



Artículo original / Original article

Control biológico natural de larvas de *Pseudosphinx tetrio* con *Bacillus thuringiensis* en plantas de *Himatanthus sucuuba* en Satipo

Natural biological control of *Pseudosphinx tetrio* larvae with *Bacillus thuringiensis* on *Himatanthus sucuuba* plants in Satipo

José Manuel Alomía-Lucero ^{1*}; Milcíades Aníbal Baltazar-Ruiz ¹; Miriam Dacia Cañari-Contreras ¹; Hebert Nino Estrada-Carhuallanqui ¹; Angélica Castro-Garay ¹

¹Universidad Nacional del Centro del Perú,
Huancayo, Perú

Recibido: 18/08/2023

Aceptado: 22/10/2023

Publicado: 30/01/2024

*Autor de correspondencia: jalomia@uncp.edu.pe

Resumen: El objetivo del estudio fue evaluar el control biológico natural de orugas *Pseudosphinx tetrio* en condiciones de campo. La investigación se realizó entre febrero y marzo a una altitud de 670 msnm. Se observaron larvas en seis árboles en rebrote con 6 a 10 ejes de 2 a 3 m de altura y abundancia de hoja; se evaluó in situ el número de larvas muertas por la bacteria. Los resultados mostraron un promedio de $15,83 \pm 5,27$ larvas del último estadio por planta; $13,67 \pm 4,89$ larvas muertas y $85,9 \pm 4,67\%$ de control biológico natural de *B. thuringiensis* sobre larvas de *P. tetrio*. El control biológico de la larva se produce en el último estadio, momento en que la bacteria hace efecto causando una alta mortalidad, donde la larva enferma se cuelga de una hoja de la misma planta, luego se adelgaza, se oscurece y muere cayendo.

Palabras clave: bacteria; control; larva; mortalidad; rebrote

Abstract: The objective of the study was to evaluate the natural biological control of *Pseudosphinx tetrio* caterpillars under field conditions. The research was conducted between February and March at an altitude of 670 meters above sea level. Larvae were observed in six trees in regrowth with 6 to 10 axes of 2 to 3 m height and leaf abundance; the number of larvae killed by the bacterium was evaluated in situ. The results showed an average of $15.83 + 5.27$ last instar larvae per plant; $13.67 + 4.89$ dead larvae and $85.9 + 4.67\%$ natural biological control of *B. thuringiensis* on *P. tetrio* larvae. The biological control of the larva occurs in the last stage, at which time the bacteria takes effect, causing high mortality, where the diseased larva hangs on a leaf of the same plant, then becomes thin, darkened and falls to death.

Keywords: bacteria; control; larvae; mortality; regrowth; control; larvae; regrowth

1. Introducción

No hay estudios sobre control biológico natural que ocurre en las larvas gigantes de *Pseudosphinx tetrio*, un Sphingido en las selvas tropicales; por ello se ha propuesto evaluar mediante la observación directa la morbilidad que causa esta bacteria en su estado natural y que podría ser una buena propuesta ante el uso indiscriminado de insecticidas sintéticos tóxicos.

Belousova et al. (2021), indica que *Bacillus thuringiensis* (Bt), un patógeno natural de diferentes invertebrados, principalmente insectos, se utiliza ampliamente como agente de control biológico.

Las larvas del esfíngido se alimentan de hojas de una planta tropical, al respecto Calero-Armijos et al. (2020), mencionan que *Himatanthus sucuuba* (Spruce) Woodson (Apocynaceae) es una planta medicinal conocida como "Bellaco-Caspi" ampliamente distribuida en Loreto, Perú.

La bacteria entomopatógena ha sido investigada ya de mucho tiempo en una diversidad de larvas de lepidópteros, ha sido encontrado en una diversidad de plagas agrícolas así, Nutaratat et al. (2023) comprobaron la efectividad en *Spodoptera exigua* con *Bacillus thuringiensis* Bt294. Asimismo, Arsov et al. (2023), indican el control en Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, y Hemiptera. También Baranek et al. (2023), indica efectos de control en *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) y *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae).

También hay estudios sobre gusanos de la palmera, así, Elsharkawy et al. (2022), indica que *Rynchophorus ferrugineus* Olivier, el picudo rojo de las palmeras (RPW), es un insecto dañino que a menudo infesta gravemente las palmeras y es controlado por *B. thuringiensis*.

Investigaciones recientes muestran proteínas tóxicas que producen las bacterias entomopatógenas, así, Wei et al. (2023) señala que la expresión de transgenes que codifican proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) es una tecnología bien establecida que mejora la protección contra las larvas de lepidópteros, que afectan la producción de cultivos en todo el mundo. Asimismo, Nutaratat et al. (2023) menciona que se trata de una proteína insecticida vegetativa, Vip3A, que es muy activa contra las plagas de lepidópteros, las plagas más importantes en la mayoría de los países tropicales. Por su parte Yamamoto (2022), menciona que la industria de las semillas ha estado optimizando las proteínas insecticidas Bt para mejorar su actividad insecticida.

Los estudios sobre este bioinsecticida van avanzando, a pesar de que hay investigaciones desde el siglo pasado, dado la efectividad de esta bacteria en las orugas plagas. Duarte Neto et al. (2020), menciona que, entre los factores limitantes del uso de Bt como bioinsecticida se encuentran los costos y el aseguramiento de su actividad biológica, que pueden variar según la cepa y las condiciones de cultivo.

Existen dos variedades de *B. thuringiensis*, la kurstaki que controla larvas de lepidópteros y la israelensis que controla larvas de zancudos. Park et al. (2022) indica en su estudio que se aisló una nueva cepa IMBL-B9 de Bt kurstaki que podría ser útil para el desarrollo de nuevos bioinsecticidas o productos recombinantes basados en el gen cry como una solución alternativa contra los lepidópteros, incluidos Noctuidae y Plutellidae.

Sobre la eficiencia de la bacteria Chandrakasan et al. (2022), indican que la eficacia de los biopesticidas a una dosis de 4 g/L de agua es la más eficaz y produjo la máxima mortalidad; al eliminar una media del 64,88 % de las larvas del barrenador del fruto del tomate.

El futuro de la bacteria entomopatógena según puede que no sea prometedor, así, Pinos et al. (2021), indica que el uso extensivo de insecticidas químicos afecta negativamente tanto al medio ambiente como a la salud humana, ya que la bacteria no es específica, sino que puede afectar a otros organismos del ecosistema y puede ocasionar desequilibrios. Asimismo, indican los mismos autores que los beneficios de los productos a base de *B. thuringiensis* se ven amenazados por la evolución de la resistencia de los insectos.

Respecto a las cepas bacterianas Belousova et al. (2021), indica que la inmensa plasticidad fenotípica de las cepas Bt, junto con la complejidad de las relaciones ecológicas que pueden

establecer, indica que una evaluación adicional de la seguridad de los futuros pesticidas basados en Bt debería considerar múltiples niveles de organización del ecosistema y extenderse a una amplia variedad de sus habitantes.

Domínguez-Arrizabalaga et al. (2020), reconoce a *Bacillus thuringiensis* es el agente insecticida microbiano de mayor éxito y sus proteínas han sido estudiadas durante muchos años debido a su toxicidad contra insectos pertenecientes principalmente a los órdenes Lepidoptera, Diptera y Coleoptera, que son plagas de interés agroforestal y médico-veterinario.

En cuanto a la distribución del insecto Ríos & Drechsel (2018), mencionan a uno de los esfíngidos (Insecta, Lepidoptera, Sphingidae) citados para el Paraguay como *Pseudosphinx tetrio* (Linnaeus, 1771), especie con una distribución amplia en el continente americano; donde menciona como primeros registros de la especie en Paraguay desde la primera mitad del siglo XX. Por su parte, Cock (2008), hizo observaciones sobre la polilla de halcón *Pseudosphinx tetrio* (L.) en Trinidad y Tobago con notas sobre plantas alimenticias de tres familias que generalmente producen una savia lactífera.

Las plantas hospedantes de la polilla esfíngida según Minno & Darrow (1995), indican que *Pseudosphinx tetrio* se encuentran en los Cayos de Florida, donde su planta alimenticia es *Plumeria rubra*, un árbol neotropical exótico plantado en áreas urbanas por sus flores rosadas o rojas muy hermosas. Matignon et al. (2021), mencionan *Allamanda cathartica* L. es hospedante tóxico de *P. tetrio* y sirve de alimento a esta especie tóxica de Apocynaceae.

En cuanto a la biología del insecto Santiago (1987), indica que estudió en el laboratorio la biología de *Pseudosphinx tetrio*, un defoliador de *Plumeria rubra* en Puerto Rico, donde indica que el huevo dura 3 o más días, el período larvario 24 días con 5 estadios y 29 a 30 días cuando eran de 6 estadios; la prepupa dura 3,8 días y la pupa 22,2 días. Las larvas se alimentan de hojas de hospedantes de la familia Apocynaceae, incluidas especies de *Plumeria* y *Allamanda*.

Squyres (2014), indica que la oruga frangipani tropical, *Pseudosphinx tetrio*, puede crecer hasta 6 pulgadas de largo. Esta especie se alimenta de la savia tóxica del árbol frangipani, lo que hace que la oruga sea tóxica y de mal sabor para sus depredadores. Empupa en el suelo y se convierte en una gran polilla halcón.

En otras especies de orugas Vázquez Ramírez et al. (2015), menciona que se evaluaron y caracterizaron cinco cepas mexicanas de *Bacillus thuringiensis* con actividad hacia el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* mediante bioensayos, perfiles proteicos, patrones de DNA plasmídico, y PCR. Los bioensayos mostraron que dos de las cinco cepas estudiadas, LBIT13 y LBIT-418, mostraron alta toxicidad hacia la oruga. Estudios de laboratorio realizados por Menon & De Mestral (1985), mencionan que *B.t. var. kurstaki* puede sobrevivir durante períodos de tiempo relativamente largos en agua dulce y en el ambiente marino a 20 °C.

2. Materiales y métodos

La investigación se desarrolló en el Jardín Botánico de Plantas Medicinales, ubicado en el Anexo Timarini Bajo, Km 2, que se encuentra a 5 minutos de la capital del distrito y provincia de Satipo, Región de Junín. El lugar se ubicó en la margen izquierda del río Satipo, a una latitud Sur de 11° 02' 03", a una longitud Oeste de 74° 37' 37" y una altitud de 670 m snm, con un clima de temperatura promedio de 25 °C, precipitación anual de 2 022 mm y humedad relativa promedio del 81 %.

La investigación fue de tipo básico y niveles exploratorio y descriptivo, ya que son los primeros estudios respecto a control biológico de este insecto. Se usó el método de observación insitu de larvas del insecto *Pseudosphinx tetrio* en un total de seis plantas de *Himatanthus sucuuba* conocida como bellaco caspi; las cuales habían estado en rebrote dado que la tala de árboles generó brotes de 2 a 3 metros de altura, lo que permitió observar las larvas del gusano esfíngido en la temporada.

La observación diaria se hizo desde estadios intermedios y esperando en los últimos estadios larvales, donde alcanzan su máximo tamaño en unos 20 días de alimentación de hojas de la planta hospedante. En ese estadio es cuando se enferman las larvas del esfíngido. La fecha de ejecución del trabajo de investigación fue entre los meses de febrero y marzo, época lluviosa en la zona.

Se utilizó una cámara celular para registrar fotografías de las larvas en pleno desarrollo y un cuaderno de apuntes para el registro de las observaciones por fechas. Al empezar a enfermarse las larvas gigantes se esperó unos días para su muerte y conteo respectivo.

Se hizo el conteo de número de larvas del último estadio por planta y número de larvas del último estadio muertas por planta. Los datos fueron procesados en Excel para hacer la tabla de porcentajes y cálculos de promedio y desviación estándar.

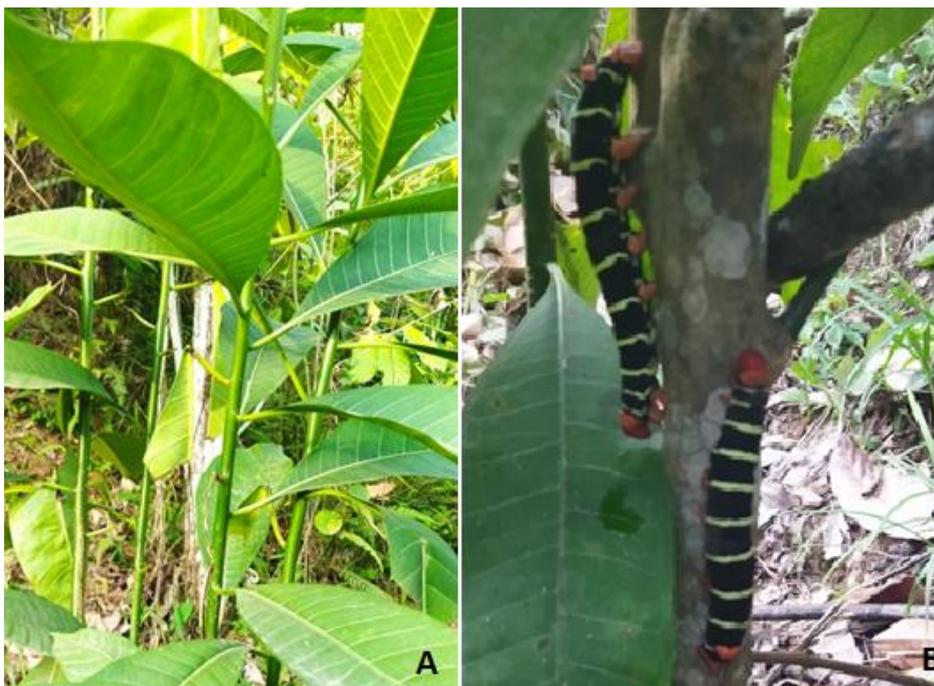


Figura 1. A. Planta de *Himatanthus sucuuba* (Fam. *Apocynaceae*) mostrando brotes y hojas abundantes. B. Larvas del último estadio infectadas por la bacteria

La Figura 1 A, muestra la vigorosidad de la planta de tallos rectos verticales que se levantan del tronco principal con hojas grandes y latex característico, de cuyo limbo se alimenta las larvas de *Pseudosphinx tetrio* hasta completar su ciclo biológico. La larva en el día sube a comer las hojas al atardecer baja a la base del tallo a dormir. La Figura 1 B muestra Las larvas sanas muestran vigorosas grandes y fuertes. Se alimentan durante el día en las hojas de la planta y bajan a dormir a la base del tallo al caer la tarde. La morfología de la larva coincide con lo manifestado por Santiago-Blay (1985) y Squyres (2014).

3. Resultados y Discusiones

Tabla 1. Número de larvas por planta y porcentaje de control biológico natural

Plantas	Número de larvas al último estadio	Número de larvas afectadas	% de control
1	22	19	86.4
2	20	18	90.0
3	11	9	81.8
4	19	17	89.5
5	14	11	78.6
6	9	8	88.9

Promedio	15.83	13.67	85.9
Desvest	5.27	4.89	4.67

La Tabla 1, muestra 15,83 + 5,27 larvas del último estadio por planta; 13,67 + 4,89 larvas muertas del último estadio por planta; un 85,9 + 4,67% de control biológico natural de *Bacillus thuringiensis* sobre larvas del último estadio de *Pseudosphinx tetrio* en plantas de *Ficus insípida*. Estos resultados confirman la eficacia de la bacteria controladora mencionada por Vázquez Ramírez et al. (2015). Los resultados de control son más altos que los obtenidos por Conde Miranda (2011) en otras especies es a la inversa respecto a los estadios; ya que en el estudio se encontró ataque en los últimos estadios.



Figura 2. A. Larva del último estadio afectado por *B. thuringiensis*. B. Larva del último estadio muerta por *B. thuringiensis*

La Figura 2 A, muestra el primer síntoma de la larva enferma infectada por *B. thuringiensis* se cuelga de la nervadura en el envés de la hoja de la planta de bellaco caspi. Utiliza los dos últimos pares de propatas y se cuelga y comienza a adelgazar. La Figura 2 B, muestra la larva muerta pendiente de la hoja, muestra un color oscuro del cuerpo por efecto de la necrosis de tejidos causados por la bacteria. Estos resultados confirman los manifestado por Belousova et al. (2021), en cuanto al control biológico de plagas forestales.



Figura 3. A. Larva seca en el suelo por *B. thuringiensis*. B. Larva descompuesta en el suelo por *B. thuringiensis*

La Figura A muestra la larva muerta y blanda que cae al suelo, muestra un color negro del cuerpo. Esto confirma la mortalidad que causa la bacteria como lo señala Nutaratat et al. (2023). En este estado algo gelatinoso donde se nota la presencia de bacterias, las moscas dispersan y llevan el

microbio a las hojas donde nuevamente otras larvas se infectan al comer hojas contaminadas completando así el ciclo de la bacteria en el bosque amazónico.

La Figura 3 B, muestra la descomposición natural por otros microorganismos del suelo, muestra la desintegración de la larva. Los hallazgos confirman lo mencionado por Park et al. (2022) como el insecticida biológico muy importante. Esto demuestra la efectividad de la bacteria al estado natural y si se aplicara sobre larvas de lepidópteros es muy seguro que el porcentaje de control sería muy efectivo. De allí que la propagación de esta cepa del gusano del Sphingido puede ser una buena alternativa para usar industrialmente, ya que no se tiene estudios al respecto. La amazonia cuenta con grandes recursos biológicos por estudiar, investigar y proponer al mundo alternativas biológicas al control de plagas.

4. Conclusiones

Los resultados obtenidos muestran que se encontró 15,83 + 5,27 larvas del último estadio por planta; 13,67 + 4,89 larvas muertas del último estadio por planta; un 85,9 + 4,67% de control biológico natural de *Bacillus thuringiensis* sobre larvas del último estadio de *Pseudosphinx tetrio* en plantas en rebrote de *Himatanthus sucuuba*. El control biológico de la larva se produce en el último estadio, momento en que la bacteria hace efecto causando una alta mortalidad, donde la larva enferma se cuelga de una hoja de la misma planta, luego se adelgaza y muere cayendo al suelo donde ocurre su descomposición entre la hojarasca.

Financiamiento

No financiado.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Contribución de autoría

A-L, J. M., B-R, M. A., C-C, M. D., E-C, H. N. y C-G, A.: Conceptualización, análisis formal, investigación, escritura (preparación del borrador final) y supervisión.

A-L, J. M., B-R, M. A.: Investigación, metodología y curación de datos.

A-L, J., E-C, H. N., C-C, M. D.: Tratamiento de datos.

C-C, M. D., E-C, H. N. y C-G, A.: Investigación, recopilación de datos.

Referencias bibliográficas

- Arsov, A., Gerginova, M., Paunova-Krasteva, T., Petrov, K., & Petrova, P. (2023). Multiple cry Genes in *Bacillus thuringiensis* Strain BTG Suggest a Broad-Spectrum Insecticidal Activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13), 11137. <https://doi.org/10.3390/ijms241311137>
- Baranek, J., Pluskota, M., Rusin, M., Konecka, E., Kaznowski, A., & Wiland-Szymańska, J. (2023). Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from tropical greenhouses towards *Cydia pomonella* and *Spodoptera exigua* larvae. *BioControl*, 68(1), 39–48. <https://doi.org/10.1007/s10526-022-10173-3>
- Belousova, M. E., Malovichko, Y. V., Shikov, A. E., Nizhnikov, A. A., & Antonets, K. S. (2021). Dissecting the Environmental Consequences of *Bacillus thuringiensis* Application for Natural Ecosystems. *Toxins*, 13(5), 355. <https://doi.org/10.3390/toxins13050355>
- Calero-Armijos, L. L., Herrera-Calderon, O., Arroyo-Acevedo, J. L., Rojas-Armas, J. P., Hañari-

- Quispe, R. D., & Figueroa-Salvador, L. (2020). Histopathological evaluation of latex of *Bellaco-Caspi*, *Himatanthus sucuuba* (Spruce) Woodson on wound healing effect in BALB/C mice. *Veterinary World*, 13(6), 1045–1049. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.1045-1049>
- Chandrakasan, G., Ayala, M. T., García Trejo, J. F., Marcus, G., Maruthupandy, M., Kanisha, C. C., Murugan, M., AL-mekhlafi, F. A., & Wadaan, M. A. (2022). Bio controlled efficacy of *Bacillus thuringiensis* cry protein protection against tomato fruit borer *Helicoverpa armigera* in a laboratory environment. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 119, 101827. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2022.101827>
- Cock, M. J. W. (2008). *Pseudosphinx tetrio* (L .) (Lepidoptera : Sphingidae) in Trinidad and Tobago. *Journal of The Trinidad and Tobago Field Naturalists' Club*, 49–52. <https://www.livingworld.tffc.org/index.php/lwj/article/view/cock2008c/339>
- Conde Miranda, J. R. (2011). *Journal of The Trinidad and Tobago Field Naturalists' Club* [Universidad Mayor de San Andrés]. <http://repositorio.umsa.bo/xmlui/handle/123456789/7234>
- Domínguez-Arrizabalaga, M., Villanueva, M., Escriche, B., Ancín-Azpilicueta, C., & Caballero, P. (2020). Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Proteins against Coleopteran Pests. *Toxins*, 12(7), 430. <https://doi.org/10.3390/toxins12070430>
- Duarte Neto, J. M. W., Wanderley, M. C. de A., da Silva, T. A. F., Marques, D. A. V., da Silva, G. R., Gurgel, J. F., Oliveira, J. de P., & Porto, A. L. F. (2020). *Bacillus thuringiensis* endotoxin production: a systematic review of the past 10 years. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(9), 128. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02904-4>
- Elsharkawy, M. M., Almasoud, M., Alsulaiman, Y. M., Baeshen, R. S., Elshazly, H., Kadi, R. H., Hassan, M. M., & Shower, R. (2022). Efficiency of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* against *Rhynchophorus ferrugineus*. *Insects*, 13(10), 905. <https://doi.org/10.3390/insects13100905>
- Matignon, L., Lo, M. E. M., Vicentini, M., Valencia, D. P., Palmeira-Mello, M. V., Sylvestre, M., & Cebrián-Torrejón, G. (2021). *Chemoecological Study of Trophic Interaction Between Pseudosphinx Tetrio L. Larvae and Allamanda Cathartica L.* <https://www.researchsquare.com/article/rs-776886/v1>
- Menon, A. S., & De Mestral, J. (1985). Survival of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* in waters. *Water, Air, and Soil Pollution*, 25(3), 265–274. <https://doi.org/10.1007/BF00208453>
- Minno, M. C., & Darrow, H. N. (1995). *Pseudosphinx tetrio* (Lepidoptera, Sphingidae) in the Florida Keys. *Journal Article: News of the Lepidopterists' Society*, 1(6). <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19951107083>
- Nutaratat, P., Werapan, B., Phosrithong, N., Trakulnaleamsai, C., Rungrod, A., Utamatho, M., Soonsanga, S., Promdonkoy, B., Malairuang, K., & Prathumpai, W. (2023). Vegetative insecticidal protein (Vip3A) production by *Bacillus thuringiensis* Bt294 and its efficacy against Lepidopteran pests (*Spodoptera exigua*). *Biotechnology Reports*, 40, e00812. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2023.e00812>
- Park, M. G., Choi, J. Y., Kim, J. H., Park, D. H., Wang, M., Kim, H. J., Kim, S. H., Lee, H. Y., & Je, Y. H. (2022). Isolation and molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* toxic to lepidopteran pests *Spodoptera* spp. and *Plutella xylostella*. *Pest Management Science*, 78(7), 2976–2984. <https://doi.org/10.1002/ps.6922>
- Pinos, D., Andrés-Garrido, A., Ferré, J., & Hernández-Martínez, P. (2021). Response Mechanisms of Invertebrates to *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 85(1). <https://doi.org/10.1128/MMBR.00007-20>
- Ríos, S., & Drechsel, U. (2018). Nuevos registros de *Pseudosphinx tetrio* (Linnaeus 1771) en el Paraguay (Lepidoptera: Sphingidae). *Paraguay Biodiversiad*, 4(4), 60–65.

- https://www.researchgate.net/publication/322518729_Nuevos_registros_de_Pseudosphinx_tetrio_Linnaeus_1771_en_el_Paraguay_Lepidoptera_Sphingidae
- Santiago-Blay, J. A. (1985). Notes on *Pseudosphinx tetrio* (L.) (Sphingidae) in Puerto Rico. *Journal of the Lepidopterists' Society*, 39(3), 208–214. <http://archive.org/details/journaloflepid383919lep>
- Squyres, S. (2014). The tropical frangipani caterpillar, *Pseudosphinx tetrio*, can grow up to 6 inches in length. *Wilderness & Environmental Medicine*, 25(1), 127–128. <https://doi.org/10.1016/j.wem.2013.09.015>
- Vázquez Ramírez, M. F., Rangel Núñez, J. C., Ibarra, J. E., & Del Rincón Castro, M. C. (2015). Evaluación como agentes de control biológico y caracterización de cepas mexicanas de *Bacillus thuringiensis* contra el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista de Ciencia y Tecnología de América*, 40(6), 397–402. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5597667>
- Wei, J.-Z., Lum, A., Schepers, E., Liu, L., Weston, R. T., McGinness, B. S., Heckert, M. J., Xie, W., Kassa, A., Bruck, D., Rauscher, G., Kapka-Kitzman, D., Mathis, J. P., Zhao, J.-Z., Sethi, A., Barry, J., Lu, A. L., Brugliera, F., Lee, E. L., ... Anderson, M. A. (2023). Novel insecticidal proteins from ferns resemble insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(44). <https://doi.org/10.1073/pnas.2306177120>
- Yamamoto, T. (2022). Engineering of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. *Journal of Pesticide Science*, 47(2), D22-016. <https://doi.org/10.1584/jpestics.D22-016>