



Doctoral Thesis

On the specificity of delta-endotoxins of *Bacillus thuringiensis*

Author(s):

Jaquet-Müller, Françoise

Publication Date:

1987

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000471044> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 8474

ON THE SPECIFICITY OF DELTA-ENDOTOXINS OF
BACILLUS THURINGIENSIS

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
FRANÇOISE JAQUET-MÜLLER
diplômée en biologie
born 15th March, 1957
citizen of Fribourg

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. R. Hütter, examiner
Prof. Dr. P. Lüthy, co-examiner

ADAG Administration & Druck AG

Zürich 1987

23.2.88



8. SUMMARY

In a first series of experiments, the insecticidal activity of the delta-endotoxins of 14 *Bacillus thuringiensis* strains belonging to 12 subspecies was determined quantitatively against larvae of *Pieris brassicae*, *Heliothis virescens*, and *Spodoptera littoralis*. The three insect species greatly differed in their susceptibilities to the delta-endotoxins from the various strains. It was shown that the solubilization of the crystals within the gut of the three insect species is a first important step in the generation of active fragments. Dissolution of the crystals *in vitro* especially enhanced the insecticidal activity against *H. virescens*. When toxins were applied, the relative potency range varied greatly from one insect species to another. It can be concluded that at least three factors influence the potency of *B. thuringiensis* delta-endotoxins: the bacterial strain-related origin of the toxin, the degree of solubilization of the crystals and activation of the delta-endotoxin in the gut juice, and the intrinsic susceptibility of the insect to the toxin. The activities of delta-endotoxins from *kurstaki* strains containing one, two, or three genes of the 4.5-, 5.3-, and 6.6-kb-classes were compared. In spite of structural differences disclosed by SDS-PAGE, no significant differences were found in their activity toward *P. brassicae* larvae.

Ten monoclonal antibodies produced by Huber-Lukač et al. (1986) against protoxin of strain 4432 of subspecies *kurstaki* were further characterized. One antibody completely inhibited the biological activity of the protoxin from *kurstaki* 4432, five antibodies reduced it by 15 to 82 %, and four antibodies did not affect it at all. These antibodies were used to study the relationship among the protoxins of the different *B. thuringiensis* strains. Based on cross-reaction studies, homologies and differences in the crystal protein structures of these various *B. thuringiensis* strains were revealed.

In an attempt to find the smallest active fragment, controlled digestion of the delta-endotoxin of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* 4432 with different enzymes was performed. Endoproteinase Glu-C from *Staphylococcus aureus* V8 (EV8) generated fragments of various molecular weights without loss of insecticidal activity. All of the fragments detected after degradation with EV8 originated from the N-terminal part of the protoxin molecule. No toxicity was found for fragments of MW lower than 60,000.

The final discussion presents a model explaining the fate of the crystals gaining access to the insect gut.

9. RÉSUMÉ

Dans la première partie des expériences, l'activité insecticide des delta-endotoxines de 14 souches de *Bacillus thuringiensis* appartenant à 12 sous-espèces a été déterminée quantitativement sur des larves de *Pieris brassicae*, *Heliothis virescens*, et *Spodoptera littoralis*. Les trois insectes réagirent de façons très différentes aux delta-endotoxines des différentes souches. Il a été démontré que la solubilisation des cristaux à l'intérieur de l'intestin des trois espèces d'insectes est la première étape importante dans la production de fragments toxiques. La dissolution des cristaux *in vitro* augmenta en particulier l'activité insecticide contre *H. virescens*. Lorsque des toxines furent administrées, on constata de grandes variations d'un insecte à l'autre au niveau du degré de puissance relative. En conclusion, au moins trois facteurs influencent la puissance des delta-endotoxines de *B. thuringiensis* : l'origine de la toxine (souche bactérienne), le degré de solubilisation des cristaux et d'activation des delta-endotoxines dans le chyle, et la sensibilité intrinsèque de l'insecte à la toxine. On compara les activités de delta-endotoxines provenant de souches *kurstaki* possédant un, deux, ou trois gènes des classes 4.5-kb, 5.3-kb, et 6.6-kb. Malgré les dissimilarités structurelles observées par SDS-PAGE, peu de différences furent constatées au niveau de leur activité contre les larves de *P. brassicae*.

Dix anticorps monoclonaux produits contre la protoxine de *B. thuringiensis* sous-esp. *kurstaki* 4432 par Huber-Lukač et al. (1986) furent caractérisés. Un anticorps bloqua complètement l'activité de la protoxine de *kurstaki* 4432, cinq la réduisirent de 15 à 82 %, et quatre ne l'affectèrent pas. Ces anticorps furent utilisés pour étudier la relation existant entre les protoxines des différentes souches de *B. thuringiensis*. Des homologues et des différences dans la structure des protéines cristallines de ces différentes souches de *B. thuringiensis* furent mises en évidence à l'aide de tests de réaction croisée.

Dans le but de trouver le plus petit fragment actif, on procéda à une digestion contrôlée de la delta-endotoxine de *B. thuringiensis* sous-esp. *kurstaki* 4432 par différents enzymes. L'endoprotéinase Glu-C de *Staphylococcus aureus* V8 (EV8) produisit des fragments de poids moléculaires variés sans causer de diminution de l'activité insecticide. Tous les fragments obtenus après dégradation à l'aide de EV8 provenaient de la partie N-terminale de la molécule de protoxine. Aucun fragment de poids moléculaire plus petit que 60.000 n'était porteur de toxicité.

La discussion finale propose un modèle représentant le sort des cristaux accédant à l'intestin de l'insecte.