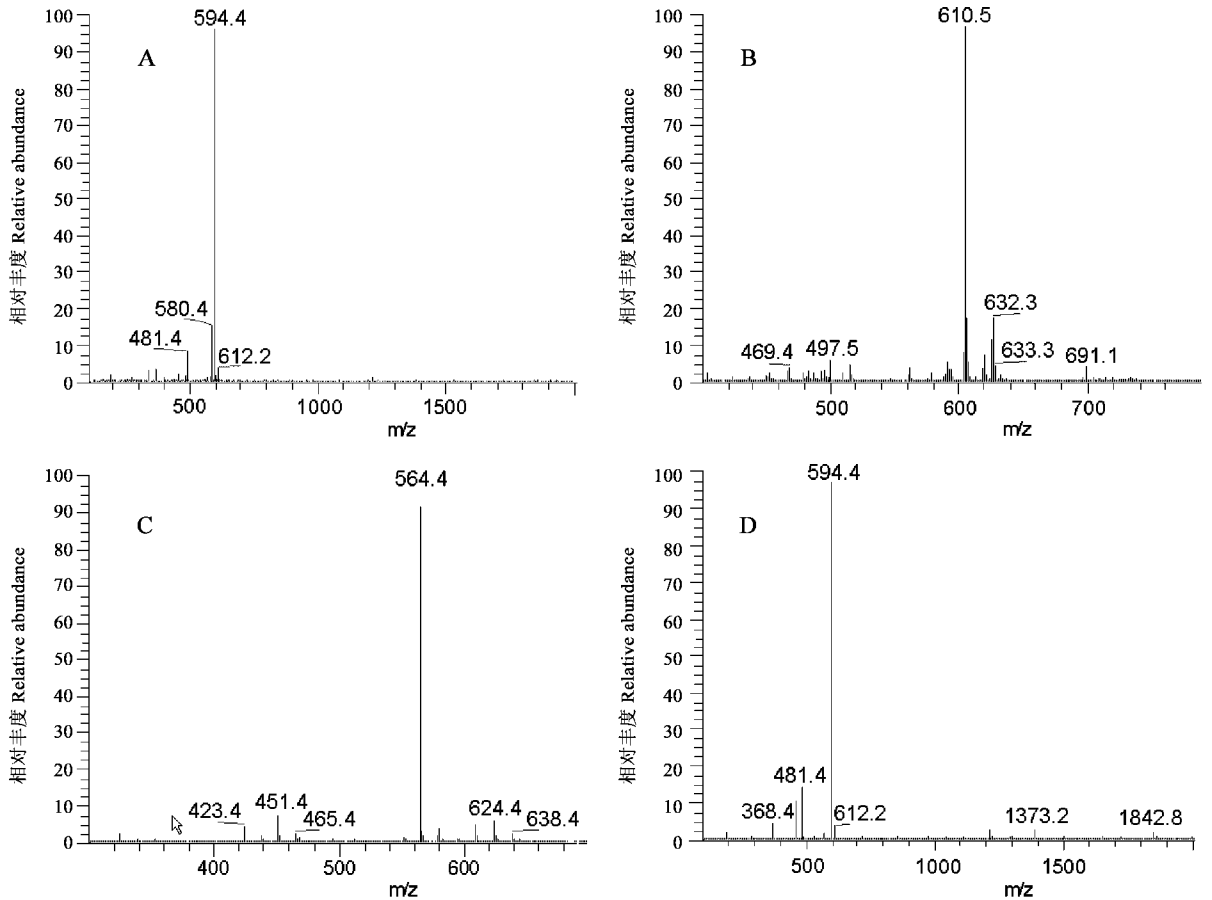


图2 4种绿僵菌素的质谱分析图

Fig. 2 Profiles of mass spectrometry (MS) spectra for destruxins

A, B, C 和 D 分别代表 HPLC 图谱 (图 1) 中峰 1、峰 2、峰 3 和峰 5。

A, B, C and D represented respectively the peak no. 1, 2, 3 and 5 in HPLC profile (Fig. 1).

96 h LC_{50} 值不断降低, 从处理后 96 至 168 h LC_{50} 稳定在 78.1571 mg/L。绿僵菌素 B 与 A 相似, 但是 LC_{50} 值至处理后 120 h 才稳定下来, 达到 88.7562 mg/L。可见, 绿僵菌素 B 比 A 的毒效稍差。

绿僵菌素 A、B 的半致死时间 LT_{50} 相当 (表 3), 在浓度为 300 mg/L 时, 绿僵菌素 A 和 B 的 LT_{50} 分别为 13.4159 h 和 10.5331 h; 当浓度为 150 mg/L 时, 分别为 15.9373 h 和 21.1843 h。

2.3 绿僵菌素对卵圆齿爪鳃金龟的触杀活性

卵圆齿爪鳃金龟 1 龄幼虫在绿僵菌素处理 96 h 后, 其累积死亡虫数即达到最大值 (表 1)。经卡方测验, 不同时间段的毒力方程拟合良好, 均达到显著水平 ($P < 0.05$) (表 2)。绿僵菌素 A 和 B 的半致死浓度 LC_{50} 值都在处理后第 96 h 稳定下来, 分别达到 66.5308 mg/L 和 79.4309 mg/L。

2 种毒素作用的半致死时间 LT_{50} 相似, 当处理浓度为 300 mg/L 时, 绿僵菌素 A 和 B 的 LT_{50} 分别是

13.6399 h 和 9.9451 h; 而当处理浓度为 150 mg/L 时, 分别为 22.1895 h 和 18.4522 h (表 3)。可见, 2 种蛴螬比较, 绿僵菌素的毒力差别不大。

3 讨论

自从 Kodaira (1961) 首次分离绿僵菌素 A 和 B 至今, 虽然鉴定出多种绿僵菌素的同系物, 但大多集中在结构分析和物理化学性质判定上, 对于制备方法则仍然局限在繁杂的流程之中, 萃取与层析过程消耗大量的高毒溶剂, 如苯、二甲苯、二氯甲烷等; 并且耗费大量时间, 纯化一个毒素至少需要好几天, 极不适合于分离绿僵菌素 E 等性质不稳定的毒素。因此, 一些研究者试图解决这些问题, Chen 等 (1999) 采用二氯甲烷萃取、离子交换与硅胶吸附层析方法, 再利用半制备型色谱, 从绿僵菌的发酵液中分离到了高纯度 (>90%) 的绿僵菌素 A 与 B。Liu 等 (2004)

表 2 绿僵菌素对 2 种金龟子的触杀毒力与半致死浓度

Table 2 Equations of LC-p and LC₅₀s of destruxins against two species of grubs

绿僵菌素 Destruxin	处理后时间 Time after treatment (h)	截距 Intercept	斜率 Slope ($\pm SE$)	R	χ^2	P	LC ₅₀ (mg/L)及其 95% 置信区间 LC ₅₀ with 95% CI
大等鳃金龟 <i>Exolontha serrulata</i>							
A	24	1.6901	1.5479 \pm 0.2013	0.9947	0.8463	0.8384	137.5174 (107.1054 – 192.0804)
	48	1.5565	1.7167 \pm 0.2027	0.9887	2.0400	0.5641	101.3768 (82.0897 – 129.5383)
	72	1.0826	2.0477 \pm 0.2153	0.9890	2.6575	0.4475	81.8726 (68.2149 – 99.0319)
	96 ~ 120	0.8165	2.2100 \pm 0.2235	0.9895	2.9517	0.3991	78.1571 (65.7229 – 93.2577)
B	24	1.6138	1.5092 \pm 0.2060	0.9924	1.2091	0.7508	175.2570 (131.6942 – 265.8251)
	48	1.9006	1.4788 \pm 0.1965	0.9921	1.1061	0.7756	124.7060 (97.1611 – 172.3460)
	72	2.0053	1.5190 \pm 0.1943	0.9871	1.7829	0.6187	93.6427 (74.2530 – 121.6666)
	96	1.9222	1.5734 \pm 0.1960	0.9885	1.6987	0.6372	90.3983 (72.1739 – 115.9364)
	120	1.8593	1.6121 \pm 0.1972	0.9918	1.2307	0.7457	88.7562 (71.1826 – 112.9658)
卵圆齿爪鳃金龟 <i>Holotrichia ovata</i>							
A	24	1.6795	1.5486 \pm 0.2016	0.9916	0.9918	0.8032	139.3949 (108.4221 – 195.3782)
	48	1.4423	1.7925 \pm 0.2052	0.9890	2.0280	0.5666	96.5643 (78.8495 – 121.4712)
	72	0.8761	2.1773 \pm 0.2217	0.9885	3.1688	0.3663	78.3540 (65.7645 – 93.6930)
	96	0.5472	2.4425 \pm 0.2379	0.9912	3.0346	0.3863	66.5308 (56.1900 – 78.0642)
B	24	1.3858	1.6353 \pm 0.2103	0.9849	1.9543	0.5819	162.2427 (125.0673 – 233.7016)
	48	1.8014	1.5454 \pm 0.1980	0.9883	1.6684	0.6440	117.4019 (92.6486 – 158.0224)
	72	2.0221	1.5441 \pm 0.1946	0.9963	0.5414	0.9097	84.8396 (67.4209 – 108.4824)
	96	1.8377	1.6644 \pm 0.1986	0.9995	0.0924	0.9927	79.4309 (63.9130 – 99.3748)

表 3 绿僵菌素对 2 种金龟子的触杀毒力与半致死时间

Table 3 Equations of LT-p and LT₅₀s of destruxins against two species of grubs

绿僵菌素 Destruxin	浓度(mg/L) Concentration	截距 Intercept	斜率 Slope ($\pm SE$)	R	χ^2	P	LT ₅₀ (h)及其 95% 置信区间 LT ₅₀ with 95% CI
大等鳃金龟 <i>Exolontha serrulata</i>							
A	300	3.2893	1.5171 \pm 0.4131	0.9794	0.6193	0.7337	13.4159 (2.6320 – 22.8447)
	150	3.7929	1.0039 \pm 0.3753	0.9807	0.2550	0.8803	15.9373 (0.5414 – 28.7963)
B	300	4.2623	0.7215 \pm 0.3731	0.9964	0.0254	0.9874	10.5331
	150	4.0014	0.7531 \pm 0.3641	0.9939	0.0512	0.9747	21.1843 (0.0000 – 38.1002)
卵圆齿爪鳃金龟 <i>Holotrichia ovata</i>							
A	300	3.1101	1.6654 \pm 0.4176	0.9190	3.2598	0.1960	13.6399 (3.3272 – 22.8188)
	150	2.9684	1.5092 \pm 0.3804	0.9818	0.5812	0.7478	22.1895 (8.4084 – 32.3257)
B	300	4.1187	0.8834 \pm 0.3820	0.9093	1.1722	0.5565	9.9451 (0.0007 – 23.4852)
	150	4.1206	0.6946 \pm 0.3653	0.9650	0.2573	0.8793	18.4522

发现乙腈对绿僵菌素具有很高的萃取效率,乙腈用量与发酵液相等,另加 5% 的氯化钠促进分层,结果在有机相中绿僵菌素 B 的浓度可以高达 80% 以上,用冻干法很容易用结晶析出,剩下的部分可用半制备色谱进一步纯化。本实验采用制备色谱技术,省去了常规的手工柱层析方法,使时间大大缩短,并且节省了溶剂,但是,实验中绿僵菌素的回收率不高,只有 60% ~ 70% 左右,因此分离条件还需要进一步优化。另外,本实验选用了高产菌株 MaQ10 和优化发酵培养基,是成功分离制备绿僵菌素的重要原因。

测定杀虫剂触杀毒力的方法有很多,如浸渍法、

喷雾法和点滴法等。浸渍法简单、方便、易操作,但是不够准确,因为不能排除有一定量的药剂从口腔进入虫体而造成胃毒作用。本实验采用浸渍法,主要是考虑到蛴螬体表多毛,点滴和喷雾法都不易使药剂接触体壁,并且由于蛴螬的土栖性,取食植物根部,测定胃毒作用的难度很大。因此,使用浸渍法虽然准确度受到一些影响,但是它结合了触杀与胃毒两者的活性,具有实际意义。从实验数据来看,绿僵菌素 A 和 B 的毒力差别不大,而且 2 种蛴螬对 2 种绿僵菌素的敏感性也非常接近,这可能与 2 种蛴螬较近的亲缘关系有着一定联系。

本实验是首次有关绿僵菌素对蛴螬生物活性的

研究,以前,证明绿僵菌素具有胃毒作用的实验较多,但是关于绿僵菌素的触杀活性只有 2 篇报道, Poprawski 等(1994)发现绿僵菌素对一种微叶蝉 *Empoasca vitis* 具有触杀活性; Amiri 等(1999)则报道了对小菜蛾 *Plutella xylostella* 和一种甲虫 *Phaedon cochleariae* 的触杀作用。由于试虫种类和试验条件差异大,难以比较不同实验间的绿僵菌素半致死量的差异。然而,关于绿僵菌素的见效时间则不同实验之间差异很大,对小菜蛾和甲虫 *Phaedon cochleariae* 的触杀作用 24 ~ 48 h 即可见效(Amiri *et al.*, 1999),对黄地老虎 *Agrotis segetum* 的胃毒作用则要 10 多天才有效(Thomsen and Eilenberg, 1996),本实验中的 2 种蛴螬在处理 4 天左右达到最大死亡率,与 Amiri 等(1999)的结果更为相近,说明绿僵菌素有较好的速效性。

绿僵菌素的作用方式是多样的,胃毒、触杀和拒食作用都存在,而且影响昆虫生长发育(Pedras *et al.*, 2002)绿僵菌素的杀虫活性往往是因为中毒和饥饿两个因素综合作用而造成的(Thomsen and Eilenberg, 1996; Amiri *et al.*, 1999)。绿僵菌素对蛴螬的作用方式是否也是多样的,是否具有拒食作用、胃毒作用和忌避作用,是否影响生长发育,以及其他化学或生物杀虫剂的相互作用如何等等,都是值得进一步研究的问题。

致谢 因为审阅者给予了耐心细致的评阅,提出了中肯的修改意见,本文才得以发表,作者对此表示深深的谢意。

参 考 文 献 (References)

Amiri B, Ibrohim L, Butt TM, 1999. Antifeedant properties of destruxins and their potential use with the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* for improved control of crucifer pests. *Biocontrol Science and Technology*, 9: 487 - 498.

Chen HC, Chou CK, Sun CM, Yeh SF, 1997. Suppressive effects of destruxin B on hepatitis B virus surface antigen gene expression in human hepatoma cells. *Antiviral Research*, 34(3): 137 - 144.

Chen JW, Liu BL, Tzeng YM, 1999. Purification and quantification of destruxins A and B from *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Chromatography A*, 830(1): 115 - 125.

Hu QB, Ren SX, 2004. Review of destruxins of *Metarhizium anisopliae* Sorokin. *Chinese Journal of Biological Control*, 20(4): 234 - 242. [胡琼波,任顺祥,2004.绿僵菌素的研究进展.中国生物防治,20(4): 234 - 242]

Hu QB, Ren SX, Wu JH, Chang JM, Musa PD, 2006. Investigation of destruxin A and B from 80 *Metarhizium* strains in China, and the optimization of cultural conditions for the strain MaQ10. *Toxicon*, 48(5): 491 - 498.

Jegorov A, Havlicev V, Sedmera P, 1998. Rapid screening of destruxins by liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 33: 274 - 280.

Kodaira Y, 1961. Toxic substances to insects, produced by *Aspergillus ochraceus* and *Oospora destructor*. *Agric. Biol. Chem.*, 25: 261 - 262.

Liu BL, Chen JW, Tzeng YM, 2000. Production of cyclodepsipeptides destruxin A and B from *Metarhizium anisopliae*. *Biotechnol. Progr.*, 16(6): 993 - 999.

Liu CM, Huang SS, Tzeng YM, 2004. Purification and quantitative analysis of destruxins from *Meterhizium anisopliae* by HPLC. *J. Liq. Chromato. R. T.*, 27(6): 1 013 - 1 025.

Nakagawa H, Takami M, Udagawa N, 2003. Destruxins, cyclodepsipeptides, block the formation of actin rings and prominent clear zones and ruffled borders in osteoclasts. *Bone*, 33: 443 - 455.

Pais M, Das BC, Ferron P, 1981. Depsipeptides from *Metarhizium anisopliae*. *Phytochemistry*, 20(4): 715 - 723.

Pedras MSC, Zaharia LI, Ward DE, 2002. The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity. *Phytochemistry*, 59: 579 - 596.

Poprawski TJ, Robert PH, Maniania NK, 1994. Contact toxicity of the mycotoxin destruxin E to *Empoasca vitis*. *J. Appl. Entomol.*, 117: 135 - 143.

Thomsen L, Eilenberg J, 2000. Time-concentration mortality of *Pieris brassicae* (Lepidoptera: Pieridae) and *Agrotis segetum* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae from different destruxins. *Pest Manag. Samp.*, 29: 1 041 - 1 048.

Vazquez MJ, Albarran ML, Espada A, 2005. A new destruxin as inhibitor of vacuolar-type H⁺-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Chem. Biodivers.*, (2): 126 - 130.

Vey A, Matha V, Dumas C, 2002. Effects of the peptide mycotoxin destruxin E on insect haemocytes and on dynamics and efficiency of the multicellular immune reaction. *J. Invertebr. Pathol.*, 80: 177 - 187.

Vilcinskas A, Matha V, Gotz P, 1997a. Effects of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its secondary metabolites on morphology and cytoskeleton of plasmatocytes isolated from the greater wax moth *Galleria mellonella*. *J. Insect Physiol.*, 43(12): 1 149 - 1 159.

Vilcinskas A, Matha V, Gotz P, 1997b. Inhibition of phagocytic activity of plasmatocytes isolated from *Galleria mellonella* by entomogenous fungi and their secondary meabolites. *J. Insect Physiol.*, 43(5): 475 - 483.

Yao QX, Zhang Y, Ding Y, 2003. Review on the advance and prospect of scarabs control research. *Journal of Northeast Forestry University*, 31(1): 4 - 66. [姚庆学,张勇,丁岩,2003.金龟子防治研究的回顾与展望.东北林业大学学报,31(1): 4 - 66]

Yeh SF, Pan W, Ong GT, Chiou AJ, Chuang CC, Chiou SH, Wu SH, 1996. A study of structure-activity correlation in destruxins, a class of cyclodepsipeptides possessing suppressive effect on the generation of hepatitis B virus surface antigen in human hepatoma cells. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 229: 65 - 72.

Yoshimoto Y, Imoto M, 2002. Induction of EGF-dependent apoptosis by vacuolar-type H⁺-ATPase inhibitors in A431 cells overpressing the EGF receptor. *Exp. Cell Res.*, 279: 118 - 127.