



Characterization of the proteins from occlusion bodies of baculoviruses with activity against the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*

Caracterización de las proteínas de los cuerpos de oclusión de baculovirus con actividad hacia el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda*

Jonatan C. Rangel-Núñez^{ID}, Ma. de los Angeles Bivián-Hernández^{ID}, Ma. Cristina Del Rincón-Castro*^{ID}

Departamento de Alimentos, Posgrado en Biociencias, División Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato, Campus Irapuato-Salamanca, 36500, Km. 9.0 Carretera Irapuato-León, Irapuato, Guanajuato, Mexico.

*Corresponding author

E-mail address: cdelrincon@ugto.mx (M.C. Del Rincón-Castro)

Article history:

Received: 30 September 2025 / Received in revised form: 30 November 2025 / Accepted: 17 February 2026 / Published online: 27 February 2026.

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2026.11.1.21-48>

ABSTRACT

The fall armyworm *Spodoptera frugiperda* causes severe yield losses in maize and its control has been based on the use of chemical insecticides mostly. The proteins of occlusion bodies, occlusion-derived virions, chitinase activity and the chitinase gene were analyzed in seven baculovirus SfNPV strains isolated from *S. frugiperda*, SfNPV-Ar, SfNPV-Fx, SfNPV-Ho, SfNPV-Sin, SfNPV-An1, SfNPV-An2, and SfNPV-Gto. The strains with the lowest amounts of proteins detected were SfNPV-Ar and SfNPV-Gto, a high chitinase activity was detected in both strains and the SfNPV-An2 strain. The chitinase gene sequences were identified in the genomes of SfNPV-Ar, SfNPV-Fx, SfNPV-Ho, SfNPV-Sin and SfNPV-An1 strains, all sequences showed a change from LEU to ILE in the active site, a signal peptide and a retention motif, except for the SfNPV-Ho strain. The chitinase gene phylogeny showed a close relationship between all SfNPV chitinases. These results showed that the most virulent SfNPV strains have chitinase activity and fewer proteins, this will affect the virulence and virus-insect interaction, making the SfNPV-Ar, SfNPV-Gto and SfNPV-An2 great candidates for the control of the fall armyworm.

Key words: chitinase, protein, baculovirus, *Spodoptera frugiperda*.

RESUMEN

El gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* provoca graves pérdidas en el rendimiento en el maíz, y su control se basa en el uso de insecticidas químicos. Se analizaron las proteínas de los cuerpos de oclusión, viriones derivados de oclusión, la actividad de quitinasa, se identificó y caracterizó al gen de la quitinasa de las cepas SfNPV aisladas de *S. frugiperda*: SfNPV-Ar, SfNPV-Fx, SfNPV-Ho, SfNPV-Sin, SfNPV-An1, SfNPV-An2 y SfNPV-Gto. Se observó una menor cantidad de proteínas en las cepas SfNPV-Ar y SfNPV-Gto y una alta actividad de quitinasa en ambas cepas y en SfNPV-An2. Se identificaron las secuencias del gen de la quitinasa en los genomas de SfNPV-Ar, SfNPV-Fx, SfNPV-Ho, SfNPV-Sin y SfNPV-An1, quienes mostraron un cambio de LEU por ILE en el sitio activo, un péptido señal y un motivo de retención, excepto por SfNPV-Ho. La filogenia del gen de la quitinasa mostró una estrecha relación entre todas las quitinasas. Las cepas SfNPV más virulentas mostraron actividad de quitinasas y una menor cantidad de proteínas, lo cual puede afectar su virulencia e interacción virus-insecto, las cepas SfNPV-Ar, SfNPV-Gto y SfNPV-An2 son buenas candidatas para el control del gusano cogollero del maíz.

Palabras clave: quitinasas, proteínas, baculovirus, *Spodoptera frugiperda*.

1. Introducción

Spodoptera frugiperda (Lepidoptera:Noctuidae) es considerada la principal plaga del maíz, debido a que causa hasta un 40% de pérdida en el rendimiento del cultivo (Chimweta *et al.*, 2020). Actualmente *S. frugiperda* tiene presencia global (Liu *et al.*, 2020), y ha desarrollado resistencia a la mayoría de los compuestos químicos usados para su control, e incluso hacia toxinas Cry (Horikoshi *et al.*, 2016), lo que ha propiciado la búsqueda de alternativas de control sustentables y seguras, siendo el uso de entomopatógenos específicos una de ellas. Los baculovirus son virus de DNA de doble cadena, con genomas de entre 80 a 180 kb, clasificados en 4 géneros: *Alfabaculovirus*, *Betabaculovirus*, *Deltabaculovirus* y *Gammabaculovirus* (Jehle *et al.*, 2006). Estos virus completan su ciclo de infección en dos etapas: primaria y secundaria. La etapa primaria es la ruta de entrada al organismo, donde se da la primera interacción del patógeno con el organismo susceptible, específicamente entre los viriones derivados de oclusión (VDO) y las células columnares del intestino medio. Dentro de éstas, el virus se replica y activa diversos mecanismos de defensa para, en la etapa avanzada de la infección primaria producir los viriones gemados (VB). Estos emergen de las células columnares hacia el resto de los órganos y tejidos del insecto, iniciando la infección secundaria y propagando la infección por todos los órganos y tejidos desarrollando una infección sistémica (Donly *et al.*, 2014; 2016; Wang *et al.*, 2016; Rangel-Núñez *et al.*, 2023).

Durante la infección primaria, los VDO son liberados de los cuerpos de oclusión (CO) debido al pH alcalino del contenido intestinal. Estos VDO presentan diversas proteínas, como los factores de infectividad *per os* (PIF), proteínas asociadas a la envoltura viral (VDO-E) y proteínas asociadas al CO (Rohrmann, 2019). Existen nueve proteínas PIF: p74/PIF0 (Kuzio *et al.*, 1989), PIF1 (Kikhno *et al.*, 2002), PIF2 (Pijlman *et al.*, 2003), PIF3 (Ohkawa *et al.*, 2005), PIF4 (Fang *et al.*, 2009), PIF5/ ODV-E66 (Harrison *et al.*, 2010), PIF6 (Nie *et al.*, 2012), PIF7 (Liu *et al.*, 2016), PIF8 (VP91/P95) (Zhu *et al.*, 2013). Estos factores son vitales para el reconocimiento de las células columnares en el intestino del insecto por los VDO. Los factores PIF trabajan en conjunto y la delección de algunos de ellos ocasionan la pérdida de la capacidad infectiva de los VDO (Boogaard *et al.*, 2018). De los factores PIF únicamente PIF7 se ha identificado en los *Alfabaculovirus* y *Betabaculovirus* que infectan Lepidópteros (Song *et al.*, 2016). Por otro lado, se ha identificado la presencia de hasta 101 proteínas del insecto en los VB y hasta 23 en los VDO y CO. La presencia de este tipo de proteínas asociadas se relaciona con la regulación de procesos celulares, sin embargo, su papel en el proceso de infección es incierto (Hou *et al.*, 2013; Hou *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2017). En los CO se han identificado proteínas virales como: las enhancinas en los granulovirus (GV) (Hashimoto *et al.*, 1991) y las quitinasas en el caso de los núcleopoliedrovirus (NPV) (Hawtin *et al.*, 1997), así como proteasas del insecto (Rubinstein y Poison, 1983).

Se han aislado múltiples cepas de baculovirus con diversos niveles de virulencia contra *S. frugiperda* en el continente americano (Escribano *et al.*, 1999; Barreto *et al.*, 2005; Vásquez *et al.*, 2006; Yasem de Romero *et al.*, 2009; Marina *et al.*, 2010; Rios-Velasco *et al.*, 2011; Rangel-Núñez *et al.*, 2014; Ordóñez-García *et al.*, 2020; Zanella-Saenz *et al.*, 2022). Esta variación en el nivel de virulencia mostrado por estos aislados sugiere que cada cepa viral presenta mecanismos moleculares únicos para infectar a su hospedero. La presencia de proteínas en los CO podrían estar relacionadas con el inicio de la infección primaria, esto puede ser estudiado analizando las proteínas de los CO y VDO de siete cepas de baculovirus que afectan a *S. frugiperda* aisladas de diversas regiones de México y del continente americano, para las cuales se reportaron concentraciones letales medias (CL₅₀), que oscilaron entre los 0.3 a 65,000 CO/mm² (cuerpos de oclusión por milímetro cuadrado) (Rios-Velasco *et al.*, 2011; Rangel-Núñez *et al.*, 2014; Zanella-Saenz *et al.*, 2022). En este trabajo se analizaron las proteínas de los CO y VDO de siete cepas de baculovirus de *S. frugiperda* aisladas de diversas regiones de México y del continente americano, se evaluó la actividad quitinolítica de las proteínas presentes en los CO de los diferentes aislados, se identificaron, analizaron y establecieron relaciones filogenéticas de cinco cepas de baculovirus específicas a *S. frugiperda* basándose en la secuencia del gen *chi* y finalmente se determinaron interacciones proteína-proteína de las quitinasas de SfNPV. Lo anterior con la finalidad de determinar las diferencias en cuanto proteínas, proteasas y quitinasas entre las cepas SfNPV, así como la composición y estructura de las quitinasas de baculovirus específicos de *S. frugiperda* y determinar si estas diferencias, pueden relacionarse con la virulencia mostrada por cada una de las cepas analizadas.

2. Materiales y métodos

2.1. Colonia de *S. frugiperda* y cepas virales

La colonia de *S. frugiperda* se estableció en el Laboratorio de Biotecnología Alimentaria y Vegetal de la Universidad de Guanajuato, México, utilizando una dieta artificial a base de maíz molido, levadura de cerveza, germen de trigo, ac. sórbico y ascórbico, metil paraben y frijol soya, según lo descrito por Rangel-Núñez *et al.* 2014. Esta se mantuvo bajo condiciones controladas de 25 °C, 60% humedad relativa (± 1 °C, ± 3 -5% humedad relativa) y un fotoperiodo de 14 horas luz/ 10 horas oscuridad, en una incubadora Lumistell modelo ICP-20.

2.2. Amplificación de cepas virales

Se utilizaron las cepas virales aisladas en Argentina (SfNPV-Ar), Estados Unidos (SfNPV-Fx) y Honduras (SfNPV-Ho), caracterizadas por Rangel-Núñez *et al.* (2014); las cepas aisladas en México, en el Estado de Sinaloa (SfNPV-Sin) (Zanella-Saenz *et al.*, 2022), Coahuila (SfNPV-An1, SfNPV-An2) (Rios-Velasco *et al.*, 2011) y Guanajuato (SfNPV-Gto) (Franco-Ramírez *et al.*, 2026). Estas se amplificaron en larvas de *S. frugiperda* de tercer instar, contaminando la superficie de cajas Petri (90x15 mm) que contenían dieta artificial para este insecto, a una concentración de 1×10^6 CO por caja en 1 mL. En la caja se colocaron 10 larvas de *S. frugiperda* de tercer instar y se incubaron por 7 días bajo condiciones de insectario, posteriormente fueron recolectadas y almacenadas a -20°C.

2.3. Purificación de los cuerpos de oclusión

Las larvas de *S. frugiperda* infectadas con las cepas SfNPV, se maceraron en un mortero de porcelana, se les agregó una solución del 0.5% de SDS, se filtraron en una malla de organza y se centrifugaron a 13,000 revoluciones por minuto (rpm) por 10 min en una centrífuga Hermle (Z326K), este proceso se realizó tres veces. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se disolvió en 10 mL de agua destilada estéril (ADE). Los CO se purificaron en gradientes continuos de sacarosa del 66-40% peso-peso, en una ultracentrífuga Beckman Coulter (XPN-100) a 24,000 rpm por 1.5 horas a 4°C. Posteriormente se colectó la banda correspondiente a los CO y se disolvió con ADE, esta se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min y la pastilla se disolvió en 10 mL de ADE, el proceso se repitió tres veces. Finalmente, la pastilla se disolvió en 5 mL de ADE y los CO se cuantificaron en una cámara de Neubauer según lo reportado por Jiménez-Hernández *et al.* (2022) y Zanella-Saenz *et al.* (2022) y se almacenaron a -20 °C.

2.4. Extracción de viriones derivados de oclusión

Para cada una de las cepas se tomaron 2×10^8 CO, estos se centrifugaron a 14,000 rpm por 10 min, se retiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1 mL de ADE repitiendo el

proceso tres veces. Posteriormente la pastilla se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min, se retiró el sobrenadante y las proteínas de los CO de las diferentes cepas de SfNPV se extrajeron utilizando tres métodos diferentes: a) en el primer método, los CO se disolvieron en 200 µL de álcali (0.1 M Na₂CO₃, 0.1 M NaCl, pH 11) manteniéndolos a temperatura ambiente y 150 rpm en una incubadora con agitación (Shaker MRC) por una hora. Una vez concluido ese tiempo se mantuvieron a una temperatura de -20 °C; b) para el segundo método, los CO se disolvieron en 200 µL de álcali manteniéndolos a temperatura ambiente y 150 rpm en una incubadora con agitación marca Shaker MRC por una hora, posteriormente las muestras se centrifugaron a 12,500 rpm por 30 min a 4 °C, se recuperó el sobrenadante y las muestras se mantuvieron a -20°C, c) para el tercer método, a las pastillas de CO se les agregaron inhibidores de proteasas: 10 µL de ditioneitol (DTT 0.1 M) y 10 µL fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF 0.1 M), posteriormente la pastilla de CO se disolvió con 200 µL de álcali manteniéndolos a 4 °C y 150 rpm en una incubadora con agitación marca Shaker MRC por una hora, sin perder la temperatura de 4 °C, las muestras se centrifugaron a 12,500 rpm por 30 min a 4 °C, se recuperó el sobrenadante y la muestra se mantuvieron a -20 °C.

2.5. Cuantificación de proteínas

Para las soluciones obtenidas en el apartado 2.4, se determinó la concentración de proteínas expresada en microgramos por microlitro (µg/µL), utilizando el kit Bradford II Protein assay (BioRad), siguiendo las recomendaciones del proveedor. Las mezclas se realizaron en una microplaca de 96 pozos Nunc MaxiSorp (Thermo Scientific) y la absorbancia se leyó en un espectrofotómetro de microplaca xMark (BioRad), a una longitud de onda de 595 nm.

2.6. Geles desnaturalizantes de acrilamida

Para analizar las proteínas presentes en los CO y VDO de las cepas de baculovirus SfNPV obtenidas en el apartado 2.4, se tomaron 25 µg de proteína total cada cepa y se mezclaron con solución de Laemli 4x (500 µL de Tris 0.5 M pH 6.8, 200 µL de SDS 20%, 200 µL de Glicerol y 100 µL de azul de Bromofenol 0.002%) hasta obtener una concentración final de la solución de Laemli 1x. A las muestras se les agregaron 0.5 µL de β-mercaptoetanol por cada 10 µL de volumen final, se calentaron a 95 °C por 5 min y se analizaron en geles SDS-PAGE al 13%. El gel separador se preparó al 13% usando: 1.822 mL de ADE, 1.125 mL de Tris 1.5 M pH 8.8, 1.4 mL de acrilamida al 40%, 45 µL de SDS al 10%, 4.5 µL de TEMED y 45 µL de persulfato de amonio al 10%. El gel concentrador se preparó al 5% con: 1.095 mL de ADE, 187 µL de Tris 0.5 M pH 6.8, 187 µL de acrilamida al 40%, 15 µL de SDS al 10%, 1.5 µL de TEMED y 15 µL de persulfato de amonio al 10%. Los geles se colocaron en una cámara vertical Mini PAGE System (Select BioProducts) con solución SDS-PAGE (250 mM Tris base, 1.92 M Glicina, 1% SDS, pH 8.8) y se les aplicó un voltaje de 60 volts por 30 min, seguido de un voltaje de 120 volts por 1.5 h. Los geles se fijaron con una solución de agua destilada, metanol y ácido acético en relación 5:4:1 por 30 min con agitación a 30 rpm, se

tiñeron con una solución de Coomassie (0.25% azul brillante de Coomassie G-250, 45 % metanol, 5% ácido acético y 50% de ADE) durante 10 min en agitación a 30 rpm y se destiñeron toda la noche con una solución para desteñir (7.5% ácido acético, 5% metanol, 87.5% ADE). Finalmente se fotografiaron en un fotodocumentador Gel Doc™ EZ (BioRad).

2.7. Geles nativos

Para analizar las proteínas presentes en los CO y VDO de las cepas de baculovirus SfNPV bajo condiciones nativas, se utilizaron 25 µg de proteína total por cepa del segundo tratamiento (b) descrito en el apartado 2.4. Estas muestras se prepararon, analizaron, fijaron y revelaron según lo descrito en el apartado 2.6, con la excepción de que no se usó SDS en la Solución de Laemli, en el gel de acrilamida, ni en el buffer de corrida; asimismo, no se agregó β-mercaptoetanol a la solución de Laemli, ni se calentó la muestra a 95 °C.

2.8. Preparación de quitina coloidal

Para preparar quitina en partículas finas, se siguió el protocolo descrito por Joe y Sarojini (2017), con modificaciones. Primeramente, se trataron 10 g de quitina en escamas, con 200 mL de HCl 6N, agitando por 1 hora. La mezcla quitina-HCl se filtró con gasas, se trató con 2 litros de ADE fría y se incubó a 4 °C toda la noche. Posteriormente el precipitado se trató según lo descrito por Pradeep *et al.* (2015), con modificaciones. El precipitado se centrifugó a 10,000 rpm por 30 min en una centrifuga Hermle (Z326K), la pastilla se lavó con ADE, repitiendo el proceso hasta que el pH de la mezcla quitina-ADE fuese de 7. La quitina coloidal se liofilizó en una liofilizadora Bench Top Pro (SP Scientific), se esterilizó en una autoclave a 120 °C por 15 min y se almacenó a 4 °C.

2.9. Geles para detectar la actividad de quitinasa

La detección de actividad de quitinasas en las proteínas en los CO y VDO de las cepas de baculovirus SfNPV, se realizó mediante geles SDS-PAGE al 13% enriquecidos con quitina coloidal, para lo cual se usaron 25 µg de proteína de las muestras obtenidas con el método b, descrito en la sección 2.4, las cuales se mezclaron con la solución de Laemli al 1X y se agregaron 0.5 µL de β-mercaptoetanol por cada 10 µL de volumen final sin sobrepasar la concentración de 30 nM. Las muestras no se hirvieron para evitar la ruptura de enlaces disulfuro internos. Lo anterior se analizó en geles de acrilamida SDS-PAGE al 13% según lo descrito en el apartado 2.6, con la diferencia de que el gel separador se enriqueció con una concentración de quitina coloidal al 0.1% según lo reportado Pradeep *et al.* (2015). Los geles se colocaron en la solución de fijación por 30 min, posteriormente se equilibraron en una solución de Tris Base 50 mM, 0.01%, Triton X-100 y 0.01% de calcofluor white por 30 min y se visualizaron en un fotodocumentador Gel Doc™ EZ Imagen (BioRad) bajo luz UV, para determinar las zonas de actividad de quitinasas.

2.10. Identificación de quitinasas en los genomas de baculovirus de *S. frugiperda*

Con la información de las secuencias de genomas de las cepas de baculovirus SfNPV-Ar (GenBank [PX222935](#)), SfNPV-Fx (GenBank [PX222936](#)), SfNPV-Ho (GenBank [PX222937](#)), SfNPV-Sin (GenBank [PX222938](#)) y SfNPV-An1 (GenBank [PX222934](#)) (Bivian-Hernández *et al.*, 2025) (datos en prensa), se identificaron los marcos de lectura abierta (ORF), correspondientes a los genes de las quitinasas, estas secuencias de nucleótidos se tradujeron a su secuencia de aminoácidos usando el programa UGEN (V52.1), las secuencias se alinearon usando el programa MEGA (versión 11). Se utilizaron secuencias consenso en un BLAST (blastp) para determinar la identidad. Las secuencias de aminoácidos de los genes de las quitinasas se usaron para analizar la presencia de péptidos señal, usando predicts alpha and beta transmembrane proteins deep neural networks (DeepTMHMM de DTU Health Tech) según lo dispuesto por Hallgren *et al.* (2022). Utilizando las secuencias de aminoácidos de los genes de las quitinasas de las cepas de baculovirus SfNPV y con la ayuda del programa UGEN (V52.1), se realizó una identificación del motivo de retención del retículo (KDEL o REEL) y el sitio activo (FDGVDLDWE o FDGVDVDWE) que poseen estas enzimas, reportados por Wang *et al.* (2013) y Salvador *et al.* (2014).

2.11. Filogenia de las quitinasas de baculovirus de *S. frugiperda*

Se utilizaron las secuencias de nucleótidos de las quitinasas identificadas en los genomas de las cepas virales SfNPV-Ar, SfNPV-Fx, SfNPV-Ho, SfNPV-An1 y SfNPV-Sin, para determinar su filogenia. Para lo cual, se tradujeron a su secuencia de aminoácidos usando el programa UGEN (V52.1), junto con las secuencias de quitinasas de baculovirus reportados en el NCBI (www.ncbi.nih.gov), así como de las secuencias de las quitinasas de *S. marcescens* ([AHH32577.1](#)), *S. frugiperda* ([AAS18266.1](#)) y *M. rileyi* ([ACF10394.1](#)) como grupos externos. Las secuencias se alinearon utilizando el software Seaview5. Posteriormente, se infirió el árbol filogenético utilizando el método de máxima verosimilitud en el programa IQ-TREE 2 (V2.3.3). El modelo empleado fue el Q.pfam+G4, con un valor de AICc de 32459.773, BIC de 32472.836 y una verosimilitud logarítmica (-LnL) de -16144.360. El análisis incluyó 1,000 réplicas de Bootstrap ultrarrápidas (-bb 1000) y una prueba de rama SH-aLRT (-aLRT 1000) según lo reportado por Kalyaanamoorthy *et al.* (2017); Hoang *et al.* (2018) y Minh *et al.* (2020). La visualización del árbol filogenético se realizó en el programa FigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) según lo expuesto por Minh *et al.* (2020).

2.12. Análisis de interacción de proteínas

Para predecir las funciones biológicas, la localización y la interacción de las quitinasas de las cepas SfNPV-Ar, SfNPV-Fx, SfNPV-Ho, SfNPV-An1 y SfNPV-Sin, se usó la secuencia de aminoácidos de las cepas de SfNPV antes mencionadas. Las cuáles se analizaron en la base de datos del sistema STRING database (<https://string-db.org/>), en la cual se

seleccionó la proteína con los parámetros de porcentaje de similitud más elevado y como valor de e más bajo. Una vez seleccionada la proteína, se determinaron las interacciones, la función biológica y localización, usando los parámetros de default.

3. Resultados

3.1. Análisis de las proteínas en condiciones alcalinas

Al analizar las proteínas presentes en los CO y VDO de las cepas SfNPV-Ar, Fx, Ho, Sin, An1, An2 y Gto, bajo condiciones similares a las presentes en el intestino de las larvas de *S. frugiperda* en geles SDS-PAGE, se observaron diferencias en cantidad y distribución de proteínas (Fig. 1). Cuando se utilizó el método de extracción a del apartado 2.4, al separar las proteínas en geles SDS-PAGE, se observó una separación de proteínas desde los 10 a los 90 kDa en todas las cepas, observándose pocas diferencias (Fig. 1a). Las cepas con mayor número de proteínas fueron SfNPV-An1 y SfNPV-Sin, con 21 y 17 proteínas (Fig. 1a) (S1). Las cepas con menor número de proteínas fueron SfNPV-Ar y SfNPV-Gto con 9 y 11 bandas (Fig. 1a) (S1). Las diferencias identificadas fueron: una proteína de 9 kDa presente en la cepa SfNPV-Ar, una proteína de 12 kDa presente en las cepas SfNPV-Ar, SfNPV-SfNPV-Ho, SfNPV-Sin y SfNPV-An1. Una proteína de 13 kDa y otra de 13.5 kDa presentes en las cepas SfNPV-An1 y SfNPV-Sin. Una proteína de 15 kDa presente en las cepas SfNPV-Ar, SfNPV-Fx, SfNPV-Ho y SfNPV-An1. Una proteína de 17 kDa presente en las cepas SfNPV-Ar, SfNPV-Sin y SfNPV-An1. Una proteína de 19 kDa presente en las cepas SfNPV-Fx, SfNPV-Sin, SfNPV-An1 y SfNPV-Gto. Dos proteínas de 50 kDa y 51 kDa presentes en la cepa SfNPV-Fx. Una proteína de 60 kDa presente en la cepa SfNPV-Sin y finalmente, dos proteínas de 70 y 80 kDa presentes en las cepas SfNPV-Sin, SfNPV-An1, SfNPV-An2 y SfNPV-Gto.

En el método de extracción b (ver apartado 2.4), al separar las proteínas en geles de SDS-PAGE se observó una menor cantidad de proteínas que lo observado en el método a (Fig. 1a y 1b) (S1). En este método, no se observaron proteínas superiores a los 40 kDa, ni la presencia de una proteína de 30 kDa (Fig. 1b), la cual corresponde a la proteína mayoritaria de los CO en los baculovirus denominada poliedrina. De acuerdo con la distribución y el peso de las proteínas detectadas con este método, se clasificó para las cepas en tres grupos. En el primero de ellos se agrupó a las cepas SfNPV-Ar y SfNPV-An2, donde la cepa SfNPV-Ar presentó 12 proteínas desde los 10 a 40 kDa (Fig. 1b) (S1) y para la cepa SfNPV-An2 se observaron 15 proteínas, siendo esta cepa la que mayor número de proteínas presentó (Fig. 1b) (S1). Las diferencias encontradas entre estas dos cepas se centraron en la presencia de tres proteínas de 11, 13 y 14 kDa presentes en la cepa SfNPV-An2 (Fig. 1b) (S1). En el segundo grupo se ubicaron las cepas SfNPV-Fx, SfNPV-Ho, SfNPV-Sin y SfNPV-Gto. Entre ellas se observó que las cepas SfNPV-Fx, SfNPV-Ho y SfNPV-Sin presentaron un patrón similar con 12 proteínas, mostrando muy pocas diferencias, ya que la cepa SfNPV-Ho presentó una proteína inferior a los 10 kDa, ausente en las demás cepas, la cepa SfNPV-Sin no presentó una proteína de 40 kDa y en la cepa SfNPV-Gto no se observaron

proteínas inferiores a los 10 kDa. Finalmente, en el tercer grupo, se ubicó a la cepa SfNPV-An1, cuyo patrón de proteínas fue único (Fig. 1b) (S1), ya que no presentó ninguna de las proteínas presentes en las demás cepas, entre 20 a 40 kDa.

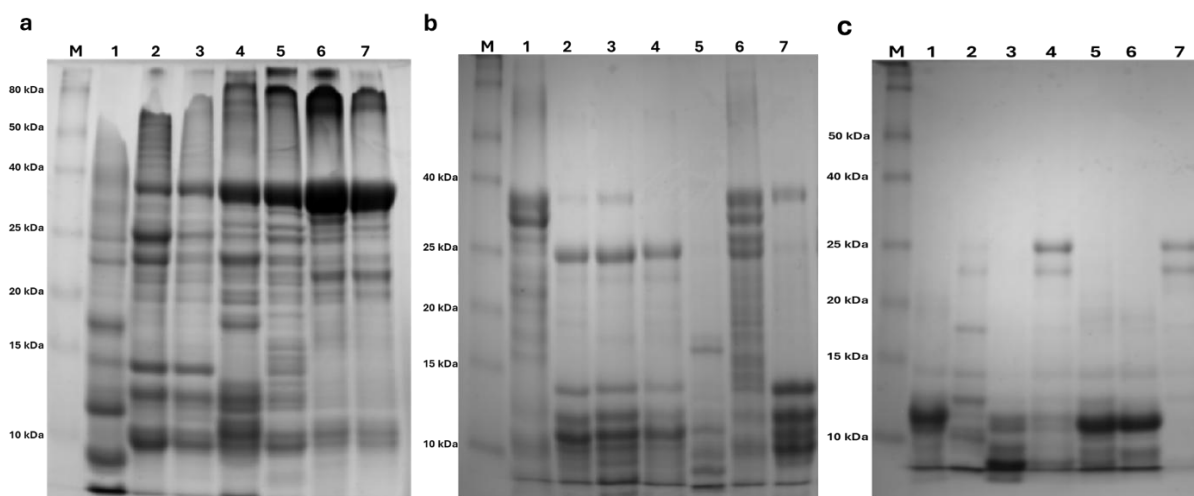


Fig. 1. Gel de acrilamida SDS-PAGE de las proteínas de los CO y VDO en álcali. Proteínas de la cepa SfNPV-Ar (carril 1), proteínas de la cepa SfNPV-Fx (carril 2), proteínas de la cepa SfNPV-Ho (carril 3), proteínas de la cepa SfNPV-Sin (carril 4), proteínas de la cepa SfNPV-An1 (carril 5), proteínas de la cepa SfNPV-An2 (carril 6), proteínas de la cepa SfNPV-Gto (carril 7), marcador de peso molecular Bench Mark (Invitrogen) (M). Proteínas tratadas con el método a (sección 2.4) (a). Proteínas tratadas con el método b (sección 2.4) (b). Proteínas tratadas con el método c (sección 2.4) (c).

Fig. 1. SDS-PAGE acrylamide gel for CO and VDO proteins in alkali. Proteins of SfNPV-Ar strain (lane 1), proteins of SfNPV-Fx strain (lane 2), proteins of SfNPV-Ho strain (lane 3), proteins of SfNPV-Sin strain (lane 4), proteins of SfNPV-An1 strain (lane 5), proteins of SfNPV-An2 strain (lane 6), proteins of SfNPV-Gto strain (lane 7). Bench Mark molecular weight marker (Invitrogen) (M). Proteins treated with method a (section 2.4) (a). Proteins treated with method b (section 2.4) (b). Proteins treated with method c (section 2.4) (c).

En el tercer método de extracción (sección 2.4, c), se usaron inhibidores de proteasas seguido de tratamiento con álcali y precipitación a altas revoluciones, observándose una clara disminución en la cantidad de proteínas (Fig. 1c) (S1), comparado con los métodos anteriores (Fig. 1a, 1b y 1c) (S1). En este tercer método, no se observaron proteínas superiores a los 25 kDa en ninguna de las cepas de SfNPV analizadas. De acuerdo con la distribución y el peso de las proteínas detectadas con este método, se clasificó a las cepas en dos: en la primera categoría, se ubicaron las cepas SfNPV-Ar, SfNPV-Ho, SfNPV-An1 y SfNPV-An2, ya que estas mostraron solamente proteínas inferiores a los 20 kDa (Fig. 1c) (S1). Las diferencias entre ellas fueron la presencia de una proteína menor a los 10 kDa en las cepas SfNPV-Ar y SfNPV-Ho (Fig. 1b) y la ausencia de una proteína de 15 kDa en la

cepa SfNPV-Ho (Fig. 1b). En la segunda categoría, se agruparon las cepas SfNPV-Fx, SfNPV-Sin y SfNPV-Gto las cuales mostraron proteínas hasta los 25 kDa (Fig.1b) (S1). Las diferencias entre ellas fueron la ausencia de proteínas de 10 kDa en la cepa SfNPV-Gto (Fig. 1b) (S1) y el cambio en el nivel de expresión de la proteína de 25 kDa en la cepa SfNPV-Fx (Fig. 1b).

3.2. Análisis de las proteínas en geles nativos

Para determinar la presencia de proteínas libres en los CO y no asociadas a los complejos de proteínas de los VDO, de las cepas SfNPV-Ar, SfNPV-Fx, SfNPV-Ho, SfNPV-Sin, SfNPV-An1, SfNPV-An2 y SfNPV-Gto, se realizaron geles nativos. En estos geles se observó la liberación de proteínas en las cepas SfNPV-Fx, SfNPV-Ho, SfNPV-Sin, SfNPV-An1 y SfNPV-Gto. En la cepa SfNPV- Fx se observó una proteína de 60 kDa, ausente en todas las demás cepas (Fig. 2). En las cepas SfNPV-Fx y SfNPV-Sin se observaron dos proteínas de 50 y 40 kDa, ausentes en las demás cepas (Fig. 2). En las cepas SfNPV-Ho y SfNPV-An1 se observaron proteínas de 10 kDa y 15 kDa, ausentes en las demás cepas (Fig. 2). Finalmente, la cepa SfNPV-Gto presentó proteínas desde los 25 hasta los 40 kDa, similares a las de las cepas SfNPV-Fx y SfNPV-Sin. En las cepas SfNPV-Ar y SfNPV-An2, no se observó liberación de proteínas en condiciones nativas (Fig. 2).

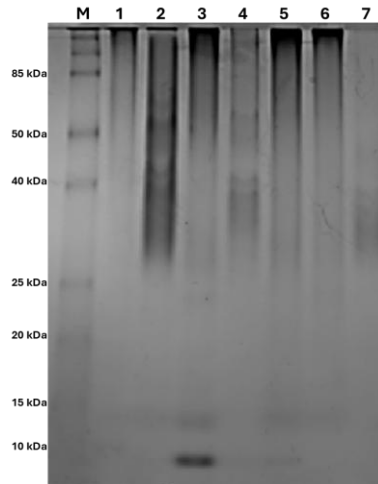


Fig. 2. Gel nativo para las proteínas de los CO y VDO en álcali. Proteínas de la cepa SfNPV-Ar (carril 1), proteínas de la cepa SfNPV-Fx (carril 2), proteínas de la cepa SfNPV-Ho (carril 3), proteínas de la cepa SfNPV-Sin (carril 4), proteínas de la cepa SfNPV-An1 (carril 5), proteínas de la cepa SfNPV-An2 (carril 6), proteínas de la cepa SfNPV-Gto (carril 7), marcador de peso molecular Bench Mark (Invitrogen) (M).

Fig. 2. Native gel for CO and VDO proteins in alkali. Proteins of SfNPV-Ar strain (lane 1), proteins of SfNPV-Fx strain (lane 2), proteins of SfNPV-Ho strain (lane 3), proteins of SfNPV-Sin strain (lane 4), proteins of SfNPV-An1 strain (lane 5), proteins of SfNPV-An2 strain (lane 6), proteins of SfNPV-Gto strain (lane 7). Bench Mark molecular weight marker (Invitrogen) (M).

3.3. Actividad de quitinasa

Para determinar la presencia de quitinasas dentro de los CO y VDO de las cepas SfNPV-Ar, SfNPV-Fx, SfNPV-Ho, SfNPV-Sin, SfNPV-An1, SfNPV-An2 y SfNPV-Gto en condiciones alcalinas, se realizaron geles SDS-PAGE enriquecidos con quitina. Se detectó actividad de quitinasa en los carriles 1, 6 y 7 de la Fig. 3 (flechas rojas), que correspondieron a las cepas SfNPV-Ar, SfNPV-An2 y SfNPV-Gto, dicha actividad fue registrada a los 40 kDa (Fig. 3). En contraste, las cepas SfNPV-Fx, SfNPV-Ho, SfNPV-Sin y SfNPV-An1, no presentaron actividad de degradación de quitina detectable por ese método (Fig. 3).

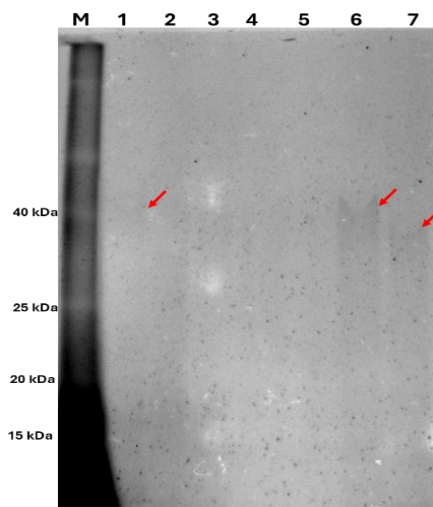


Fig. 3. Gel SDS-PAGE enriquecido con quitina para las proteínas de los CO y VDO en álcali. Proteínas de la cepa SfNPV-Ar (carril 1), proteínas de la cepa SfNPV-Fx (carril 2), proteínas de la cepa SfNPV-Ho (carril 3), proteínas de la cepa SfNPV-Sin (carril 4), proteínas de la cepa SfNPV-An1 (carril 5), proteínas de la cepa SfNPV-An2 (carril 6), proteínas de la cepa SfNPV-Gto (carril 7), marcador de peso molecular Bench Mark (Invitrogen) (M). Flechas rojas señalan zonas de actividad de quitinasa.

Fig. 3. Chitin-enriched SDS-PAGE gel for CO and VDO proteins in alkali. Proteins of SfNPV-Ar strain (lane 1), proteins of SfNPV-Fx strain (lane 2), proteins of SfNPV-Ho strain (lane 3), proteins of SfNPV-Sin strain (lane 4), proteins of SfNPV-An1 strain (lane 5), proteins of SfNPV-An2 strain (lane 6), proteins of SfNPV-Gto strain (lane 7). Bench Mark molecular weight marker (Invitrogen) (M). Red arrows indicate chitinase activity zones

3.4. Identificación de las secuencias de quitinasas en los genomas de cepas baculovirus de *S. frugiperda*

Se identificaron las secuencias de las quitinasas en los genomas de las cepas SfNPV-Ar (GenBank [PX222935](#)), SfNPV-Fx (GenBank [PX222936](#)), SfNPV-Ho (GenBank [PX222937](#)), SfNPV-Sin (GenBank [PX222938](#)) y SfNPV-An1 (GenBank [PX222934](#)). Una vez identificados los ORF de los genes de las quitinasas se determinó su similitud con la quitinasa de baculovirus de *S. frugiperda* (GenBank [QED40078.1](#) y [ADV91253.1](#)) resultando en una similitud del 99% (Tabla 1). Posteriormente, se detectaron diferencias en el tamaño de los ORF de las quitinasas, donde las cepas SfNPV-Ar, SfNPV-Fx y SfNPV-Sin presentaron ORF de mayor tamaño con 1,719 pb/ 572 aminoácidos (aa), seguido de los ORF de la quitinasa de SfNPV-Ho con 1,704 pb/ 567 aa, y finalmente el ORF de SfNPV-An1 presentó 1,695 pb/ 564 aa siendo este el de menor tamaño (Tabla 1). La similitud entre las secuencias de aa de las quitinasas fue del 100% entre las cepas SfNPV-Ar, SfNPV-Fx

y SfNPV-Sin, mientras que las cepas SfNPV-An1 y SfNPV-Ho mostraron un porcentaje de similitud del 98% y 97%, respectivamente (Tabla 2).

Derivado del análisis de las secuencias de aa de las quitinasas de las cepas SfNPV, se detectó un péptido señal (MPYIITLFLACVVLSAAKA) de 19 aa en la posición 1-19 en el extremo N-terminal de las secuencias de todas las quitinasas (Tabla 1). Se detectó la presencia de los sitios específicos de las glicosil hidrolasas de la familia 18 (SIGG) en la posición 266 a la 269 y el sitio activo (FDGVDIDWE) en la posición 302 a la 310 (Tabla 1) en todas las secuencias analizadas. En el sitio activo de las cinco quitinasas de SfNPV analizadas, se identificó un cambio de aa de LEU por ISO en la posición 307 (Tabla 1). Finalmente, se detectó un péptido de retención para el retículo endoplásmico (KDEL) en la posición 570 al 573 en el extremo C-terminal de las quitinasas de las cepas SfNPV-Ar, SfNPV-Fx, SfNPV-Sin y SfNPV-An1, pero no en la cepa SfNPV-Ho (Tabla 1).

Tabla 1. Identificación de similitudes y diferencias en las quitinasas de los genomas de SfNPV.

Table 1. Identification of similarities and differences between chitinases from SfNPV genomes.

Gen	Identidad (Número de identificación en el NCBI)	Tamaño gen/ peso de la proteína	Péptido señal	Sitio de retención en RE	Sitio activo (FDGVLDWE ó FDGVDVDWE)
Chi- SfNPV- AR	Quitinasa SfNPV (QED40078.1)	572aa/1719pb/ 63.645 kDa	MPYIITLFLA CVVLSAAKA	KDEL	FDGVDIDWE
Chi- SfNPV- Fx	Quitinasa SfNPV (QED40078.1)	572aa/1719pb/ 63.645 kDa	MPYIITLFLA CVVLSAAKA	KDEL	FDGVDIDWE
Chi- SfNPV- Ho	Quitinasa SfNPV (ADV91253.1)	567aa/1704pb/ 62.959 kDa	MPYIITLFLA CVVLSAAKA	----	FDGVDIDWE
Chi- SfNPV- Sin	Quitinasa SfNPV (QED40078.1)	572aa/1719pb/ 63.645 kDa	MPYIITLFLA CVVLSAAKA	KDEL	FDGVDIDWE
Chi- SfNPV- An1	Quitinasa SfNPV (ADV91253.1)	564aa/1695pb/ 62.639 kDa	MPYIITLFLA CVVLSAAKA	KDEL	FDGVDIDWE

Chi (quitinasa), kDa (kilodaltones), aa (aminoácidos), pb (pares de bases), RE (retículo endoplásmico).

Tabla 2. Porcentaje de similitud entre las quitinasas de los genomas de las cepas de baculovirus de SfNPV.

Table 2. Percentage of similarity between the chitinase genomes of *S. frugiperda* baculovirus SfNPV strains.

	Chi-SfNPV-Ar	Chi-SfNPV-Fx	Chi-SfNPV-Sin	Chi-SfNPV-Ho	Chi-SfNPV-An1
Chi-SfNPV-Ar	100%	100%	100%	97%	98%
Chi-SfNPV-Fx	100%	100%	100%	97%	98%
Chi-SfNPV-Sin	100%	100%	100%	97%	98%
Chi-SfNPV-Ho	97%	97%	97%	100%	98%
Chi-SfNPV-An1	98%	98%	98%	98%	100%

3.5. Análisis filogenético de las quitinasas de baculovirus de *S. frugiperda*

Se obtuvo el árbol filogenético de las quitinasas de las cepas SfNPV-Ar, SfNPV-Fx, SfNPV-Ho, SfNPV-An1 y SfNPV-Sin, de los *Alfabaculovirus* y *Betabaculovirus* (Fig. 4). Se observó que los dos géneros de baculovirus formaron un grupo monofilético. Fueron visibles dos clados principales. En el primero, se agruparon las quitinasas de los *Betabaculovirus*. Mientras que, en el segundo clado, se clasificaron exclusivamente quitinasas de *Alfabaculovirus* aislados de *S. frugiperda* y este se dividió en dos subclados. El primer subclado agrupó a las quitinasas de SfNPV-An1 y SfNPV-Ho, junto con una quitinasa de SfNPV-1197, dos quitinasas de cepas de baculovirus aisladas en Nicaragua: SfNPV-NicG y SfNPV-NicB y tres quitinasas de cepas aisladas en Estados Unidos: SfNPV-19, SfNPV-281 y SfNPV-3AP2 (Fig. 4). En el segundo subclado, se clasificaron las quitinasas de las cepas SfNPV-Ar y SfNPV-Sin, que se relacionaron de manera estrecha entre sí, e igualmente se observó en el mismo subclado, una agrupación de las quitinasas de las cepas SfNPV-ColA y SfNPV-459, así como con la cepa SfNPV-Fx de este trabajo.

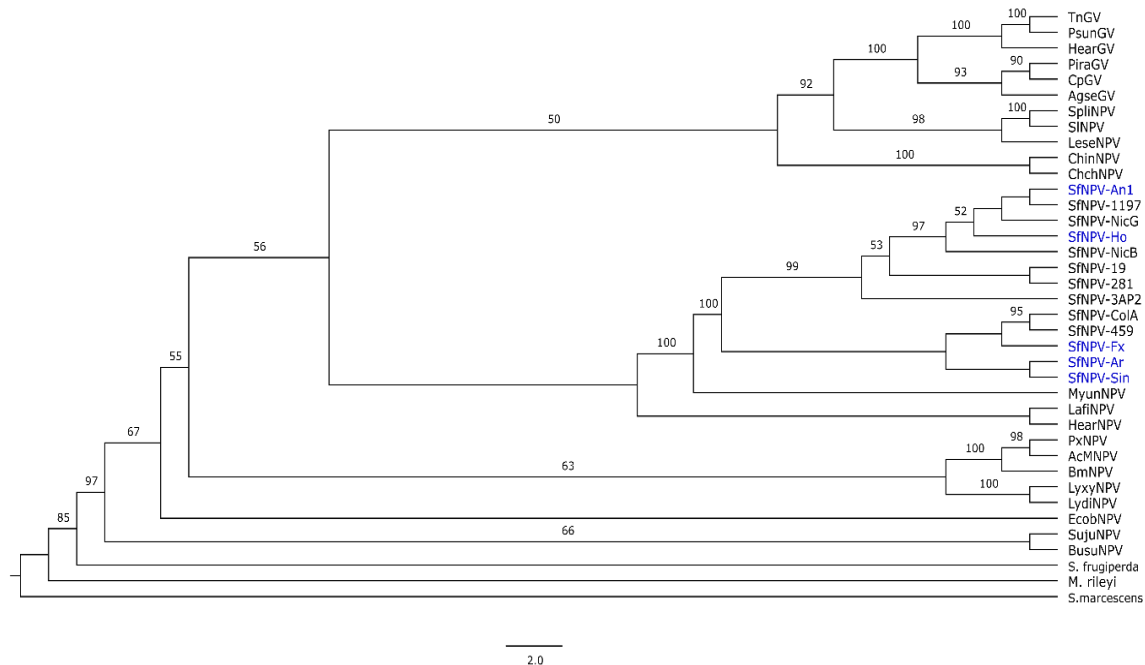


Fig. 4. Árbol filogenético derivado de 35 secuencias de quitinasas de baculovirus. Las quitinasas de *S. frugiperda*, *Serratia marcescens* y *Metarhizium rileyi* fueron usadas como grupos externos.

Fig. 4. Phylogenetic tree derived from the sequences of 35 baculovirus chitinases. Chitinases from *S. frugiperda*, *Serratia marcescens* and *Metarhizium rileyi* as outgroups.

3.6. Identificación de las interacciones de las quitinasas de baculovirus de *S. frugiperda*

Al realizar un análisis de interacción de proteínas en el sistema STRING, usando las secuencias de las quitinasas de SfNPV, el sistema determinó una identidad del 56% de estas proteínas con la quitinasa A de *Serratia marcescens* (ChiA), con número de identificación Uniprot [SMDB11 4243](#) (Tabla 3). Al analizar las interacciones de esta proteína, el sistema identificó tres y las agrupó en un solo clúster (Fig. 5) (Tabla 3). El sistema STRING identificó dos tipos de interacciones: en bases de datos curadas (Fig. 5, línea azul) entre chiA con chiC, chiB y CDG12570.1 e interacciones experimentales (Fig. 5, líneas rosas) entre chiA con chiC, así como, de chiC con chiB y CDG12570.1. El sistema STRING clasificó las funciones de las proteínas que interaccionan con ChiA como: proteínas relacionadas al procesamiento de carbohidratos (ChiA, ChiB, ChiC y CDG12570.1) y proteínas relacionadas al procesamiento catabólico de quitina (ChiA, ChiB y CDG12570.1). Finalmente, se determinó que ChiA, ChiB, ChiC y CDG12570.1 se localizan en el exterior de las células.

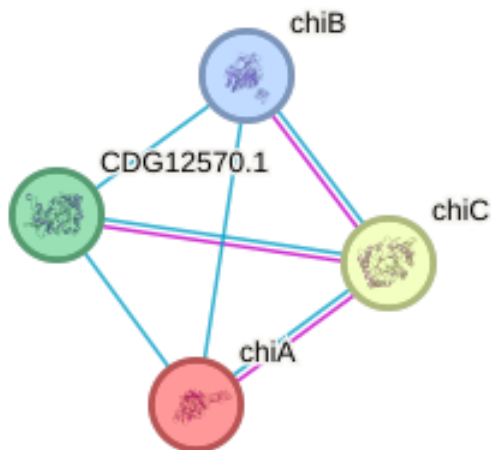


Fig. 5. Predicción de interacciones de ChiA (quitinasa A de *S. marcescens*). Línea azul interacciones predichas de bases de datos curadas y línea rosas interacciones probadas experimentalmente.

Fig. 5. Prediction of ChiA (chitinase A from *S. marcescens*) interaction. Blue line predicted interactions from curated databases, and pink line, experimentally tested interactions.

Tabla 3. Identificación de la interacción de las quitinasas de SfNPV.

Table 3. Identification of the interactions of SfNPV chitinases.

Proteína	Identificación en el sistema STRING	Clústeres	Interacciones
Quitinasa SfNPV	Identidad: 56% e-value: 2.1e-186 Endo quitinasa ChiA <i>Serratia marcescens</i> (SMDB11_4243 Uniprot)	Único	Chitinase ChiC (SMDB11_0468 uniprot) CDG12570.1 (SMDB11_1994 uniprot) Chitinase ChiB (SMDB11_2875 uniprot)

4. Discusión

En el presente trabajo se detectaron diferencias en las proteínas de los CO y VDO de siete cepas de baculovirus SfNPV específicos de *S. frugiperda* utilizando tres diferentes métodos de extracción de proteínas. Al analizar las proteínas obtenidas en cada método en geles SDS-PAGE, se observaron diferencias tanto en el total, como en la distribución de proteínas. La cantidad de proteínas observada en el presente trabajo y su distribución entre los 10 a 80 kDa, fue similar a lo reportado por Wood (1980); Perera *et al.* (2007); Liu *et al.* (2009) y Hou *et al.* (2013), quienes reportaron de 13 a 26 proteínas entre los 15 a 170 kDa. En este trabajo, al analizar los resultados con cada uno de los métodos, se observaron

diferencias entre cada una de las siete cepas de SfNPV analizadas y entre los diferentes métodos. Estas representaron cambios en la presencia de proteínas en el CO, en los VDO y en las proteínas asociadas a los CO. Dentro de las diferencias, destacó el hecho de que las cepas con menor virulencia hacia *S. frugiperda* SfNPV-Sin y SfNPV-An1 (Rios-Velasco *et al.*, 2011 y Zanella-Saenz *et al.*, 2022) presentaron una mayor cantidad de proteínas, mientras que las cepas con mayor virulencia, SfNPV-Ar y SfNPV-Gto (Rangel Núñez *et al.*, 2014 y Franco-Ramírez *et al.*, 2026) presentaron un menor número de proteínas en los geles SDS-PAGE.

En el método b, al someter los CO a una lisis alcalina seguida de centrifugación, el patrón de proteínas cambió en todas las cepas, dichas diferencias podrían ser un indicativo de la presencia de proteínas en los CO de las cepas de baculovirus, que, al ser expuestas a un medio alcalino, podrían ser insolubles. En cuanto al uso de inhibidores de proteasas, se observaron diferencias significativas. Esto fue un indicativo de la presencia de proteasas que se liberaron al momento de la solubilización del CO en medios alcalinos y que fueron activas bajo esas condiciones de pH elevado. La presencia de estas proteasas pudo ser el responsable de provocar un cambio en el patrón de proteínas observado en el presente trabajo, esto debido a la actividad proteolítica de estas enzimas sobre las proteínas presentes en los CO y VDO. De corroborarse lo anterior con futuros experimentos, se podría estudiar el efecto de estas proteasas en la formación correcta de estructuras como los complejos PIF. Alteraciones en los factores PIF afectarían seriamente el proceso de infección primaria, debido a que la estabilidad del complejo PIF es vital para que los baculovirus infecten a su huésped de manera natural, ya que como menciona Boogaard *et al.* (2017) la estabilidad del complejo PIF, recae en que ninguno de sus componentes centrales sea degradado por proteasas alcalinas, las cuales se encuentran presentes de manera natural en el intestino de las larvas susceptibles a la infección por baculovirus. En el caso de las cepas más virulentas analizadas en este estudio (SfNPV-Ar y SfNPV-Gto), es posible que su complejo PIF no se afecte o bien, que las interacciones entre los componentes de este complejo lo protejan de la degradación por proteasas alcalinas, asegurando el correcto desarrollo de la infección primaria. En el caso de las cepas menos virulentas hacia *S. frugiperda*, estas podrían ser afectadas por dichas proteasas, evitando que las proteínas PIF1, PIF2 y PIF3 interaccionen y se plieguen correctamente interfiriendo con el desarrollo de la infección primaria en el intestino de las larvas de *S. frugiperda*.

En este trabajo se detectó una variación en la concentración de la banda correspondiente a la poliedrina a los 30 kDa en la cepa SfNPV-Ar, así como la variación en la concentración de esta proteína entre las demás cepas. Lo anterior puede relacionarse con lo descrito por Wood (1980), quien detectó proteasas alcalinas en los CO de AcMNPV, dicho autor asoció la degradación de la poliedrina a estas proteasas. Finalmente, en resultados previos realizados por este grupo de trabajo, se realizó una extracción de proteínas de los CO de las cepas virales aquí analizadas, sin detectar diferencias significativas en cuanto al patrón de proteínas en geles SDS-PAGE (Franco-Ramírez *et al.*, 2026). Lo anterior fue atribuido a que no se realizó una lisis alcalina, sino que se usó una solución de lisis (8M Urea, 2M

Tiourea, 0.5% CHAPS, 1mM DTT y 1mM PMSF), donde la presencia de DTT y PMSF en la solución, causó una inhibición de las proteasas presentes en el CO, por lo que, no fue posible detectar su actividad, lo cual en el presente estudio si fue observado bajo condiciones alcalinas que simularon las condiciones de pH del intestino de *S. frugiperda*.

También se detectó actividad de quitinasas en las proteínas presentes en el CO y VDO de las cepas SfNPV-Ar, SfNPV-An2 y SfNPV-Gto, dichas cepas han resultado ser las más virulentas hacia *S. frugiperda* (Rangel Núñez *et al.*, 2014; Zanella-Saenz *et al.*, 2022), por lo que la presencia de una quitinasa activa en los CO en estas cepas, podría estar relacionada con la generación de poros en la membrana peritrófica (Salvador *et al.*, 2014), facilitando el establecimiento de la infección primaria. La presencia de una quitinasa en los CO de un baculovirus es mencionada por Hawtin *et al.* (1997), quienes determinaron que los CO de AcMNPV mantienen actividad residual de quitinasas, dichos autores mencionan que dichas enzimas son atrapadas durante la formación del CO y pertenecer al insecto, aunque también existe la posibilidad de que su origen sea viral, ya que la expresión de este gen en los baculovirus es controlada por promotores de tipo tardío (Salvador *et al.*, 2014 e Ishimwe *et al.*, 2015). Derivado de lo anterior, en trabajos recientes de este grupo de investigación se identificaron las secuencias de aminoácidos, a partir de las secuencias de los genes de quitinasas observados en los genomas de las cepas de baculovirus SfNPV, identificándose un péptido señal (MPYIITLFLACVVLSAAKA) en el extremo N-terminal de la secuencia, así como la secuencia de retención en el retículo endoplásmico KDEL en el extremo C-terminal. Estos péptidos permiten a la proteína su retención en el retículo endoplásmico, su acumulación y posterior liberación al exterior de las células donde degradarán el citoesqueleto del insecto infectado. Los elementos anteriores son comunes en las secuencias de quitinasas de los *Alfabaculovirus* como AcMNPV, BmNPV, HaSNPV, DkNPV (Gomi *et al.*, 1999; Saville *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2013), pero no en las quitinasas de *Betabaculovirus* (Daimon *et al.*, 2007; Salvador *et al.*, 2014). En el caso de la cepa SfNPV-Ho, esta careció de dicho motivo, lo cual sugiere que la cepa secreta la enzima constantemente y podría ser un factor que incremente su virulencia, tal como lo describen Saville *et al.* (2004), quienes al remover el péptido KDEL de la quitinasa de AcMNPV, detectaron la presencia de la enzima desde las 12 hpi en el medio de cultivo, así como un aumento de la virulencia del virus modificado en bioensayos con larvas de *Trichoplusia ni*.

Como parte del análisis de las quitinasas de los baculovirus SfNPV de *S. frugiperda* se detectaron los sitios SIGG y FDGVDIDWE, característicos de la familia 18 de las glicosil hidrolasas (Yasser *et al.*, 2021). Lo anterior, clasifica a las quitinasas de las cepas SfNPV-Ar, SfNPV-Fx, SfNPV-Ho, SfNPV-Sin y SfNPV-An1 como miembros de esta familia. Se detectó el sitio activo de la quitinasa (FDGVDIDWE) en todas las secuencias de las cepas analizadas en este estudio, sin embargo, al comparar la secuencia del sitio activo de los baculovirus de SfNPV con el sitio activo del *Alfabaculovirus* de *Dendrolimus kikuchii* (DkNPV) reportado por Wang *et al.* (2013) se detectó un cambio de VAL por ILE en SfNPV. De manera similar al comparar la secuencia del sitio activo de las quitinasas de SfNPV con el *Betabaculovirus* de *Epinotia aporema* (EpapGV) reportado por Salvador *et al.* (2014) se

detectó un cambio de LEU por ILE en SfNPV. Este cambio no fue detectado al comparar el sitio activo de las quitinasas de las cepas de SfNPV de este estudio, con el sitio activo de las quitinasas de los baculovirus de *Spodoptera littoralis* (SpliNPV) reportado por Yasser *et al.* (2021) o con las quitinasas de BmNPV (GenBank NCBI [AGX01202.1](#)) o AcMNPV (GenBank NCBI [AKN58976.1](#)).

Si bien las mutaciones detectadas en el sitio activo de las quitinasas de SfNPV podrían tener algún efecto en la degradación de quitina, es reconocible que dichos cambios fueron entre aminoácidos hidrofóbicos. Sin embargo, dicho cambio podría inducir alteraciones en el sitio activo afectando la unión enzima-sustrato según lo dispuesto por Baumann y Zerbe (2024), quienes mencionan que los cambios de LEU por ISO alteran la exposición de las cadenas, ya que la presencia de LEU propicia una mayor interacción entre zonas hidrofóbicas, estabilizando las alfa-hélices, al contrario de la presencia de ISO. Al presentar un cambio de LEU por ISO en el sitio activo, las cepas de SfNPV aquí analizadas, podrían presentar una menor exposición del sitio activo y presentar menor estabilidad según lo dispuesto por Baumann y Zerbe (2024). Lo anterior afectaría la afinidad de la enzima por el sustrato de una manera aun incierta.

Al realizar el análisis filogenético de las quitinasas de las cepas SfNPV-Ar, SfNPV-Fx, SfNPV-Ho, SfNPV-Sin y SfNPV-An1, se observó que estas se clasificaron en un clado junto a las secuencias de quitinasas de otras cepas con actividad hacia *S. frugiperda*, soportadas por valores sólidos de bootstraps. Asimismo, al observar el clado donde se posicionaron los *Betabaculovirus*, se observó que las quitinasas de estos virus mantenían una relación filogenética con SpliNPV, SINPV, LeseNPV, ChinNPV y ChchNPV similar a lo observado por Salvador *et al.* (2014). Las quitinasas de los baculovirus que no son específicos hacia *S. frugiperda*, pero que presentan actividad contra esta plaga, como AcMNPV y PxNPV (Jiménez-Hernández *et al.*, 2022), se ubicaron en un clado alejado de las cepas aisladas del gusano cogollero del maíz. En el presente estudio, al incluir la quitinasa de *Metarhizium rileyi* y *S. frugiperda*, se observaron relaciones filogenéticas de estas con las quitinasas de los baculovirus, lo cual guarda similitud con lo observado por Hughes y Friedman (2003), así como lo observado por Wang *et al.* (2004), quienes observaron relaciones filogenéticas entre las quitinasas de bacterias, baculovirus, algunas especies de insectos y algunas especies de hongos, señalando una transferencia horizontal de el gen *chi* de las bacterias a los virus, así mismo, Daimon *et al.* (2005), propusieron que las quitinasas de los lepidópteros fueron adquiridas por transferencia horizontal sea de las bacterias a los insectos o bien de los baculovirus hacia los insectos. Una observación similar a lo anterior es lo expuesto por Salvador *et al.* (2014) quienes mediante un análisis filogenético determinaron que existen relación entre las quitinasas de baculovirus, lepidópteros y bacterias. Sin embargo, Oliveira *et al.* (2023) usando secuencias de diferentes quitinasas de bases de datos actualizadas y exclusivamente de la familia 18 de las glicosilhidrolasas, realizaron la filogenia de este gen y sus resultados sugirieron que los baculovirus adquirieron el gen de la quitinasa por un evento de transferencia horizontal de los insectos y no de las bacterias, sin embargo, dichos autores mencionan que esos resultados se deben

analizar a profundidad con un estudio encaminado a determinar el origen de la quitinasa de los baculovirus.

Finalmente, en la base de datos del sistema de predicción de interacciones (STRING) se detectó una similitud del 56% entre las quitinasas de SfNPV aquí analizadas y la quitinasa de *Serratia marcescens*. El sistema STRING a través de la integración de datos de información experimental y teórica determinó que la función de las quitinasas es la degradación de carbohidratos y quitina. Lo cual guarda similitud con la revisión hecha por Oliveira *et al.* (2023), quienes mencionaron que dicha enzima es esencial para controlar la degradación de quitina en múltiples especies incluidos los baculovirus. La enzima de *S. marcescens* detectada en el sistema STRING, presentó 9 aa menos que las quitinasas de las cepas SfNPV-Ar, SfNPV-Fx y SfNPV-Sin, 4 aa menos que la quitinasa de SfNPV-Ho y 1 aa menos que la quitinasa de SfNPV-An1. Esto se relaciona con lo observado en la filogenia de las quitinasas presentado en este estudio, donde la quitinasa de *S. marcescens* guardó similitud con las quitinasas de los baculovirus, fenómeno que habla de una posible transferencia horizontal de genes (Hughes y Friedman, 2003; Wang *et al.*, 2004; Salvador *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2023). Debido a estas similitudes, las quitinasas de los baculovirus podrían ser usadas como agente fungicida o insecticida, ya que la quitinasa de AcMNPV ha demostrado actividad fungicida (Corrado *et al.*, 2008) y junto a la quitinasa de KnNPV (Wang *et al.*, 2013) han sido evaluadas para el control de plagas agrícolas con resultados prometedores.

5. Conclusión

Al analizar las proteínas presentes en los CO y VDO de siete cepas de baculovirus aisladas de *S. frugiperda* se observó que las cepas con mayor virulencia mostraron un menor número de proteínas comparadas con las cepas menos virulentas. Asimismo, se detectaron dos posibles mecanismos de virulencia en las cepas más efectivas para el control de *S. frugiperda*, el primero fue la presencia de proteasas en la cepa SfNPV-Ar y el segundo fue la actividad quitinolítica en las cepas SfNPV-Ar, SfNPV-An2 y SfNPV-Gto. Se identificaron *in silico* mutaciones que afectaron el sitio activo de todas las quitinasas de SfNPV y se detectó que la cepa SfNPV-Ho, carece del péptido de retención para el retículo endoplásmico. Se observó una relación entre las quitinasas de las cepas de baculovirus aisladas de *S. frugiperda* del presente estudio con otras quitinasas de SfNPV reportadas, pero no una relación con la zona geográfica de donde se aislaron. Finalmente, por medio de predicción de interacciones de proteínas se relacionó a las quitinasas de las SfNPV-Ar, SfNPV-Fx, SfNPV-Ho, SfNPV-Sin y SfNPV-An1, con la degradación de quitina. Estos resultados demuestran que las diferentes cepas de baculovirus aisladas de SfNPV, no solo muestran diferencias en patogenicidad, sino que también muestran diferencias en cuanto a proteínas asociadas al CO de una manera única inherente a cada cepa. La composición de las proteínas de los VDO y asociadas al CO puede afectar el proceso de interacción con el organismo susceptible (*S. frugiperda*), por lo que la identificación de las dichas proteínas,

así como la estimación de su actividad enzimática y el efecto de las mutaciones detectadas, ayudaría a dilucidar los mecanismos que favorecen la virulencia de estas cepas. De esta manera con bases moleculares se promueven alternativas sustentables para el control de plagas agrícolas y con su uso en la agricultura, favoreciendo una mayor inocuidad en la producción de maíz.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por el financiamiento no. 140615 para la realización de este proyecto y por las becas de posdoctorado otorgadas a JCRN 2007194 y MABH 425798.

Contribuciones de los autores

Jonatan C. Rangel-Núñez: Conceptualización, metodología, validación, análisis formal, preparación del borrador original, investigación, software, curación de datos, administración del proyecto, visualización. **Ma. de los Angeles Bivián-Hernández:** Metodología, análisis formal, visualización, investigación, software. **Ma. Cristina Del Rincón-Castro:** Conceptualización, redacción-revisión y edición, supervisión, administración del proyecto, obtención del financiamiento.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Referencias

- Barreto, M.R., Guimaraes, C.T., Teixeira, F.F., Paiva, E. and Valicente, F.H., 2005. Effect of Baculovirus *Spodoptera* isolates in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and their characterization by RAPD. Neotrop. Entomol. 34(1). <https://doi.org/10.1590/s1519-566x2005000100010>
- Baumann, C. and Zerbe, O., 2024. The role of leucine and isoleucine in tuning the hydrophathy of class A GPCRs. Proteins: Struct. Funct. Bioinf. 92(1). <https://doi.org/10.1002/prot.26559>
- Boogaard, B., Van Lent, J.W.M., Theilmann, D.A., Erlandson, M.A. and van Oers, M. M., 2017. Baculoviruses require an intact ODV entry-complex to resist proteolytic degradation

of per os infectivity factors by co-occluded proteases from the larval host. J. Gen. Virol. 98(12). <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000974>

Boogaard, B., van Oers, M.M. and van Lent, J.W.M., 2018. An advanced view on Baculovirus *per Os* infectivity factors. Insects 9(3). <https://doi.org/10.3390/insects9030084>

Chimweta, M., Nyakudya, I.W., Jimu, L. and Bray Mashingaidze, A., 2020. Fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)] damage in maize: management options for flood-recession cropping smallholder farmers. Int. J. Pest Manag. 66(2). <https://doi.org/10.1080/09670874.2019.1577514>

Daimon, T., Katsuma, S., Iwanaga, M., Kang, W. K., and Shimada, T., 2005. The BmChi-h gene, a bacterial-type chitinase gene of *Bombyx mori*, encodes a functional exochitinase that plays a role in the chitin degradation during the molting process. Insect Biochem. Mol. Biol. 35(10), 1112–1123. <https://doi.org/10.1016/J.IBMB.2005.05.005>

Daimon, T., Katsuma, S., Kang, W.K. and Shimada, T., 2007. Functional characterization of chitinase from *Cydia pomonella* granulovirus. Arch. Virol. 152(9). <https://doi.org/10.1007/s00705-007-1000-7>

Donly, B.C., Kaplanoglu, E., Theilmann, D.A., Baldwin, D., Sieminska, E., Hegedus, D.D. and Erlandson, M.A., 2016. MacoNPV baculovirus midgut-specific gene expression during infection of the bertha armyworm, *Mamestra configurata*. Virology. 499. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.09.001>

Donly, B.C., Theilmann, D.A., Hegedus, D.D., Baldwin, D. and Erlandson, M.A., 2014. *Mamestra configurata* nucleopolyhedrovirus-A transcriptome from infected host midgut. Virus Genes. 48(1). <https://doi.org/10.1007/s11262-013-0986-z>

Escribano, A., Williams, T., Goulson, D., Cave, R.D., Chapman, J.W. and Caballero, P., 1999. Selection of a nucleopolyhedrovirus for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): Structural, genetic, and biological comparison of four isolates from the Americas. J. Econ. Entomol. 92(5). <https://doi.org/10.1093/jee/92.5.1079>

Fang, M., Nie, Y., Harris, S., Erlandson, M.A. and Theilmann, D.A., 2009. *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus Core Gene ac96 Encodes a Per Os Infectivity Factor (*pif-4*). J. Virol. 83(23). <https://doi.org/10.1128/jvi.01141-09>

Franco-Ramírez, A. C., Rangel-Núñez, J. C., Bivián-Hernández, M. de los Á., Lomelí-Flores, J. R. and Rincón-Castro, M.C. Del. 2026. Characterization of a highly mexican virulent strain of baculovirus against fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Mex. J. Biotechnol. 11(1). <https://doi.org/10.29267/mxjb.2026.11.1.1-20>

Gomi, S., Majima, K. and Maeda, S., 1999. Sequence analysis of the genome of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. J. Gen. Virol. 80(5). <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-5-1323>

Guo, Z.J., Yu, M.H., Dong, X.Y., Wang, W.L., Tian, T., Yu, X.Y. and Tang, X.D., 2017. Protein composition analysis of polyhedra matrix of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) showed powerful capacity of polyhedra to encapsulate foreign proteins. Sci. Rep. 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08987-8>

Hallgren, J., Tsigirigos, K.D., Damgaard Pedersen, M., Juan, J., Armenteros, A., Marcatili, P., Nielsen, H., Krogh, A., and Winther, O., 2022. DeepTMHMM predicts alpha and beta transmembrane proteins using deep neural networks. BioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2022.04.08.487609>

Harrison, R.L., Sparks, W.O. and Bonning, B.C., 2010. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ODV-E56 envelope protein is required for oral infectivity and can be substituted functionally by *Rachiplusia ou* multiple nucleopolyhedrovirus ODV-E56. J. Gen. Virol. 91(5). <https://doi.org/10.1099/vir.0.017160-0>

Hashimoto, Y., Corsaro, B.G. and Granados, R.R., 1991. Location and nucleotide sequence of the gene encoding the viral enhancing factor of the *Trichoplusia ni* granulosis virus. J. Gen. Virol. 72(11). <https://doi.org/10.1099/0022-1317-72-11-2645>

Hawtin, R.E., Zarkowska, T., Arnold, K., Thomas, C.J., Gooday, G.W., King, L.A., Kuzio, J.A. and Possee, R.D., 1997. Liquefaction of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes. Virology. 238(2). <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8816>

Hoang, D.T., Chernomor, O., Von Haeseler, A., Minh, B.Q. and Vinh, L.S., 2018. UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation. Mol. Biol. Evol. 35(2). <https://doi.org/10.1093/molbev/msx281>

Horikoshi, R.J., Bernardi, D., Bernardi, O., Malaquias, J.B., Okuma, D.M., Miraldo, L.L., De Amaral, F.S.A.E. and Omoto, C., 2016. Effective dominance of resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt maize and cotton varieties: Implications for resistance management. Sci. Rep. 6. <https://doi.org/10.1038/srep34864>

Hou, D., Chen, X. and Zhang, L.K., 2016. Proteomic analysis of *Mamestra brassicae* nucleopolyhedrovirus progeny virions from two different hosts. PLoS ONE, 11(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153365>

Hou, D., Zhang, L., Deng, F., Fang, W., Wang, R., Liu, X., Guo, L., Rayner, S., Chen, X., Wang, H. and Hu, Z., 2013. Comparative Proteomics Reveal Fundamental Structural and

Functional Differences between the Two Progeny Phenotypes of a Baculovirus. J. Virol. 87(2). <https://doi.org/10.1128/jvi.02329-12>

Hughes, A. L., Friedman, R., 2003. Genome-wide survey for genes horizontally transferred from cellular organisms to baculoviruses. Mol. Biol. Evol. 20(6). <https://doi.org/10.1093/molbev/msg107>

Ishimwe, E., Hodgson, J.J., Clem, R.J. and Passarelli, A.L., 2015. Reaching the melting point: Degradative enzymes and protease inhibitors involved in baculovirus infection and dissemination. Virology. (Vols. 479–480). <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.01.027>

Jehle, J.A., Blissard, G.W., Bonning, B.C., Cory, J.S., Herniou, E.A., Rohrmann, G.F., Theilmann, D.A., Thiem, S.M. and Vlak, J.M., 2006. On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. Arch. Virol. 151(7). <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0763-6>

Jiménez-Hernández, S.Y., Rangel-Núñez, J.C., Ibarra, J.E. and Del Rincón-Castro, M.C., 2022. Biological, morphological, and molecular characterization of the baculovirus PlxyMNPV_LBIV-11, and its virulence towards *Plutella xylostella*, *Trichoplusia ni*, and *Spodoptera frugiperda* larvae. Arch. Microbiol. 204(10). <https://doi.org/10.1007/s00203-022-03222-z>

Joe, S. and Sarojini, S., 2017. An Efficient Method of Production of Colloidal Chitin for Enumeration of Chitinase Producing Bacteria. Mapana J. Sci. 16(4). <https://doi.org/10.12723/mjs.43.4>

Kalyaanamoorthy, S., Minh, B.Q., Wong, T.K.F., Von Haeseler, A. and Jermin, L.S., 2017. ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. Nat. Methods. 14(6). <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>

Kikhno, I., Gutiérrez, S., Croizier, L., Crozier, G. and López Ferber, M., 2002. Characterization of *pif*, a gene required for the *per os* infectivity of *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus. J. Gen. Virol. 83 (12). <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-12-3013>

Kuzio, J., Jaques, R. and Faulkner, P., 1989. Identification of *p74*, a gene essential for virulence of baculovirus occlusion bodies. Virology. 173(2). [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(89\)90593-X](https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90593-X)

Liu, J., Zhu, L., Zhang, S., Deng, Z., Huang, Z., Yuan, M., Wu, W. and Yang, K., 2016. The *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus *ac110* gene encodes a new *per os* infectivity factor. Virus Research. 221. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.05.017>

Liu, T., Wang, J., Hu, X. and Feng, J., 2020. Land-use change drives present and future distributions of Fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Sci. Total Environ.* 706. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135872>

Liu, X., Chen, K., Cai, K. and Yao, Q., 2009. Determination of protein composition and host-derived proteins of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus by 2-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Intervirology.* 51(5). <https://doi.org/10.1159/000193462>

Marina, A., Prado, C. and Villamizar, F., 2010. Identification and Characterization of Native Nucleopolyhedrovirus of *Spodoptera Frugiperda* in Colombia. *Rev. Fac. Nac. Agron.* 63(2).

Minh, B.Q., Schmidt, H.A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M.D., Von Haeseler, A., Lanfear, R. and Teeling, E., 2020. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Mol. Biol. Evol.* 37(5). <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>

Nie, Y., Fang, M., Erlandson, M.A. and Theilmann, D.A., 2012. Analysis of the *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus Overlapping Gene Pair *lef3* and *ac68* Reveals that AC68 Is a *Per Os* Infectivity Factor and that LEF3 Is Critical, but Not Essential, for Virus Replication. *J. Virol.* 86(7). <https://doi.org/10.1128/jvi.06849-11>

Ohkawa, T., Washburn, J. O., Sitapara, R., Sid, E. and Volkman, L.E., 2005. Specific Binding of *Autographa californica* M Nucleopolyhedrovirus Occlusion-Derived Virus to Midgut Cells of *Heliothis virescens* Larvae Is Mediated by Products of *pif* Genes *Ac119* and *Ac022* but Not by *Ac115*. *J. Virol.* 79(24). <https://doi.org/10.1128/jvi.79.24.15258-15264.2005>

Oliveira, E.G. de, Filho, C.A., da, C. and Rodrigues, R.A.L., (2023). An overview of viral chitinases: General properties and biotechnological potential. *Exp. Biol. Med.* 248 (22). <https://doi.org/10.1177/15353702231208408>

Ordóñez-García, M., Rios-Velasco, C., Ornelas-Paz, J. de J., Bustillos-Rodríguez, J.C., Acosta-Muñiz, C.H., Berlanga-Reyes, D.I., Salas-Marina, M.Á., Cambero-Campos, O.J. and Gallegos-Morales, G., 2020. Molecular and Morphological characterization of multiple nucleopolyhedrovirus from Mexico and their insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Appl. Entomol.* 144(1–2). <https://doi.org/10.1111/jen.12715>

Perera, O., Green, T.B., Stevens, S.M., White, S. and Becnel, J.J., 2007. Proteins Associated with *Culex nigripalpus* Nucleopolyhedrovirus Occluded Virions. *J. Virol.* 81(9). <https://doi.org/10.1128/jvi.02391-06>

Pijlman, G.P., Pruijssers, A.J.P. and Vlak, J.M., 2003. Identification of *pif-2*, a third conserved baculovirus gene required for *per os* infection of insects. J. Gen. Virol. 84(8). <https://doi.org/10.1099/vir.0.19133-0>

Pradeep, G.C., Yoo, H.Y., Cho, S.S., Choi, Y.H. and Yoo, J.C., 2015. An Extracellular Chitinase from *Streptomyces* sp. CS147 Releases N-acetyl-d-glucosamine (GlcNAc) as Principal Product. Appl. Biochem. Biotechnol. 175(1). <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1267-6>

Rangel-Núñez, J.C., Vázquez-Ramírez, M.F. and Del Rincón-Castro, M.C., 2014. Caracterización biológica y molecular de cepas exóticas de Baculovirus SfNPV, con actividad bioinsecticida hacia una población mexicana del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuidae). Interciencia. 39(5), 320–326. <https://www.redalyc.org/pdf/339/33930879005.pdf>

Rangel-Núñez, J.C., Ibarra, J.E. and Del Rincón-Castro, M.C., 2023. Transcriptomics and interactomics during the primary infection of an SfNPV baculovirus on *Spodoptera frugiperda* larvae. Front. Cell. Infect. Microbiol. 13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1291433>

Rios-Velasco, C., Gallegos-Morales, G., Rincón-Castro, M.C. Del, Cerna-Chávez, E., Sánchez-Pea, S.R. and Siller, M.C., 2011. Insecticidal activity of native isolates of *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus from soil samples in Mexico. Fla. Entomol. 94(3). <https://doi.org/10.1653/024.094.0346>

Rohrmann, G., 2019. Baculovirus Molecular Biology 4th Edition. In Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US) (Issue Md).

Rubinstein, R. and Poison, A., 1983. Midgut and viral associated proteases of *Heliothis armigera*. Intervirology. 19(1). <https://doi.org/10.1159/000149332>

Salvador, R., Ferrelli, M.L., Sciocco-Cap, A. and Romanowski, V., 2014. Analysis of a chitinase from EpapGV, a fast killing betabaculovirus. Virus Genes. 48(2). <https://doi.org/10.1007/s11262-013-1019-7>

Saville, G.P., Patmanidi, A.L., Possee, R.D. and King, L.A., 2004. Deletion of the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus chitinase KDEL motif and *in vitro* and *in vivo* analysis of the modified virus. J. Gen. Virol. 85(4). <https://doi.org/10.1099/vir.0.19732-0>

Song, J., Wang, X., Hou, D., Huang, H., Liu, X., Deng, F., Wang, H., Arif, B. M., Hu, Z. and Wang, M., 2016. The host specificities of baculovirus *per os* infectivity factors. PLoS ONE. 11(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159862>

- Vásquez, J., Zeddám, J.L. and Tresierra-Ayala, Á., 2006. Control biológico del “cogollero del maíz” *Spodoptera frugiperda*, (Lepidoptera; Noctuidae) con el baculovirus sfv_{pn}, en iquitos-Peru. Folia Amaz. 13(1–2). <https://doi.org/10.24841/fa.v13i1-2.132>
- Wang, H., Wu, D., Deng, F., Peng, H., Chen, X., Lauzon, H., Arif, B.M., Jehle, J.A. and Hu, Z., 2004. Characterization and phylogenetic analysis of the chitinase gene from the *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus. Virus Res. 100(2). <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2003.11.015>
- Wang, Q., Qu, L., Zhang, Z., Wang, Y. and Zhang, Y., 2013. Characterization of a novel chitinase, DkChi, from *Dendrolimus kikuchii* nucleopolyhedrovirus. Arch. Virol. 158(12). <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1775-7>
- Wang, X.Y., Yu, H.Z., Geng, L., Xu, J.P., Yu, D., Zhang, S.Z., Ma, Y. and Fei, D.Q., 2016. Comparative transcriptome analysis of *Bombyx mori* (Lepidoptera) larval midgut response to BmNPV in susceptible and near-isogenic resistant strains. PLoS ONE. 11(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155341>
- Wood, H.A., 1980. Protease degradation of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus proteins. Virology. 103(2). [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(80\)90198-1](https://doi.org/10.1016/0042-6822(80)90198-1)
- Yasem de Romero, M.G., Romero, E.R., Sosa Gómez, D. and Willink, E., 2009. Evaluación de aislamientos de baculovirus para el control de *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (LEP.: NOCTUIDAE), plaga clave del maíz en el noroeste argentino. Rev. Ind. Agríc. Tucumán, 86(2), 7–15.
- Yasser, N., Salem, R., Alkhazindar, M., Abdelhamid, I.A., Ghozlan, S.A.S. and Elmenofy, W., 2021. Molecular cloning, protein expression, and regulatory mechanisms of the chitinase gene from *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus. Microbiol. Biotechnol. Lett. 49(3). <https://doi.org/10.48022/mbi.2104.04002>
- Zanella-Saenz, I., Herniou, E.A., Ibarra, J.E., Huerta-Arredondo, I.A. and Del Rincón-Castro, M.C., 2022. Virulence and genetic characterization of six baculovirus strains isolated from different populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Arch. Microbiol. 204(1). <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02722-8>
- Zhu, S., Wang, W., Wang, Y., Yuan, M. and Yang, K., 2013. The Baculovirus Core Gene ac83 Is Required for Nucleocapsid Assembly and Per Os Infectivity of *Autographa californica* Nucleopolyhedrovirus. J. Virol. 87(19). <https://doi.org/10.1128/jvi.01207-13>

Material suplementario

S1.- Distribución de las proteínas de los CO y VDO de las cepas SfNPV en álcali, extraídas bajo diferentes métodos.

Cepa	Proteínas totales Mét. 1/ Mét. 2/ Mét. 3	Rango de peso	Proteínas por rango de peso			Cepa	Proteínas totales Mét. 1/ Mét. 2/ Mét. 3	Rango de peso	Proteínas por rango de peso		
			Mét . 1	Mét . 2	Mét . 3				Mét . 1	Mét . 2	Mét . 3
SfNPV -Ar	9/ 12/ 8	Menor a 10 kDa	1	1	3	SfNPV- An1	21/ 9/ 9	Menor a 10 kDa	1	2	3
		De10 a 15 kDa	3	2	3			De10 a 15 kDa	7	5	4
		De 15 a 20 kDa	1	2	2			De 15 a 20 kDa	3	2	2
		De 20 a 25 kDa	2	3	-			De 20 a 25 kDa	5	-	-
		De 25 a 40 kDa	2	4	-			De 25 a 40 kDa	3	-	-
SfNPV -Fx	16/ 12/ 9	De 40 a 80 kDa	2	-	-	SfNPV- An2	13/ 15/ 8	De 40 a 80 kDa	2	-	-
		Menor a 10 kDa	-	2	1			Menor a 10 kDa	-	1	2
		De10 a 15 kDa	3	4	5			De10 a 15 kDa	3	4	4
		De 15 a 20 kDa	-	3	1			De 15 a 20 kDa	-	3	2
		De 20 a 25 kDa	5	1	2			De 20 a 25 kDa	4	3	-
SfNPV -Ho	14/ 12/ 7	De 25 a 40 kDa	3	2	-	SfNPV- Gto	11/ 7/ 7	De 25 a 40 kDa	4	4	-
		De 40 a 80 kDa	5	-	-			De 40 a 80 kDa	2	-	-
		Menor a 10 kDa	-	3	3			Menor a 10 kDa	-	1	1
		De10 a 15 kDa	3	4	4			De10 a 15 kDa	3	4	2
		De 15 a 20 kDa	-	2	-			De 15 a 20 kDa	-	2	1
SfNPV -Sin	17/ 12/ 11	De 20 a 25 kDa	5	1	-			De 20 a 25 kDa	3	-	3
		De 25 a 40 kDa	3	2	-			De 25 a 40 kDa	3	2	-
		De 40 a 80 kDa	3	-	-			De 40 a 80 kDa	2	-	-
		Menor a 10 kDa	-	2	3						
		De10 a 15 kDa	4	4	4						
		De 15 a 20 kDa	2	3	1						
		De 20 a 25 kDa	5	1	3						
		De 25 a 40 kDa	3	2	-						
		De 40 a 80 kDa	3	-	-						