

绿僵菌素对四种昆虫细胞的毒性*

何广位^{1,2**} 胡维娜^{1,2**} 胡琼波^{1,2***}

(1. 教育部天然农药与化学生物学重点实验室, 华南农业大学, 广州 510642;

2. 农业部华南作物有害生物综合治理重点实验室, 广州 510642)

摘要 【目的】绿僵菌素 (Destruxins) 是绿僵菌产生的具有杀虫活性的次生代谢产物, 本研究以家蚕 *Bombyx mori* Bm12 细胞、亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 血细胞 (Ofh)、果蝇 S2 细胞和草地贪夜蛾 Sf9 细胞为对象, 探索绿僵菌素对不同昆虫细胞的毒性差异。【方法】采用 MTT 法和显微观察法比较绿僵菌素 A、B (DA、DB) 以及两者等量混合物 (DABM) 对上述 4 种昆虫细胞的影响, 比较其 IC₅₀ 值和形态学变化。【结果】绿僵菌素处理 24 h 后, 在较低处理剂量 (< 25 µg/mL) 下, Ofh 细胞比 Bm12、S2、Sf9 细胞对 DA、DB 和 DABM 更为敏感, DA、DB 和 DABM 对 Ofh 细胞 IC₅₀ 值分别 219.19、112.29 和 34.86 µg/mL, 而对 Bm12、S2、Sf9 细胞的 IC₅₀ 值均大于 250 µg/mL; DA 和 DB 对 Ofh 细胞具有协同增效作用, 对 Sf9 细胞具拮抗作用, 对 Bm12 和 S2 细胞具相加作用。显微观察发现, 绿僵菌素处理后, 6.25 µg/mL 的低剂量下, 即可发现细胞的形态变化, 剂量越高, 变化越显著。Bm12 细胞出现瘤状突起、细胞破碎、聚集、扩展及胞内空泡等现象, 且细胞数量减少; Ofh 细胞扩展, 似乎回归到浆血细胞及类绛色细胞的形态, 发生凝集现象, 少数出现瘤状突起和细胞破碎; S2 细胞出现明显的胞内空泡, 少数发生扩展、破碎和聚集现象; Sf9 细胞细胞膜收缩、细胞空泡、破碎, 细胞数量减少等变化。【结论】玉米螟的血细胞 Ofh 对绿僵菌素最为敏感, 而来自非寄生昆虫果蝇的 S2 细胞最不敏感。绿僵菌素对 4 种细胞的致死剂量较高, 但引起细胞形态改变的剂量却非常低。

关键词 绿僵菌素, 昆虫细胞, 毒性

Toxicity of destruxins to four insect cell lines

HE Guang-Wei^{1,2**} HU Wei-Na^{1,2**} HU Qiong-Bo^{1,2***}

(1. The Key Laboratory of Natural Pesticide and Chemical Biology, South China

Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2. Key Laboratory of Integrated Pests Management of Southern China, Ministry of Agriculture, Guangzhou 510642, China)

Abstract [Objectives] Destruxins are insecticidal secondary compounds isolated from *Metarhizium anisopliae*. In this study, the toxicity of different destruxins was tested on four insect cell lines, i.e., *Bombyx mori* Bm12, *Ostrinia furnacalis* hemocytes Ofh, *Drosophila melanogaster* S2 and *Spodoptera frugiperda* Sf9. [Methods] MTT and microscopy analysis were employed to evaluate the effects of destruxins A and B (DA and DB), and a 1/1 (m/m) mixture of these compounds (DABM), on the four insect cell lines. Relative toxicity was assessed by comparing IC₅₀s values and morphological changes in the cell lines. [Results] The results indicate that Ofh cells were more susceptible to lower dosages (< 25 µg/mL) of DA and DB, with IC₅₀ values of 219.19, 112.29 and 34.86 µg/mL for DA, DB and DABM, respectively, compared to IC₅₀ values > 250 µg/mL in the other cell types. Furthermore, DA and DB had a synergistic effect on Ofh cells, but an antagonistic effect on Sf9 cells, and an additive effect on Bm12 and S2 cells. Microscopy revealed morphological changes in the different cell lines, even at dosages as low as 6.25 µg/mL. Moreover, these morphological changes became more apparent at higher dosages. Ruptured cells, strumae, aggregation, expanded cells, vacuoles and reduced cell numbers were found in Bm12 cells. In Ofh cells, cells

* 资助项目 Supported projects: 863 课题 (2011AA10A204-2)

**第一作者 First author, E-mail: heguangwei1976@qq.com; 591877328@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: hqbscau@scau.edu.cn

收稿日期 Received: 2014-01-04, 接受日期 Accepted: 2014-05-08

became expanded but appeared to return to normal with aggregation. Vacuoles and a few expanded, ruptured and aggregated cells were found in the S2 cell line, and membrane shrinkage, broken cells and a decrease in cell numbers were recorded in the Sf9 cell line. **[Conclusion]** The Ofh cell line was the most sensitive to destruxins, and the non-host insect *Drosophila melanogaster* S2 cell line the least sensitive. The results suggest that although relatively large doses of destruxins are required to kill insect cells, smaller dosages are sufficient to cause changes in cell morphology.

Key words destruxins, insect cells, toxicity

绿僵菌素 (Destruxins) 是由金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 产生的一类环缩羧肽类次生代谢物质, 具有杀虫活性, 也是绿僵菌的关键致病因子 (Pedras *et al.*, 2002; 胡琼波和任顺祥, 2004)。目前已经发现 39 种绿僵菌素同系物, 其中绿僵菌素 A 和 B (DA 和 DB) 是最常见的同系物种类 (Liu and Tzeng, 2012)。绿僵菌素具有昆虫免疫抑制活性, 引起大蜡螟 *Galleria mellonella* 血细胞的细胞核固缩及胞质囊泡化, 使其粘附、伸展能力丧失, 细胞骨架不能形成, 吞噬功能丧失 (Vilcinskis *et al.*, 1997a, 1997b)。在绿僵菌素协同作用下, 原本不致病性的黑曲霉 *Aspergillus niger* 也可引起大蜡螟发病死亡, 其原因是绿僵菌素抑制了昆虫的血淋巴免疫作用, 使之不能发挥吞噬与囊胞化功能, 即使在极低剂量下 (0.005 $\mu\text{g/mL}$), 绿僵菌素也可引起血细胞的形态变化 (Vey *et al.*, 2002)。绿僵菌素可抑制果蝇 *Drosophila melanogaster* 的血淋巴免疫活性, 大肠杆菌 *Escherichia coli* 与绿僵菌素被同时接种到果蝇血腔后, 大肠杆菌的滴度显著提高, 其原因是绿僵菌素抑制了果蝇抗菌肽的形成, 从而降低了果蝇对大肠杆菌的抑制作用, 绿僵菌素处理的果蝇抗菌肽基因表达水平显著下调, 其它免疫相关基因的表达水平也显著改变, 绿僵菌素可能作用于 IMD 信号通路的某个节点 (Pal *et al.*, 2007)。笔者的前期研究也发现, 绿僵菌素能够引起家蚕血细胞形态改变 (Fan *et al.*, 2013), 且造成蛱蝶血细胞内钙离子深度升高和氢离子深度降低, 但对斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* SL-1 细胞没有影响 (Chen *et al.*, 2014)。综上所述, 绿僵菌素对昆虫血细胞具有毒性, 可抑制其免疫功能, 但是, 绿僵菌素对其他昆虫细胞毒性的研究报告很少, 绿僵菌

素及其同系物的混合体对不同昆虫细胞是否具有选择作用目前知之甚少。本研究将考察绿僵菌素 A、B 及其等量混合物对 4 种昆虫细胞的毒性, 研究结果对于理解绿僵菌素对细胞的选择性具有一定指导意义。

1 材料与方法

1.1 细胞与培养

供试细胞系: 家蚕 *Bombyx mori* (Linnae) Bm12 由华南农业大学动科学院曹阳教授馈赠, 采用 TNM-FH 培养基 (Hyclone 公司) 培养; 亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* (Guenée) 幼虫血细胞 (Ofh) 由中山大学生命科学学院胡建博士馈赠, 采用 EX-CELL 420 (Sigma 公司) 培养基培养; 果蝇 *Drosophila melanogaster* (Meigen) S2 细胞由中国科学院上海植物生理生态研究所凌尔军研究员馈赠, 采用 Schneider (Sigma 公司) 培养基培养; 草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) Sf9 细胞由华南农业大学资源环境学院钟国华馈赠, 采用 SFX 培养基 (Hyclone 公司) 培养。上述 4 种培养基均加入 10% 胎牛血清 (Gibco 公司), 在 27℃ 下恒温培养传代, 贴壁细胞 Bm12、S2、Sf9 每隔 2~4 d 传代一次, 悬浮细胞 Ofh 每隔 3~4 d 传一次。取对数生长期的细胞用于实验。

1.2 绿僵菌素与处理

绿僵菌素 A 和绿僵菌素 B (DA 和 DB) 由本实验室制备 (Hu *et al.*, 2006)。分别取 DA、DB 和两者等量 (m/m) 混合物 (DABM) 1 mg, 加入 100 μL 二甲基亚砜 (DMSO, Sigma 公司) 溶解, 制成 10 000 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ 的绿僵菌素贮备液, -80℃ 短时间保存备用。处理时取贮备液, 再加

细胞培养基稀释成 4 000、2 000、1 000、500、250、125 和 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ 的处理液系列。

1.3 MTT 法检测绿僵菌素对 4 种细胞的毒性

MTT 法原理是活细胞中琥珀酸脱氢酶能将四唑盐 MTT 还原成不溶于水的蓝色甲瓚 (Formazan) 并沉积在细胞中,而死细胞没有这个功能。二甲基亚砷可以溶解细胞中蓝色甲瓚,溶液颜色深浅和甲瓚量成正比。酶标仪测定的光密度 (OD) 值可间接反映活细胞数量,光密度与细胞种类无关。将得到的 OD 值按如下公式换算成细胞死亡率。

死亡率 (%) = $1 - (\text{实验组 OD 值} - \text{本底 OD 值}) / (\text{对照组 OD 值} - \text{本底 OD 值}) \times 100$ 。

在 96 孔板(美国 Corning Incorporated 公司)中,每孔加入 90 μL 受试细胞悬浮液,静置 24 h,待细胞浓度为 1×10^5 个/mL 时,分别滴加 10 μL 绿僵菌素处理液,使绿僵菌素终浓度达到 6.25、12.5、25、50、100、200 和 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$,以 1% 的 DMSO 培养基为对照,以不加细胞的完全培养基为本底。每个处理重复 4 次,在 27 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中分别培养 24 h 后,每孔加入 50 μL 1 $\times$ MTT(南京凯基生物科技发展有限公司)27 $^{\circ}\text{C}$ 培养 4 h,吸出上清液(悬浮细胞用此法时经 1 000 r/min 离心后去除上清液),每孔加入 150 μL DMSO 使甲瓚溶解,手动摇匀;用酶标仪(iMark,伯乐生命医学产品有限公司)在 490 nm 波长处

检测每孔的光密度(OD)。实验结果采用 SPSS 软件(IBM,美国)分析死亡率,计算 IC_{50} 值。

1.4 形态学观察

处理 24 h 后,分别在倒置显微镜(广州市明美光电技术有限公司)下观察不同浓度处理后细胞的形态变化,拍照记录。

2 结果与讨论

2.1 绿僵菌素对 4 种细胞的毒性

MTT 实验结果表明,绿僵菌素处理 24 h 后,Bm12、Ofh、S2 和 Sf9 细胞的死亡率随剂量增大而升高(图 1)。Bm12、Ofh 和 Sf9 细胞较 S2 细胞对绿僵菌素较为敏感,当 DA 与 DB 以 6.25~25.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量处理时,前 3 种细胞的死亡率为 35%~48%,而 S2 细胞的死亡率在 20%左右(图 1)。4 种细胞对 DA 和 DB 的混合剂(DABM)反应也不相同,Ofh 细胞最为敏感,当 DABM 以 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量处理时,Ofh 细胞的死亡率大于 45%,Bm12、Sf9 和 S2 细胞的死亡率分别为 13%、35%和 15%。而以 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量处理时 Bm12、Sf9 和 S2 细胞的死亡率分别为 55%、46%和 56%。

从 IC_{50} 值来看,细胞种类不同, IC_{50} 值不同;绿僵菌素种类不同, IC_{50} 值也不同(表 1)。总体上,DA 和 DB 对 Bm12 和 Sf9 细胞的毒性相差

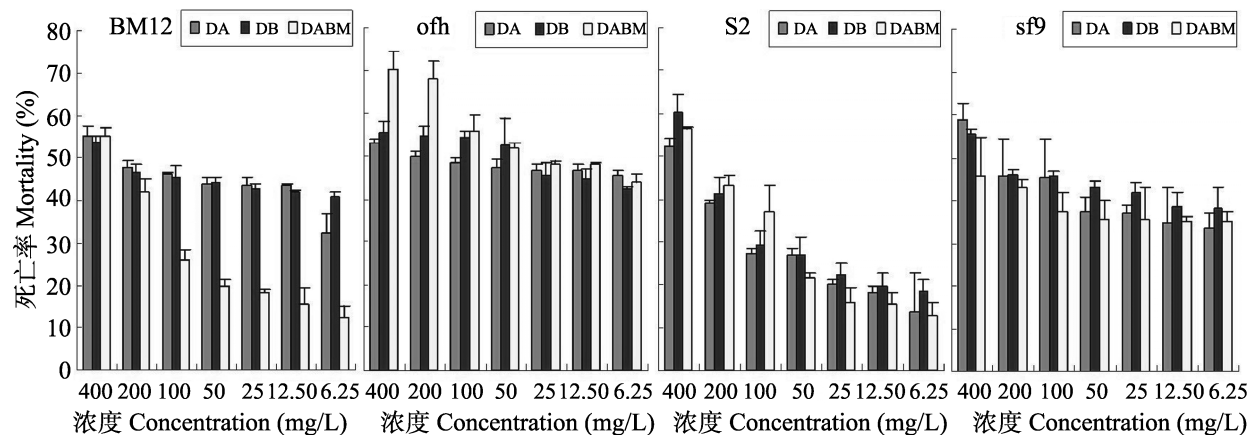


图 1 绿僵菌素处理 24 h 后 4 种昆虫细胞的死亡率

Fig. 1 Mortalities of four cell lines after 24 h treated with destruxins

DA: 绿僵菌素 A; DB: 绿僵菌素 B; DABM: 绿僵菌素 A 与 B 的 1/1 混合物。

DA: Destruxin A; DB: Destruxin B; DABM: The 1/1 mixture of destruxin A and destruxin B.

表 1 绿僵菌素对 4 种细胞的毒性回归方程和 IC₅₀ 值
Table 1 IC-p equations and IC₅₀ values of destruxins against four cell lines

细胞系 Cell line	处理 Treatment	毒性回归方程 IC-p equation	卡方测验 Chi-Square test (P)	IC ₅₀ 值及其 95%置信区间 (mg/L) IC ₅₀ (95% confident interval)		共毒素数 CTC
Bm12	DA	y=0.001-0.319x	0.656	260.09	(175.83-488.25)	-
	DB	y=0.001-0.209x	0.999	281.04	(150.70-3 202.64)	-
	DABM	y=0.003-1.002x	0.542	326.79	(277.92-399.84)	82.67
Ofh	DA	y=0.000-0.095x	0.999	219.19	-	-
	DB	y=0.001-0.083x	0.607	112.29	-	-
	DABM	y=0.002-0.061x	0.631	34.86	-	425.96
S2	DA	y=0.003-0.894x	0.526	350.58	(289.52-451.47)	-
	DB	y=0.003-0.833x	0.968	295.10	(247.42-367.36)	-
	DABM	y=0.003-0.946x	0.036	303.92	(223.65-488.65)	105.44
Sf9	DA	y=0.002-0.385x	0.951	250.46	(181.83-392.19)	-
	DB	y=0.001-0.263x	0.985	260.10	(161.70-634.18)	-
	DABM	y=0.001-0.390x	0.998	508.29	-	50.21

DA: 绿僵菌素 A ; DB: 绿僵菌素 B ; DABM: 绿僵菌素 A 与 B 的 1/1 混合物。
DA: Destruxin A; DB: Destruxin B; DABM: The 1/1 mixture of destruxin A and destruxin B.

不大 ,其 IC₅₀ 值相近 ;而对 Ofh 和 S2 细胞来说 ,DB 的毒性高于 DA 的毒性 ,IC₅₀ 值相差较大。4 种细胞中 ,Ofh 细胞对绿僵菌素最为敏感 ,DA、DB 和 DABM 对 Ofh 细胞的 IC₅₀ 值分别为 219.19 μg/mL 和 112.29 μg/mL ,明显低于其他 3 种细胞的 IC₅₀ 值 (均大于 250 μg/mL)(表 1)。DA 和 DB 混合 ,对 4 种细胞的作用也各不相同 ,DABM 对 Ofh 细胞的共毒系数 (CTC) 为 425.96 ,表明 DA 和 DB 有协同增效作用 ;对 S2 细胞的 CTC 值为 50.21 ,说明 DA 和 DB 之间有拮抗作用 ;而对其他两个细胞的 CTC 值为 80~120 ,表现出相加作用 (表 1)。

2.2 绿僵菌素对 4 种细胞形态的影响

绿僵菌素对 Bm12、Ofh、S2 和 Sf9 细胞的形态都有明显影响 ,然而不同细胞具有不同的变化。在浓度梯度 6.25~400 μg/mL 的 DA、DB 和 DABM 分别处理 Bm12 细胞 24 h 后 ,观察到明显的细胞破碎、细胞聚集和细胞数量减少 ,也有少量的细胞出现空泡、瘤状突起、细胞膨胀等现象 (图 2)。

DA、DB 和 DABM 处理后 ,Ofh 细胞从近

似圆形变长或变成不规则的形状 ,还原成浆血细胞 (Plastohemocytes) 和类绦色细胞 (Oenocytoide) 的原始形状。各处理浓度下 ,观察到非常明显的细胞聚集现象 ,也有少数细胞出现瘤状突起、空泡和细胞破碎 (图 3)。

S2 细胞在各种绿僵菌素各处理浓度下都有明显空泡现象 ,只有部分细胞发生破碎、膨胀和聚集 (图 4)。在不同的处理中 ,Sf9 细胞膜收缩、细胞空泡、破碎和膨胀现象比较明显 ,并且细胞数量呈现减少趋势 ,但是 ,没有发现细胞聚集和瘤状突起现象 (图 5)。

3 讨论

在 4 种细胞中 ,玉米螟血细胞 Ofh 对绿僵菌素的反应最为敏感 ,表现在两个方面 ,一是死亡率较高 ,IC₅₀ 值较低 ,DA 和 DB 对 Ofh 细胞的 IC₅₀ 值分别 219.19 和 112.29 μg/mL ,尤其是两者的混合剂 DABM ,其 IC₅₀ 值 34.86 μg/mL。二是细胞形态变化明显 ,即使在 6.25 μg/mL 这样很低剂量的绿僵菌素刺激下 ,其细胞也会发生变形、聚集死亡、瘤状突起与破碎等变化。玉米螟

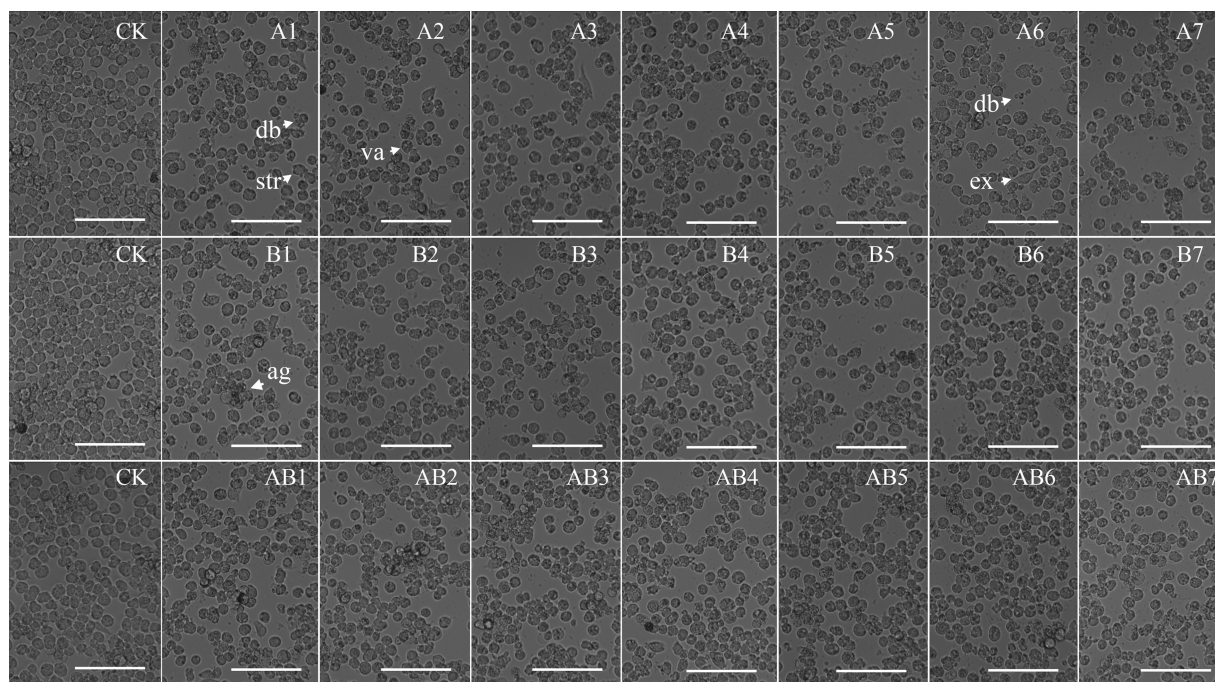


图 2 绿僵菌素处理 Bm12 细胞 24 h 后的显微图片

Fig. 2 Profiles of Bm12 cells after 24 h treated with destruxins

CK: 1% DMSO 对照; A/B/AB1~7. DA、DB 和 DABM 分别以 6.25、12.5、25、50、100、200 和 400 $\mu\text{g/mL}$ 处理细胞。
ag: 细胞聚集; db: 碎片; ex: 膨胀; str: 瘤状突起; va: 空泡。比例尺=100 μm 。下图同。

CK: 1% DMSO control; A/B/AB1~7: The treatments of DA, DB and DABM at the concentrations of 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/mL}$. ag: Aggregation; db: Debris; ex: Expand; str: Strumae; va: Vacuole. Scale bar =100 μm . The same below.

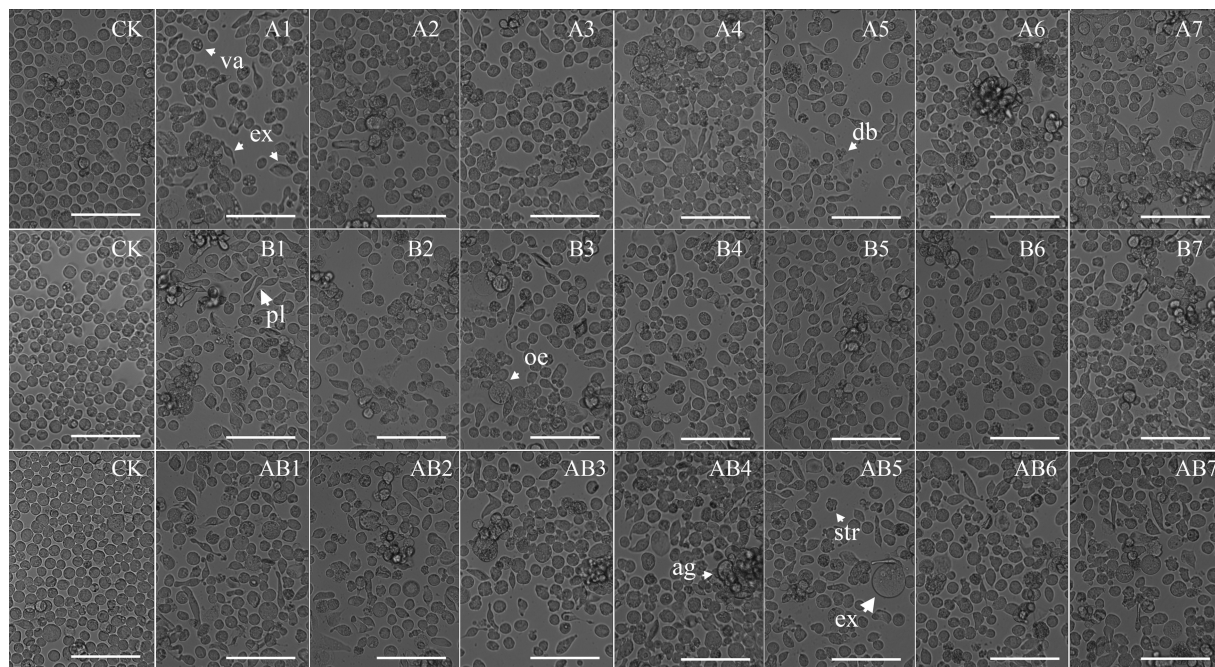


图 3 绿僵菌素处理 Ofh 细胞 24 h 后的显微图片

Fig. 3 Profiles of Ofh cells after 24 h treated with destruxins

pl: 浆血细胞; oe: 类绛色细胞。比例尺=100 μm 。
pl: Plastohemocytes; oe: Oenocytoid. Scale bar =100 μm .

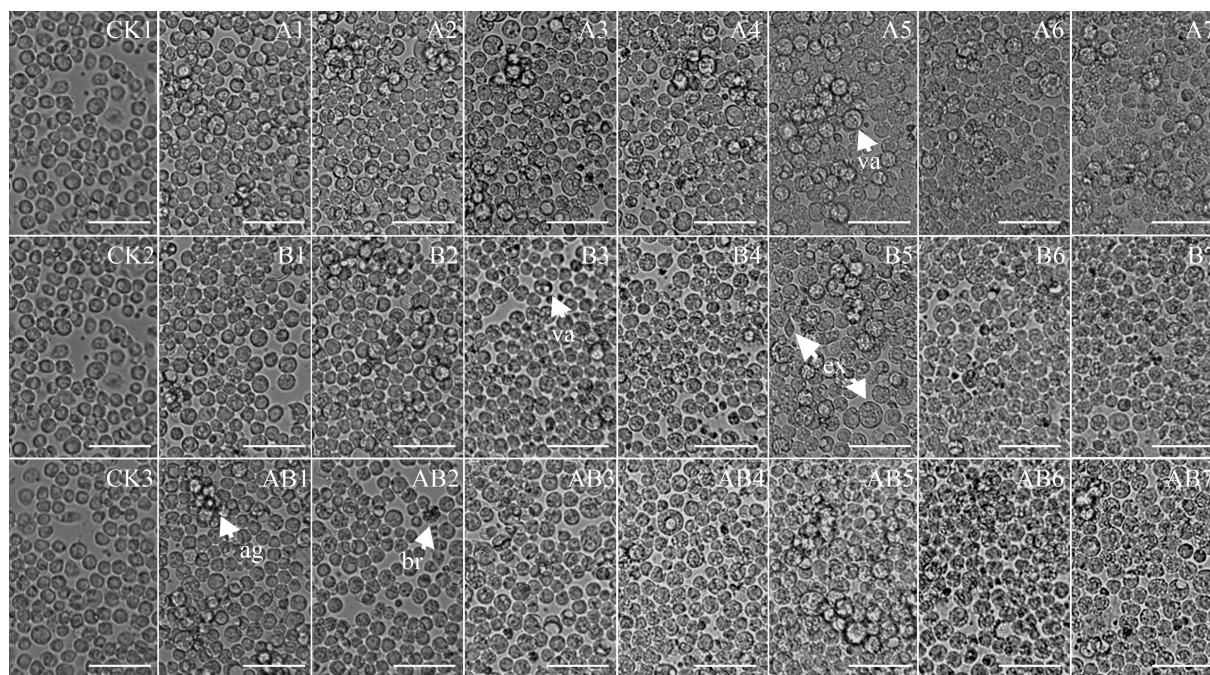


图 4 绿僵菌素处理 S2 细胞 24 h 后的显微图片

Fig. 4 Profiles of S2 cells after 24 h treated with destruxins

br: 细胞破碎。比例尺=50 μm。

br: Broken. Scale bar= 50 μm.

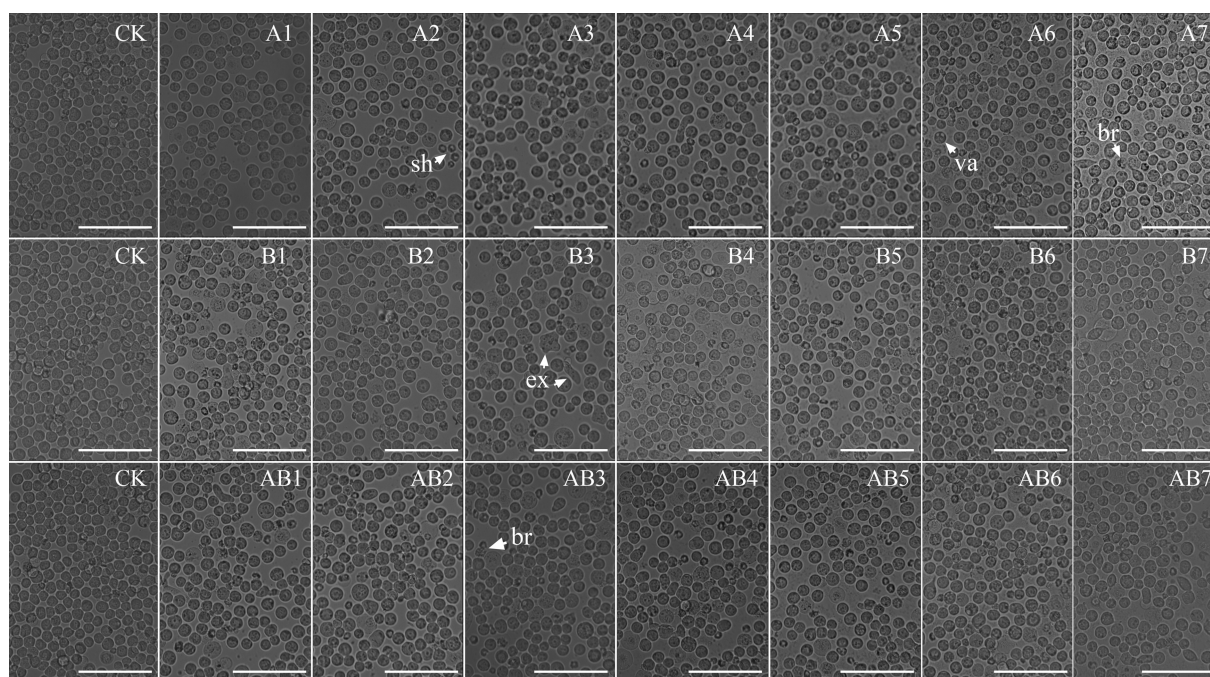


图 5 绿僵菌素处理 Sf9 细胞 24 h 后的显微图片

Fig. 5 Profiles of Sf9 cells after 24 h treated with destruxins

sh: 细胞收缩。比例尺=100 μm。

sh: Shrinkage. Scale bar =100 μm.

血细胞之所以较为敏感,可能与虫生真菌与寄主昆虫的协同进化有关,因为真菌从昆虫体壁侵入,进入血腔后会遇到昆虫血细胞的免疫作用,绿僵菌素是真菌在进化过程中获得的一种抗免疫武器,当然主要是针对血细胞的,目的在于破坏其免疫功能,以保护自身细胞在寄主昆虫体内定殖下来。相反,S2 细胞似乎对绿僵菌素最不敏感,其 IC_{50} 值达到 $300\text{ }\mu\text{g/mL}$ 左右,果蝇、有很强的免疫能力,几乎不会感染虫生真菌,绿僵菌不是果蝇的病原菌,因此,果蝇与绿僵菌之间缺乏协同进化关系,果蝇的 S2 细胞对绿僵菌素比较不敏感也就可以理解了。Bm12 和 Sf9 细胞分别来自家蚕和草地贪夜蛾,虽然这两种昆虫都可被绿僵菌素侵染,但是 Bm12 和 Sf9 细胞都不是血细胞,所以不如玉米螟血细胞那么敏感,但是,受绿僵菌素刺激后,该两类细胞均会产生少数类似浆血细胞的梭形细胞,这种变化是否与绿僵菌素与昆虫免疫系统的互作有内在联系,还需要进一步研究。

绿僵菌素不同同系物之间的联合毒性以往研究很少,本研究发现,不同细胞对绿僵菌素 A、B 混合物的敏感性差异很大,玉米螟血细胞最为敏感,而果蝇 S2 细胞最不敏感,这可能也与上述真菌与寄主昆虫免疫系统的协同进化有关,既然血细胞是绿僵菌素的作用靶标,真菌的进化方向应该一方面尽可能有效利用资源,另一方面又不断强化绿僵菌素对血细胞的作用,因此通过合同一系列的相互之间协同增效的绿僵菌素,是一个最佳选择。那么,对于其他非血细胞,因为不是绿僵菌素的靶细胞,绿僵菌素不同同系物之间的相互作用结果也就可想而知了。

本研究还发现,绿僵菌素对 4 种昆虫细胞的致死剂量都比较高,而在低剂量(比如 $6.25\text{ }\mu\text{g/mL}$)处理时,细胞的形态即已发生改变,也就是说形态发生了变化的细胞并未出现死亡现象。结合到以前的报导,绿僵菌素在极低剂量下即可引起昆虫细胞的形态改变(Vey *et al.*, 2002; Fan *et al.*, 2013),我们认为,绿僵菌素的作用不是在于杀死细胞,而是在于改变细胞的功能。

试想,绿僵菌细胞进入寄主昆虫血腔以后,初期,其数量可能非常少,相对于昆虫血细胞来说可能处于弱势地位,要产生大量的绿僵菌素来杀死血细胞将是力不从心的,并且,即使产生较多的绿僵菌素,也会因为分泌到血腔中而被血淋巴稀释,不可能达到较高的浓度,当然,在真菌细胞表面可能会汇集较高的绿僵菌素剂量。那么在低剂量下,不求杀死血细胞,只求抑制其某些功能,以达到保护自身的目的,这将是绿僵菌进化的最佳选择。

综上所述,绿僵菌素对不同的昆虫细胞,其作用效果也不相同,玉米螟的血细胞对绿僵菌素最为敏感,而来自非寄主昆虫果蝇的 S2 细胞最不敏感。对绿僵菌素 A 和 B 的联合作用,也是玉米螟血细胞最为敏感,而 S2 细胞最不敏感。绿僵菌素对上述 4 种细胞的致死剂量较高,但引起细胞形态改变的剂量却非常低,绿僵菌素对细胞的作用不在于将其杀死,只求抑制其某些功能。

参考文献 (References)

- Chen XR, Hu QB, Yu XQ, Ren SX, 2014. Effects of destruxins on free calcium and hydrogen ions in insect hemocytes. *Insect Science*, Doi 10.1111/1744-7917.12028.
- Fan JQ, Chen XR, Hu QB, 2013. Effect of destruxins A on hemocytes morphology of *Bombyx mori*. *Journal of Integrative Agriculture*, 12(6): 1042–1048.
- 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 DP, 2006. Investigation of destruxin A and B from 80 *Metarhizium starins* in China, and the optimization of cultural conditions for the strain MaQ10. *Toxicon*, 48(5): 491–498.
- Liu BL, Tzeng YM, 2012. Development and applications of destruxins: a review. *Biotechnology Advances*, 30: 1242–1254.
- Pal S, St Leger RJ, Wu LP, 2007. Fungal peptide destruxin a plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Chemistry*, 282: 8969–8977.
- Pedras MSC, Zaharia LI, Ward DE, 2002. The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity.

- Phytochemistry*, 59(6): 579–596.
- 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. *Journal of Invertebrate Pathology*, 80(3): 177–187.
- Vilcinskis 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): 1149–1159.
- Vilcinskis A, Matha V, Gotz P, 1997b. Inhibition of phagocytic activity of plasmatocytes isolated from *Galleria mellonella* by entomogenous fungi and their secondary metabolites. *J. Insect Physiol.*, 43(5): 475–483.