Universidad ORT Uruguay
Facultad de Ingeniería

Detección y caracterización del virus *Turnip Yellows Virus* de la colza en Uruguay

Entregado como requisito para la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Jimena Delfino - 242441

Tutora: Astrid Agorio

2025

Declaración de Autoría

Yo, Jimena Delfino, declaro que el trabajo que se presenta en esta obra es de mi propia mano. Puedo asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizaba el Trabajo final de carrera;
- Cuando he consultado el trabajo publicado por otros, lo he atribuido con claridad;
- Cuando he citado obras de otros, he indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente mía;
- En la obra, he acusado recibo de las ayudas recibidas;
- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, he explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue contribuido por mí;
- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.

Jimena Delfino
10 de marzo, 2025

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mi tutora, Astrid Agorio, por la oportunidad de formar parte de este proyecto, por la orientación e invaluables aportes y por su dedicación, paciencia y confianza durante este proceso.

También agradecer a Horacio Silva y Esteban Hoffman, de Unicampo Uruguay, por proporcionar las muestras, sus aportes y por la confianza.

A los integrantes del Departamento de Biología Molecular del IIBCE por su apoyo, amabilidad y disposición a resolver dudas en todo momento.

A mis amigos, los de antes y los que llegaron con la carrera, por su apoyo, motivación y compañía durante toda la carrera.

Por último, agradecer especialmente a mi familia, por su impulso y apoyo incondicional durante esta y todas las etapas.

Resumen

El cultivo de colza (*Brassica napus*) se utiliza para la producción de aceite vegetal, biodiesel y alimento animal. A nivel mundial, ocupa el segundo lugar después del cultivo de soja en cuanto a la producción de semillas oleaginosas. En Uruguay, el cultivo de colza se posicionó entre los cultivos de importancia a nivel nacional (utilizado como cultivo de rotación en invierno). A pesar de su importancia económica, la producción de colza a nivel mundial no alcanza su máximo potencial de rendimiento y se considera que la infección por el virus *Turnip Yellows Virus* (TuYV) es una de las principales razones. En 2023, se reportó por primera vez la presencia de TuYV en una chacra del litoral oeste uruguayo. Dada la importancia de estudiar la incidencia del virus en el territorio, en este trabajo se buscó confirmar la infección por TuYV en plantas de colza con síntomas asociables a virosis por TuYV en distintas chacras del litoral oeste uruguayo, abarcando la zona de los departamentos de Paysandú y Río Negro.

Se confirmó la presencia de TuYV en 22 muestras de 4 cuatro chacras del litoral oeste uruguayo mediante RT-PCR, con validación por DAS-ELISA. Los resultados evidenciaron una amplia distribución del virus en la zona, detectándose tanto en plantas sintomáticas de la variedad *Phoenix CL* como asintomáticas de la variedad *Nuola 300*. Además, se obtuvieron y analizaron secuencias de fragmentos del genoma de TuYV correspondientes a las regiones codificantes para el dominio *readthrough* P3-P5 (RTD) y la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp). El análisis filogenético de estas secuencias reveló una alta variabilidad genética del virus dentro de las muestras provenientes de Uruguay, así como a nivel mundial. Un estudio de eventos de recombinación en las secuencias estudiadas brindó una explicación a esa gran variabilidad encontrada. Finalmente, se evaluaron alternativas para reducir los costos de detección del TuYV en el laboratorio con el fin de poder brindar una prestación a productores de colza en Uruguay.

Este trabajo representa un primer paso para el establecimiento de un sistema de monitoreo y diagnóstico del TuYV en Uruguay, fundamental para la toma de decisiones e implementación de estrategias de manejo que permitan minimizar las pérdidas ocasionadas por la presencia de TuYV en el país.

Palabras Clave

Turnip Yellows Virus; *Brassica napus*; colza; canola; Uruguay; RT-PCR; DAS-ELISA; filogenias.

Abreviaturas

BLAST	del inglés, *Basic Local Alignment Search Tool*
blastn	del inglés, *nucleotide BLAST*
blastp	del inglés, *protein BLAST*
DAS-ELISA	del inglés, *Double Antibody Sandwich - Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*
dNTPs	desoxirribonucleótidos trifosfatos
IIBCE	Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable
LAMP	del inglés, *Loop Mediated Isothermal Amplification*
NCBI	del inglés, *National Center for Biotechnology Information*
ORF	Marco de lectura abierto, del inglés, *Open Reading Frame*
QTL	del inglés, *Quantitative Trait Locus*
RdRp	ARN polimerasa dependiente de ARN
RTD	proteína *readthrough* P3-P5 del virus TuYV
RT-PCR	del inglés, *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*
Tm	Temperatura de *melting*
TuYV	*Turnip Yellows Virus*
UBQ	ubiquitina

Índice

1. Introducción 12
1.1. La Colza (*Brassica napus*) 12
1.2. El *Turnip Yellows Virus* (TuYV) 13
1.2.1. Organización genómica de TuYV 14
1.2.2. Transmisión de TuYV 15
1.2.3. Impacto del TuYV en la colza 16
1.2.4. Detección de TuYV 17
1.2.5. Estrategias de control de TuYV 18
1.3. Antecedentes de este trabajo 19
2. Objetivos 20
2.1. Objetivo general 20
2.2. Objetivos específicos 20
3. Metodología 21
3.1. Obtención de muestras 21
3.2. Extracción de ARN 21
3.2.1. Extracción de ARN mediante "Trizol casero" 21
3.2.2. Extracción de ARN mediante kit con columna 22
3.3. Evaluación de la calidad y cantidad de ARN 22
3.4. Retrotranscripción de ARN 22
3.5. PCR 22
3.6. Electroforesis en gel de agarosa 24
3.7. Secuenciación por método Sanger 24
3.8. Análisis bioinformático 25
3.8.1. Ensamblado de secuencias 25
3.8.2. Obtención de árboles filogenéticos 25
3.8.3. Análisis de recombinación de secuencias 26
3.9. Test serológico por DAS-ELISA 26
4. Resultados y discusión 27
4.1. Puesta a punto de la detección de TuYV mediante RT-PCR 27
4.1.1. Evaluación de juegos de cebadores para la amplificación de TuYV 27
4.1.2. Optimización de condiciones de PCR para la amplificación de TuYV 28

4.1.3. Evaluación de dos métodos de extracción de ARN 30
4.2. Detección de TuYV en muestras de colza del litoral oeste uruguayo.....34
4.2.1. Detección de TuYV mediante RT-PCR.....35
4.2.2. Detección de TuYV mediante DAS-ELISA.....38
4.2.3. Primera aproximación para la detección de TuYV mediante qPCR.....39
4.3. Estudio bioinformático de secuencias de RTD y RdRp.....41
4.3.1. Obtención de secuencias y ensamblado 41
4.3.2. Análisis filogenético con secuencias de RTD.....43
4.3.3. Análisis filogenético de RdRp 47
4.3.4. Análisis de recombinación de secuencias en RTD.....49
5. Análisis Económico 52
6. Discusión General 54
7. Conclusiones 57
8. Referencias bibliográficas.....58
9. Anexos 64
9.1. Anexo 1 – Secuencias utilizadas en los análisis filogenéticos 64

Índice de tablas

Tabla 1. Cebadores utilizados para amplificar ADNc de TuYV 23

Tabla 2. Ciclados de PCR utilizados con cada juego de cebadores utilizado 24

Tabla 3. Resumen de los resultados obtenidos para la detección de TuYV mediante RT-PCR en 22 muestras provenientes de chacras del litoral oeste uruguayo, utilizando tres juegos de cebadores específicos. 36

Tabla 4. Resumen de los resultados obtenidos para la detección de TuYV mediante DAS-ELISA en 22 muestras provenientes de chacras del litoral oeste uruguayo 39

Tabla 5. Fragmentos amplificados y secuenciados para obtener secuencias consenso de TuYV en muestras de colza provenientes de chacras del litoral oeste uruguayo. 42

Tabla 6. Secuencias de TuYV con mayor similitud a las secuencias consenso de TuYV obtenidas en este trabajo (obtenidas mediante BLAST). 43

Tabla 7. Porcentajes de identidad entre los tres eventos de recombinación identificados en las secuencias de TuYV provenientes de muestras de colza del litoral oeste uruguayo.....50

Tabla 8. Costo estimado para la detección de TuYV mediante RT-PCR.....52

Tabla 9. Secuencias de TuYV de la base de datos de NCBI, obtenidas mediante búsqueda por BLAST, utilizadas para la generación de árboles filogenéticos.....64

Índice de ilustraciones

Figura 1. Cultivo de colza (*Brassica napus*).....12

Figura 2. Producción mundial de semillas oleaginosas entre los años 1985 y 2022.....13

Figura 3. Micrografía electrónica de partículas virales de TuYV. 14

Figura 4. Representación del genoma de TuYV y sus ORF.....14

Figura 5. Esquema que representa la transmisión de TuYV en colza, a través de vectores áfidos. 15

Figura 6. *Myzus persicae*, el principal vector de TuYV.....16

Figura 7. Representación del genoma de TuYV, sus regiones codificantes y las regiones amplificadas por los juegos de cebadores TuYV_Juego1, TuYV_Juego2 y TuYV_Juego3....27

Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1,2% para visualizar los productos de RT-PCR realizadas con los juegos TuYV_Juego1 (A), TuYV_Juego2 (B) y TuYV_Juego3 (C), y juego UBQ como control interno para todos los casos. 28

Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1% para visualizar los productos de RT-PCR realizadas con TuYV_Juego1 a diferentes temperaturas de hibridación: 58°C (A), 60°C (B) y ciclado touchdown (C).....29

Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1% para visualizar los productos de RT-PCR realizadas con TuYV_Juego1 con diferentes enzimas polimerasa: Platinum™ Taq DNA Polymerase (A) y Platinum™ Multiplex PCR Master Mix (B).....30

Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% para evaluar la calidad de ARN extraído por dos métodos.....31

Figura 12. Espectro de absorbancia de diferentes muestras para evaluar la cantidad y calidad de ARN extraído por diferentes métodos. 32

Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 1% para visualizar los productos de RT-PCR realizadas con TuYV_Juego1 y UBQ en simultáneo sobre diferentes muestras. 33

Figura 14. Esquema resumen del *workflow* desarrollado para la detección de TuYV mediante RT-PCR. 33

Figura 15. Síntomas de virosis por TuYV presentes en chacras uruguayas en 2023. 34

Figura 16. Mapa de Uruguay en donde se indica la ubicación de las chacras muestreadas en este trabajo. 35

Figura 17. Esquema del workflow para la detección de TuYV mediante DAS-ELISA utilizando el kit *Loewe Biochemica GmbH Turnip Yellows Virus complete kit*. 38

Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 2% para visualizar los productos de RT-PCR realizadas con TuYV_Juego6 y el juego UBQ como control interno. 40

Figura 19. Representación del genoma de TuYV, las regiones amplificadas con cada juego de cebadores, y los fragmentos consenso obtenidos. 41

Figura 20. Árbol filogenético construido con el método Maximum Likelihood (bootstrap = 1000) a partir de alineamiento de secuencias nucleotídicas parciales de TuYV abarcando a la secuencia codificante para el dominio RTD y la proteína P3a. Figura generada con el programa FigTree v1.4.4. 44

Figura 21. Árbol filogenético construido con el método Maximum Likelihood (bootstrap = 1000) a partir del alineamiento de secuencias aminoacídicas de la proteína P3-P5 perteneciente a TuYV. Figura generada con el programa FigTree v1.4.4. 46

Figura 22. Árbol filogenético construido con el método Maximum Likelihood (bootstrap = 1000) a partir del alineamiento de secuencias aminoacídicas de la proteína P3a perteneciente al TuYV. Figura generada con el programa FigTree v1.4.4. 47

Figura 23. Árbol filogenético construido con el método Maximum Likelihood (bootstrap = 1000) a partir de alineamiento de secuencias nucleotídicas parciales de TuYV abarcando un fragmento de la secuencia codificante de RdRp. 48

Figura 24. Representación de los eventos de recombinación identificados en las secuencias de TuYV provenientes de muestras de colza del litoral oeste uruguayo.....49

1. Introducción

1.1. La Colza (*Brassica napus*)

La colza (*Brassica napus*) es una planta oleaginosa de alto valor económico perteneciente a la familia *Brassicaceae* (Figura 1). Se trata de una especie alotetraploide que surgió a partir de cruces entre *Brassica rapa* (nabo) y *Brassica oleracea* (repollo) [1, 2]. Se cultiva principalmente para la producción de aceite vegetal de consumo humano, alimento animal y materiales renovables para biodiésel y aplicaciones industriales [1, 3–5]; diferentes industrias, como la alimentaria, farmacéutica, cosmética o industrial, aprovechan todas sus partes (flores, semillas, hojas, tallos y raíces) [1].

Figura 1. Cultivo de colza (*Brassica napus*). Imagen extraída de [6].

El cultivo de colza ocupa el segundo lugar después del cultivo de soja en cuanto a la producción de semillas oleaginosas a nivel mundial (Figura 2) [1, 3, 7]. En 2023 se alcanzó una producción mundial de casi 92 millones de toneladas de semillas de colza, y se estima que el valor de importaciones y exportaciones mundiales fue de 17 y 15 mil millones de dólares, respectivamente [7].

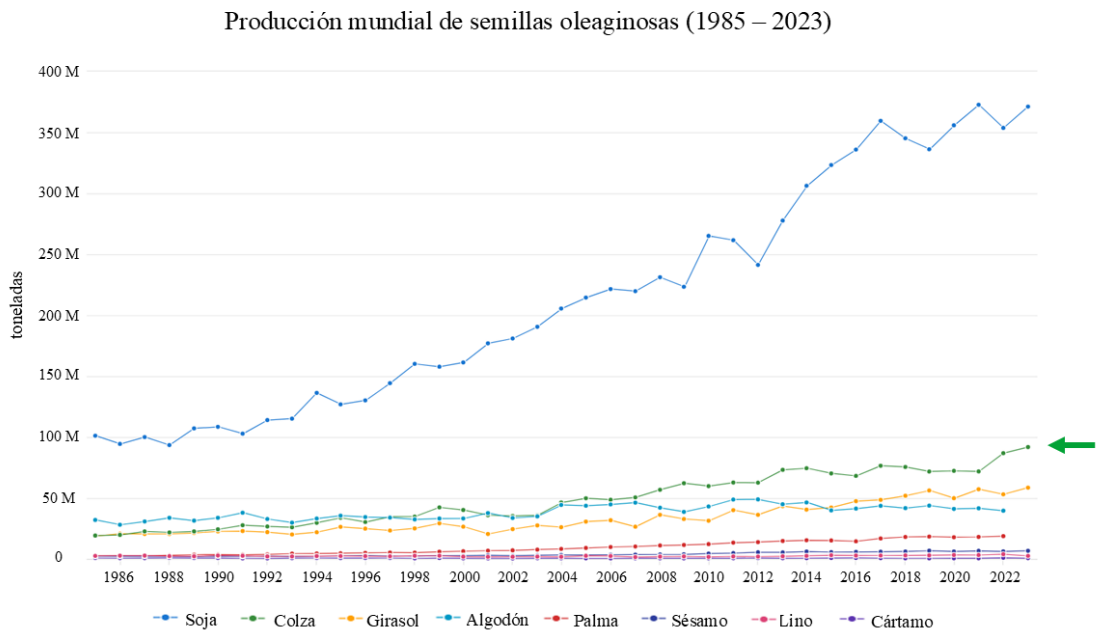

Figura 2. Producción mundial de semillas oleaginosas entre los años 1985 y 2022. Fuente: *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) [7].

Recientemente se incorporó el cultivo de colza como parte de la rotación de cultivos de invierno en Uruguay. Este cultivo comenzó a crecer en Uruguay a partir de 2010, principalmente por el impulso de Alcoholes del Uruguay (ALUR) que incorporó la colza para la producción de biodiésel [8]. La producción de colza nacional alcanzó su máximo histórico en la zafra 2022/23 cuando el área cultivada llegó a 348 mil hectáreas y se cosecharon 622 mil toneladas [9]. Sin embargo, durante las siguientes zafras el área sembrada se contrajo de forma importante debido a la caída de los precios del producto y la elección de otros cultivos de invierno en las rotaciones de cultivos [10, 11], alcanzando 184.500 hectáreas en el invierno de 2023 y 125.000 hectáreas en 2024 [12]. No obstante, en diciembre de 2024 la colza alcanzó su mayor precio en el mercado europeo desde agosto de 2022 (547 euros por tonelada) [13]. Se espera que esta alza en el precio impacte en la siembra de colza y que en 2025 se llegue a unas 250.000 hectáreas sembradas en Uruguay [14]. Más allá de las fluctuaciones, la colza se ha posicionado como un cultivo clave en la rotación de invierno en Uruguay.

1.2. El *Turnip Yellows Virus* (TuYV)

El *Turnip Yellows Virus* (TuYV) es un virus con genoma de ARN perteneciente al género *Polerovirus* de la familia *Solemoviridae* (anteriormente *Luteoviridae*) [15, 16]. Es un virus icosaédrico, sin envoltura, de 24-30 nm de diámetro, con 32 capsómeros por partícula (Figura 3) [17]. Se identificó por primera vez en 1970 en el Reino Unido como un aislado europeo del virus *Beet Western Yellows Virus* (BWYV) [18], y en 2002 fue reclasificado por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) como miembro de una especie diferente debido a las diferencias en su rango de hospedadores [19]. Tiene un amplio rango de hospedadores e infecta a más de 150 especies vegetales de 23 familias de dicotiledóneas, incluyendo cultivos de alta importancia económica como *Lactuca sativa* (lechuga), *Spinacea oleracea* (espinaca),

Cicer arietinum (garbanzo), *Raphanus sativus (rábano)* y múltiples especies de la familia *Brassicaceae* como *Brassica oleracea* (repollo) y *Brassica napus* (colza), siendo de particular interés como patógeno de esta última por su elevado valor económico a nivel mundial [20, 21].

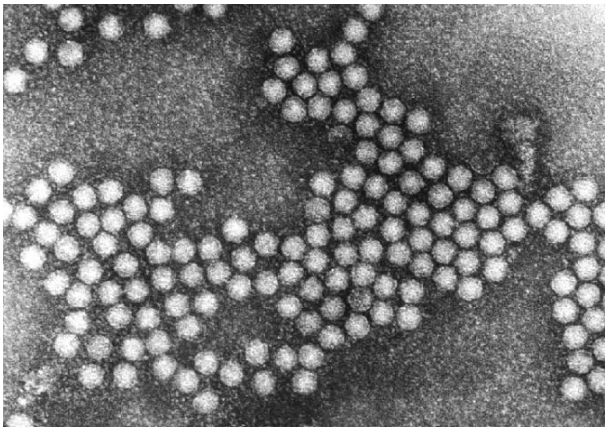

Figura 3. Micrografía electrónica de partículas virales de TuYV. Imagen extraída de [21].

1.2.1. Organización genómica de TuYV

El genoma de TuYV consiste de una molécula de ARN monocatenario de sentido positivo de aproximadamente 5,6 a 6 kb que codifica siete marcos de lectura abiertos (ORF) (Figura 4) [16, 17]. Los ORFs 0, 1 y 2 se localizan en el extremo 5' y se traducen directamente a partir del ARN genómico, se encuentran separados por una región intergénica de los ORFs 3, 3a, 4 y 5, que se encuentran en el extremo 3' y se expresan por la traducción del ARN subgenómico sgRNA1 [22, 23]. El ORF 0 codifica para la proteína P0, supresora del silenciamiento del huésped [16, 24, 25]. El ORF 1 codifica para la proteína P1, involucrada en la replicación viral [26], que junto con el ORF 2 codifican para la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), mediante la síntesis de una proteína de fusión P1-P2 [16, 24–26]. Los ORFs 3a y 4 codifican para las proteínas de movimiento P3a y P4 (MP), necesarias para el movimiento de larga distancia e intracelular, respectivamente [24]. La proteína P3, codificada por el ORF 3, es la proteína principal de la cápside (CP) [22, 26]. Por otro lado, la proteína menor de la cápside, proteína *readthrough* P3-P5 (RTD), se genera mediante un mecanismo de lectura continua que extiende la traducción más allá del codón de terminación de P3 hasta el ORF 5 [26]. P3-P5 es fundamental para la transmisión por áfidos, la acumulación viral y la propagación en la planta [16, 22].

Figura 4. Representación del genoma de TuYV y sus ORF. Figura adaptada de [22].

1.2.2. Transmisión de TuYV

El TuYV se transmite por vectores áfidos (pulgones) de manera persistente, circulativa y no propagativa. Es decir, una vez que el vector adquiere el TuYV al alimentarse de una planta infectada, lo retiene de por vida y lo propaga a plantas no infectadas cuando se alimenta de estas últimas, pero el virus no se replica dentro del mismo vector ni se transmite a su progenie (Figura 5) [15, 20, 25].

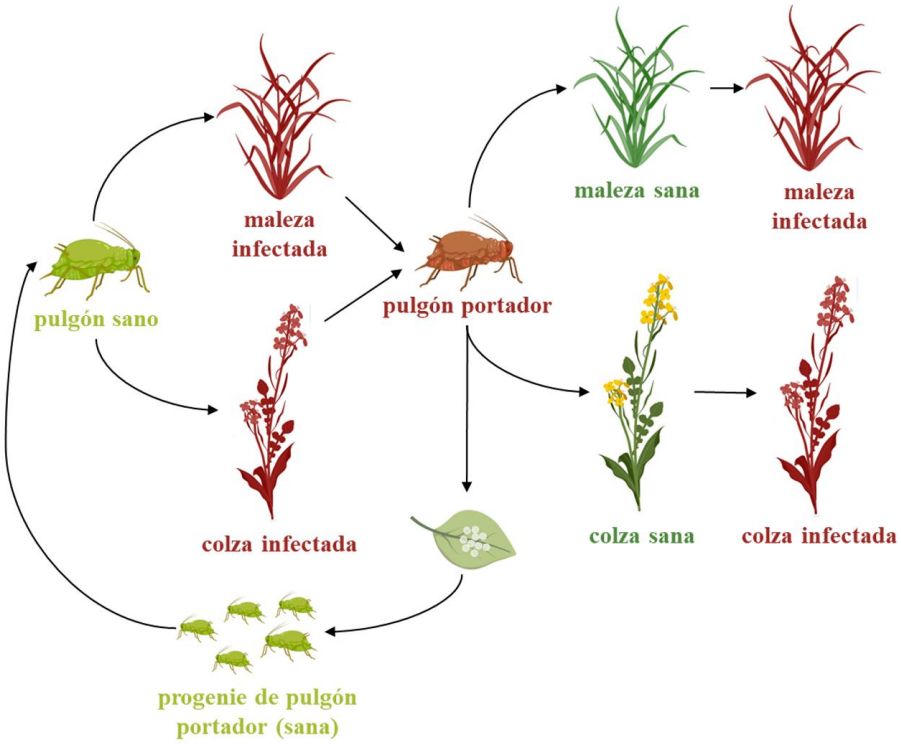

Figura 5. Esquema que representa la transmisión de TuYV en colza, a través de vectores áfidos. Ilustración generada utilizando la herramienta web Biorender (https://www.biorender.com/).

El principal vector de TuYV es *Myzus persicae*, el pulgón verde del duraznero (Figura 6), para el cual se ha reportado una eficiencia de transmisión de hasta 96,4% [27]. Otras especies de pulgones, como *Brevicoryne brassicae* (pulgón de la col), *Aphis gossypii* (pulgón del algodón) y *Macrosiphum euphorbiae* (pulgón verde de las solanáceas) también son vectores del TuYV, con menores tasas de transmisión (menos del 10%) [22]. Hay evidencia que sugiere que la infección por TuYV altera ciertas conductas y respuestas fisiológicas de los pulgones, como su comportamiento alimentario y preferencias de asentamiento, de modo que se favorece la transmisión del mismo. Específicamente, se ha demostrado cambios en la conducta de *M. persicae* que incluyen un mayor tiempo de ingesta de savia del floema y fases de trayectoria más cortas, facilitando la adquisición del virus. Se ha observado que estos cambios podrían estar relacionados a la sobreacumulación de un metabolito específico (M649T530) en las plantas infectadas [28].

Figura 6. *Myzus persicae*, el principal vector de TuYV. Imagen extraída de [29].

El TuYV no se puede transmitir por contacto o mecánicamente, y se cree que no es transmisible a través de semillas ya que al estar confinado al tejido vascular las partículas virales no podrían ingresar al óvulo [21]. No obstante, en un estudio desarrollado en 1999 se detectó TuYV en la pared de la vaina, el septo y la cubierta de semillas de colza en 2 de 78 embriones evaluados, indicando que ocasionalmente las partículas del virus podrían llegar al embrión [30].

El amplio rango de huéspedes de TuYV incluye cultivos de invierno y de verano, así como malezas, por lo que hay una gran cantidad de potenciales reservorios para el virus que pueden funcionar como fuente para futuros brotes virales [16, 22, 31]. Adicionalmente, *M. persicae* tiene una naturaleza altamente polífaga, aportando a la persistencia de TuYV fuera de las temporadas de crecimiento de colza y durante las rotaciones de cultivos [2]. De esta forma, hay una alta probabilidad de permanencia del virus a lo largo de las temporadas, lo cual es un factor a tomar en cuenta para el control de TuYV. Asimismo, muchas especies de malezas pueden permanecer asintomáticas y las infecciones pueden pasar desapercibidas, por lo que contribuyen a la propagación del virus sin ser detectado [21].

1.2.3. Impacto del TuYV en la colza

La infección por TuYV provoca síntomas como amarillamiento y enrojecimiento de las hojas, clorosis intervenal, coloración violácea o enrojecimiento de los márgenes de las hojas, malformaciones de las hojas y crecimiento atrofiado [2, 3, 24, 25]. El TuYV afecta negativamente a todos los componentes del rendimiento, incluyendo el número de vainas por planta, el número de semillas por vaina y el contenido de aceite por semilla [32]. Además, la infección por TuYV puede tener un impacto perjudicial sobre la composición de ácidos grasos en las semillas de colza, afectando la calidad de los aceites y harinas producidas con las mismas. Estos cambios en la composición pueden afectar la comerciabilidad de los productos si no cumplen con los requisitos exigidos por el mercado, provocando el virus pérdidas de ingresos y productividad para los productores [17].

El impacto de TuYV sobre el rendimiento del cultivo depende de las tasas de infección, el genotipo de colza y el momento de la infección [2]. Se ha reportado pérdidas de rendimiento por TuYV en cultivos de colza de 11 a 46%, así como reducción en la producción de semillas

por planta de 40% a 50% [3, 24]. Se prevé que el impacto de TuYV aumente como consecuencia del aumento en las temperaturas por el cambio climático [3]. Se ha evidenciado que las temperaturas elevadas pueden aumentar la susceptibilidad de la colza al virus, favorecer una mayor acumulación viral en las plantas infectadas y potenciar la actividad de los vectores, intensificando así la propagación de la enfermedad [3, 33].

La infección por TuYV se considera una de las enfermedades de colza más extendida y común en Europa [3], detectada en múltiples países incluyendo Francia, Alemania, Polonia, Ucrania, Austria, Dinamarca, Grecia, República Checa y Serbia, entre otros [5]. La diversidad de cultivos susceptibles a la infección por TuYV ha contribuido a su distribución a nivel mundial, habiéndose reportado la presencia de TuYV en múltiples países afuera de Europa, incluyendo Australia, China, Irán, India, Sudáfrica, Marruecos y Egipto [5, 22]. En Sudamérica se ha reportado solo en Colombia, Chile y Brasil [34–36]. La propagación global ha impactado en la producción de colza a nivel mundial. Se considera la infección por TuYV una de las principales razones por las que no alcanza su máximo potencial de rendimiento [2, 20, 32]. En el Reino Unido, por ejemplo, si bien el máximo potencial de rendimiento está estimado en 6,5 toneladas por hectárea [37], el rendimiento obtenido en los últimos 10 años no ha superado las 3,9 toneladas por hectárea [7]; se cree que TuYV es la principal causa.

En Uruguay, los rendimientos de la colza tampoco parecen alcanzar su máximo potencial. Mediante la Evaluación Nacional de Cultivares (ENC), que se lleva a cabo por un convenio entre INASE (Instituto Nacional de Semillas) e INIA (Instituto Nacional de Investigación Agraria), se determina el promedio del rendimiento en grano de los cultivos de colza de tipo invernal y primaveral anualmente. En los últimos años, se ha percibido un descenso en el rendimiento promedio de los cultivares tipo invernal. El rinde promedio anual de colza tipo invernal determinado en la ENC entre los años 2021 y 2024 fue de 3.364, 3.991, 2.419 y 2.570 kg ha^{-1}, respectivamente, notándose una caída muy importante en el año 2023 [38–41]. Durante estos años, los productores locales han observado la aparición recurrente de síntomas en el mes de agosto. Este fenómeno, localmente referido como el “mal de agosto”, fue atribuido a estrés abiótico. Sin embargo, la falta de efectividad de las medidas tomadas para mitigar el estrés abiótico, la recurrencia del “mal de agosto” y la importante caída en el rendimiento de los cultivos en el año 2023 levantó sospechas sobre la posibilidad de que hubiera otra causa. Se planteó la hipótesis de que la presencia del virus TuYV fuera la causa de los síntomas observados, la misma se debía validar mediante un diagnóstico certero.

1.2.4. Detección de TuYV

El diagnóstico de infección por TuYV es muy difícil de realizar basándose únicamente en síntomas visuales debido a que estos pueden confundirse fácilmente con síntomas relacionados a estrés abiótico, especialmente con síntomas asociados a deficiencia de nutrientes [2, 3, 25]. Dada esta similitud, la infección suele pasar desapercibida, por lo que es crucial contar con métodos de diagnóstico para confirmar la presencia del virus inequívocamente. Es de vital importancia poder atribuir síntomas asociables a virosis con la presencia del virus para poder tomar medidas acertadas que ayuden al manejo del cultivo.

Actualmente, los servicios de diagnóstico de laboratorio para la detección del TuYV en cultivos comerciales implican el análisis de muestras de hojas mediante RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) o métodos serológicos como ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) o TBIA (*Tissue Blot ImmunoAssay*) [42]. ELISA y TBIA son técnicas serológicas sensibles que permiten analizar un gran número de muestras simultáneamente mediante el uso de anticuerpos o kits disponibles comercialmente. Sin embargo, en ciertos casos pueden generar falsos positivos debido a reacciones inespecíficas o reactividad cruzada con factores presentes en las muestras. En contraste, la RT-PCR es un método molecular basado en cebadores específicos que suele ofrecer una mayor sensibilidad y confiabilidad para el diagnóstico de virus [43].

1.2.5. Estrategias de control de TuYV

Una estrategia de control efectiva del virus TuYV en colza es necesaria para mejorar los rendimientos del cultivo. En el pasado, dicho control se basaba principalmente en el uso de insecticidas dirigidos contra el vector, particularmente mediante el tratamiento de semillas [3]. Sin embargo, el uso excesivo y prolongado de estos productos no es efectivo ni sostenible debido al desarrollo de resistencia de los pulgones. De hecho, *M. persicae*, el vector principal de TuYV, ha desarrollado mecanismos de resistencia contra muchos de los insecticidas disponibles [15, 32]. Adicionalmente, el uso de los insecticidas más eficaces para el control de *M. persicae*, los neonicotinoides, se ha prohibido o restringido en la mayoría de las regiones productoras de colza debido a sus efectos perjudiciales sobre insectos polinizadores [15, 25, 32]. En Uruguay, si bien no se encuentran prohibidos, desde 2019 se exige receta profesional para autorizar la compraventa y uso de los insecticidas neonicotinoides [44]. Ante estas limitaciones, existe una creciente necesidad de implementar estrategias alternativas, como el desarrollo de genotipos resistentes, para reducir el uso de productos químicos ecológicamente dañinos a los que *M. persicae* ha desarrollado resistencia y minimizar el impacto de TuYV en la producción de colza [25, 32].

La resistencia genética es una de las estrategias más prometedoras para el control del virus TuYV en colza. El primer reporte de resistencia a TuYV se realizó en el año 1994, con la línea "R54" de *B. napus* desarrollada mediante el cruce entre *B. oleracea* y *B.rapa*, con esta última como donante de resistencia [25]. Esta resistencia está asociada a un único QTL dominante en el cromosoma A04 y proporciona resistencia parcial, reduciendo la carga viral en la planta [3, 25]. Por otro lado, en 2020 se identificó por primera vez una fuente de resistencia natural en colza, derivada de la variedad "Yudal" [3]. Si bien esta resistencia también se asocia con un QTL en el cromosoma A04, presenta diferencias con la de "R54". En particular, el QTL de "Yudal" contiene 1.096 loci adicionales que no co-segregan con el de "R54", lo que sugiere la presencia de posibles genes alternativos responsables de la resistencia. Además, análisis de marcadores indican que el origen de resistencia en "Yudal" es diferente del de "R54", ya que los marcadores co-segregantes en "R54" no están presentes en "Yudal" [3]. Por otra parte, recientemente se identificaron nuevas fuentes de resistencia a TuYV en *B. rapa* y *B. oleracea* que se han introgresado en *B. napus* mediante la generación de alotetraploides a través de

cruzamientos interespecíficos [2]. Esta es una estrategia prometedora ya que la diversidad genética de *B. napus* es limitada debido a su origen reciente y a la selección en programas de mejoramiento, lo que dificulta la generación de resistencia a enfermedades como TuYV [25]. Actualmente existen varias variedades comerciales de colza con resistencia parcial a TuYV. No obstante, la mayoría de ellas son derivadas de la línea "R54" y el uso exclusivo de esta fuente de resistencia podría generar una alta presión selectiva para el virus [32]. Frente a esta situación, es crucial identificar nuevas fuentes de resistencia para diversificar las estrategias de control, asegurar la durabilidad de la resistencia y reducir la presión selectiva.

En este contexto con pocas opciones de control disponible, es importante disponer de métodos de diagnóstico para poder prever y controlar la transmisión del virus. Asimismo, las prácticas agrícolas también tienen un gran impacto en el control efectivo de TuYV. Dado que el virus puede persistir en malezas y otros cultivos durante todo el año, su eliminación, junto con el control de los pulgones, son prácticas clave que pueden reducir significativamente la incidencia del TuYV [15, 16].

1.3. Antecedentes de este trabajo

En 2023, mediante una colaboración entre la empresa Unicampo Uruguay y el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), se detectó por primera vez en Uruguay la presencia del TuYV (https://unicampo.com.uy/2023/12/27/el-virus-turnip-yellow-virus-tuyv-de-la-colza-esta-en-uruguay-y-se-lo-puede-detectar/). Se trató de una chacra en el litoral oeste uruguayo. A raíz de este hallazgo, y dada la importancia de estudiar la incidencia y afectación del virus en el territorio, se planteó estudiar más plantas con síntomas de TuYV en más chacras de la zona. En este contexto se plantea el trabajo de esta tesis. Los resultados obtenidos de la misma serán de importancia para eventualmente establecer un sistema de vigilancia y diagnóstico para controlar la enfermedad y evitar las pérdidas económicas que podría significar para el país, siendo la colza un cultivo de alta importancia a nivel nacional.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Verificar si plantas de colza, provenientes de chacras del litoral oeste uruguayo, en las cuales se detectaron síntomas asociables a virosis por TuYV están infectadas por el virus TuYV.

2.2. Objetivos específicos

1. Determinar la presencia del virus TuYV en plantas de colza con síntomas asociables a virosis por TuYV mediante RT-PCR.

2. Obtener secuencias nucleotídicas de fragmentos del genoma de TuYV que contienen las regiones codificantes para el dominio *readthrough* P3-P5 y la polimerasa viral RdRp.

3. Realizar análisis filogenético de los fragmentos de genoma de TuYV secuenciados (en el objetivo 2) en relación a secuencias virales disponibles en bases de datos.

4. Obtener información que sirva para implementar un protocolo de bajo costo para la detección de TuYV en plantas de colza por RT-PCR, en el laboratorio del Departamento de Biología Molecular del IIBCE.

3. Metodología

3.1. Obtención de muestras

Las muestras de colza las proporcionó la empresa Unicampo Uruguay. Se trabajó con muestras de plantas provenientes de cultivos de colza de cuatro chacras del litoral oeste uruguayo, colectadas en la zafra 2023: siete plantas variedad *Phoenix CL* con síntomas de virosis provenientes de la chacra La Armonía (Paysandú, coordenadas: -32.0337139, -57.89684), cinco plantas variedad *Phoenix CL* con síntomas de virosis provenientes de la chacra Bichadero (Río Negro, coordenadas: -32.640178, -57.461587), cinco plantas variedad *Phoenix CL* con síntomas de virosis provenientes de la chacra Horqueta (Río Negro, coordenadas: -32.977245, -57.703312), y cinco plantas variedad *Nuola 300* sin síntomas de virosis provenientes de una chacra en Camino Los Paraísos (Río Negro, coordenadas: -32.628231, -57.482013). Las hojas muestreadas se enviaron al laboratorio en cadena de frío (con hielo). Las muestras se almacenaron en congelador a -20°C hasta su uso. Adicionalmente, se obtuvieron semillas de la variedad *Phoenix CL*, las cuales se cultivaron en el invernadero del IIBCE para obtener plantas control sin infección (control negativo); las muestras derivadas de las mismas se denominaron "Hojas Control".

3.2. Extracción de ARN

Para todas las extracciones de ARN se partió de muestras de hojas de plantas de colza congeladas previamente. Se trituraron las hojas con nitrógeno líquido con ayuda de mortero y pilón hasta conseguir un polvo fino, que se almacenó a -80°C hasta su uso. Se tomaron medidas para evitar posibles contaminaciones entre muestras: lavar y esterilizar los morteros cada vez y procesar muestras asintomáticas y sintomáticas en diferentes días.

3.2.1. Extracción de ARN mediante "Trizol casero"

La extracción de ARN utilizando Trizol casero (fenol 38%; tiocianato de guanidina 0,8 M; tiocianato de amonio 0,4 M; acetato de sodio 0,1 M; glicerol 5%) se realizó a partir de 50-100 mg del tejido triturado previamente, que se homogeneizó en 1 mL de "Trizol casero" con un émbolo cónico de plástico y ayuda de un taladro, luego se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente se agregaron 200 µl de cloroformo, se mezcló invirtiendo sucesivas veces durante 15 segundos y se dejó reposar 3 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugó a 12.000 g por 15 minutos a 4°C en la centrífuga refrigerada Sigma 3-30K. De las 3 fases formadas se transfirió la fase acuosa superior (que contiene el ARN) a otro tubo, se le añadió 0,5 mL de isopropanol e incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugó a 12.000 g por 10 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. El precipitado remanente se lavó con 1 mL de etanol 75% preparado con agua libre de RNAsas, luego se resuspendió con ayuda de un vortex y se centrifugó a 7.500 g por 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente. Luego se resuspendió en 50 µl de agua libre de RNAsas, se incubó por 15 minutos a 60°C en termobloque (Thermo Scientific

#88871003), y se centrifugó por 1 minuto a temperatura ambiente en la centrífuga *Sorvall Legend Micro 17 Centrifuge* (Thermo Scientific). Se tomó una alícuota de 10 µl para la posterior evaluación de calidad y cantidad del ARN obtenido, el resto del ARN se almacenó a -80°C hasta su uso.

3.2.2. Extracción de ARN mediante kit con columna

Para la extracción de ARN por columna se utilizó el kit *PureLink™ RNA Mini Kit* (Invitrogen #12183018A). Se realizaron las extracciones a partir de 50-100 mg de tejido triturado previamente y se siguió el protocolo del fabricante. Para cada extracción se preparó el buffer de lisis proporcionado en el kit adicionando ditiotreitol (DTT) como agente reductor a una concentración final de 40 mM. Al final de la extracción se tomó una alícuota de 10 µl para la posterior evaluación de calidad y cantidad del ARN obtenido, el resto del ARN se almacenó a -80°C hasta su uso.

3.3. Evaluación de la calidad y cantidad de ARN

Se cuantificó el ARN extraído en el equipo Nanodrop® 1000 3.7.1 (Thermo Scientific), obteniendo además el espectro de absorción y los coeficientes de absorbancia 260/280 y 260/230 para evaluar la pureza del ARN extraído. Adicionalmente, para valorar la calidad e integridad del ARN extraído se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% según las condiciones descritas en la sección 3.6.

3.4. Retrotranscripción de ARN

Una vez cuantificado el ARN extraído y verificado su integridad, se procedió con la retrotranscripción del mismo. Previamente se realizó un tratamiento con DNasa I (Thermo Scientific #EN0521) sobre 1 µg de ARN, siguiendo el protocolo del fabricante. Posteriormente se llevó a cabo la síntesis de ADNc utilizando el kit *RevertAid RT Reverse Transcription Kit* (Thermo Scientific #K1691) y hexámeros al azar (Invitrogen #100026484), siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.5. PCR

La detección de TuYV se realizó mediante PCR a tiempo final utilizando diferentes juegos de cebadores (Tabla 1) y ADNc obtenido según sección 3.4. Las secuencias de los cebadores se obtuvieron de la bibliografía [16, 45] o se diseñaron para este trabajo utilizando el programa Primer-BLAST del NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/).

Tabla 1. Cebadores utilizados para amplificar ADNc de TuYV

Fragmento	Nombre cebador	Secuencia (5' – 3')	Tm (°C)	Tamaño amplicón	Uso
TuYV_Juego1	TuYV3terF1 [16]	CCGGAGAAGGAAAACTCCGA	63,5	696 pb	Detección y secuenciado
	TuTV3terR1 [16]	TCGCCTCGTATCACTACCAAC	60,8		
TuYV_Juego2	TuYV_3rtpF [16]	AACCAACCTCAAGCACCACA	62,0	670 pb	Detección y secuenciado
	TuYVF6-AS [16]	TTTGACGACATAGCCTCTTC	56,4		
TuYV_Juego3	TuYV_5cpF [16]	ATCCAGCGTCCGTTGAACTT	61,2	797 pb	Detección y secuenciado
	TuYVR-K2_deg [16]	ATTGGTCCTCGGCAACGTCR	65,0		
TuYV_Juego6	TuYV_3823_Fwd	AAACTCCGGTTCCATCGCTT	61,7	158 pb	Secuenciado
	TuYVR-K2_deg [16]	ATTGGTCCTCGGCAACGTCR	65,0		
TuYV_Juego7	TuYV_3823_Fwd	AAACTCCGGTTCCATCGCTT	61,7	1224 pb	Secuenciado
	TuYVF6-AS [16]	TTTGACGACATAGCCTCTTC	56,4		
TuYV_Juego8	TuYV_3823_Fwd	AAACTCCGGTTCCATCGCTT	61,7	1708 pb	Secuenciado
	TuYV3terR1 [16]	TCGCCTCGTATCACTACCAAC	60,8		
TuYV_P3P5	TuYV_5cpF [16]	ATCCAGCGTCCGTTGAACTT	61,2	2326 pb	Secuenciado
	TuYV3terR1 [16]	TCGCCTCGTATCACTACCAAC	60,8		
TuYV_RdRp1	TuYV_RdRp_608F	GTCTTCTGTCTCGCCTTGCT	61,6	1300 pb	Secuenciado
	TuYV_RdRp_1898R	TTCCCCCAGCGTGATTCTTC	63,4		
TuYV_RdRp2	TuYV_RdRp_1716F	AAGACCCAACCGCAGAAGAG	62,8	1900 pb	Secuenciado
	TuYV_RdRp_3600R	CTTCGTCGTCGTCTAGGTCG	62,3		
TuYV_RdRp3	TuYV_RdRp_1880F	AAGAATCACGCTGGGGGAAG	63,2	977 pb	Secuenciado
	TuYV_RdRp_2856R	ACTTTTCTGAACGCCCGGAT	61,7		
UBQ	UBA_F [45]	TGGACATCCCAGTTTCAACA	59,5	238 pb	Control interno
	UBA_R [45]	CTGAAGGACGGCAAAGAAAG	59,0		

Las PCR se realizaron en una cabina de PCR previamente irradiada con luz UV durante 10 minutos. El ADNc a amplificar se adicionó a la mezcla en un laboratorio independiente utilizando una micropipeta designada específicamente para uso con ADNc, de modo de evitar contaminaciones con productos de PCR. El ADN se amplificó utilizando el termociclador ProFlex^{TM} Base (Applied Biosystems #4483636).

Las condiciones de PCR se pusieron a punto durante el desarrollo de este trabajo, en donde finalmente se definió utilizar la polimerasa *Platinum™ Taq DNA Polymerase* (Invitrogen #15966005) con las siguientes condiciones de reacción: 2 µl de PCR Buffer 10X, 0,6 µl de $MgCl_2$ 50 mM, 0,4 µl de dNTPs 10 mM (Invitrogen #18427088), 1 µl de cada juego de cebadores a utilizar (10 µM cada cebador), 0,15 µl de Taq Platinum (5 U/µl), 2 µl de ADNc y H_2O ultrapura para completar un volumen de 20 µl. Cuando la reacción de PCR se realizó con el objetivo de detectar la presencia de TuYV se utilizó en simultáneo con el juego de cebadores para detección de TuYV el juego de cebadores UBQ (control interno). Las condiciones de ciclados utilizados para cada juego de cebadores se muestran en la Tabla 2. Los productos de

PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1-2%, dependiendo del tamaño del amplicón esperado, según las condiciones descritas en la sección 3.6.

Tabla 2. Ciclados de PCR utilizados con cada juego de cebadores utilizado

Fragmento a amplificar	Ciclado
TuYV_Juego1	95°C 2 min; 40 ciclos (95°C 30s; 58°C 1 min; 72°C 1 min); 72°C 10 min
TuYV_Juego1 y UBQ	
TuYV_Juego2	
TuYV_Juego2 y UBQ	
TuYV_Juego3	
TuYV_Juego3 y UBQ	
TuYV_Juego6	95°C 2 min; 40 ciclos (95°C 30s; 58°C 1 min; 72°C 20s); 72°C 10 min
TuYV_Juego7	95°C 2 min; 40 ciclos (95°C 30s; 58°C 1 min; 72°C 1min 15s); 72°C 10 min
TuYV_Juego8	95°C 2 min; 40 ciclos (95°C 30s; 58°C 1 min; 72°C 1min 45s); 72°C 10 min
TuYV_P3P5	95°C 2 min; 40 ciclos (95°C 30s; 58°C 1 min; 72°C 2min 30s); 72°C 10 min
TuYV_RdRp1	95°C 2 min; 40 ciclos (95°C 30s; 58°C 1 min; 72°C 1min 20s); 72°C 10 min
TuYV_RdRp2	95°C 2 min; 40 ciclos (95°C 30s; 58°C 1 min; 72°C 2min); 72°C 10 min
TuYV_RdRp3	95°C 2 min; 40 ciclos (95°C 30s; 58°C 1 min; 72°C 1min); 72°C 10 min

3.6. Electroforesis en gel de agarosa

Se realizó la electroforesis en geles de agarosa (NZYtech #MB02702) al 1-2% en buffer TAE 1X (Tris 40 mM; ácido acético 20 mM; EDTA 1 mM) a un voltaje de 80 V, con bromuro de etidio (concentración final 0,75 µg/ml) para su visualización en un transiluminador UV (UVP Chromato-Vue Transilluminator Model C-63). Para determinar los tamaños y concentraciones de los diferentes productos se utilizaron los marcadores de peso molecular *Lambda DNA/PstI* (Thermo Scientific #ER0611), *Lambda DNA/HindIII Marker* (Thermo Scientific #SM0101) o *100 bp DNA Ladder* (Invitrogen #15628019). Para sembrar las muestras en el gel se utilizó el buffer de carga *6X DNA Gel Loading Dye* (Thermo Scientific #R0611) a una dilución final de 1X.

3.7. Secuenciación por método Sanger

Para confirmar la identidad de los productos de PCR obtenidos se realizó una secuenciación Sanger de los mismos. Para ello se realizaron PCR según las condiciones descritas en la sección 3.5. Luego se verificó la amplificación y concentración del producto mediante una electroforesis en gel de agarosa (por comparación con marcador de peso molecular) según lo descrito en la sección 3.6, para ello se sembró 2 µl del producto de PCR. El resto del producto de PCR se envió a Macrogen (Corea) para su secuenciación por método Sanger. Una vez obtenida la secuencia, su identidad se determinó utilizando la herramienta blastn del NCBI.

3.8. Análisis bioinformático

3.8.1. Ensamblado de secuencias

Para obtener la secuencia nucleotídica consenso de TuYV, correspondiente a cada muestra estudiada, se alineó y ensambló las secuencias Sanger obtenidas, a partir de diferentes RT-PCR de una muestra utilizando el programa QIAGEN CLC Main Workbench 24.0.1 (https://digitalinsights.qiagen.com/); se utilizó el genoma de referencia de TuYV con número de acceso del GenBank MT586594.1 [22], Por un lado se obtuvo una secuencia nucleotídica consenso que codifica para el dominio *readthrough* P3-P5 (RTD) y la proteína P3a, y por otra parte se obtuvo un fragmento de la secuencia nucleotídica que codifica para la polimerasa viral (RdRp). Adicionalmente se tradujo las secuencias consenso para obtener las secuencias proteicas correspondientes a las proteínas traducidas.

3.8.2. Obtención de árboles filogenéticos

Con las secuencias consenso provenientes de las diferentes muestras se realizó una búsqueda por homología en la base de datos del NCBI utilizando las herramientas blastn o blastp para las secuencias de nucleótidos o proteínas, respectivamente, y se descargaron las secuencias de TuYV que cubrieran al menos el 70% del *query* para nucleótidos y 90% del *query* para proteínas. Para la generación de los árboles filogenéticos se nombraron las secuencias de forma que incluyera el código del país (Uruguay: URY; Alemania: DEU; Australia: AUS; Brasil: BRA; Chile: CHL; China: CHN; Chipre: CYP; Colombia: COL; Corea del Sur: KOR; Eslovaquia: SVK; Estados Unidos: USA; Filipinas: PHL; Francia: FRA; Grecia: GRC; Italia: ITA; Japón: JPN; Reino Unido: GBR; República Checa: CZE; Sudáfrica: ZAF; Suecia: SWE; Turquía: TUR) y el año de obtención de la muestra en la que se detectó el virus secuenciado, siendo el código utilizado "AccesionNumber…CódigoPaís.Año". Luego se realizó un alineamiento utilizando el programa MEGA11: *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* versión 11.0.13 [46], con la herramienta MUSCLE. Se realinearon las secuencias y se limitó el análisis a la zona comprendida entre los cebadores de los extremos, de modo de garantizar que el análisis se realice únicamente con el fragmento de interés.

Se generaron los árboles filogenéticos con el programa CIPRES Science Gateway V3.3 (https://www.phylo.org/) [47], utilizando la herramienta *RAxML-HPC BlackBox (8.2.12)*: *Phylogenetic tree inference using maximum likelihood/rapid bootstrapping on XSEDE* [48]. Se ejecutaron 1000 réplicas de *bootstrap*, con estimación de la proporción de sitios invariables (GTRGAMMA + I). En la generación de árboles en base a secuencias aminoacídicas se utilizó la matriz de sustitución de proteínas LG. La visualización de los árboles se realizó utilizando el programa FigTree v1.4.4 (http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/).

3.8.3. Análisis de recombinación de secuencias

Se analizó la existencia de eventos de recombinación en el fragmento RTD de las secuencias obtenidas (provenientes de diferentes muestras de colza). Para ello se comparó las secuencias consenso obtenidas en este trabajo con las secuencias obtenidas de la base de datos del NCBI, utilizando el programa RDP4 (Recombination Detection Program v.4.101) [49] utilizando los parámetros establecidos por defecto en el programa.

3.9. Test serológico por DAS-ELISA

Para verificar los resultados de RT-PCR se realizó un estudio serológico mediante un DAS-ELISA (*Double Antibody Sandwich – Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Para ello se analizó la presencia de TuYV mediante el kit comercial *Loewe Biochemica GmbH Turnip Yellows Virus complete kit* (SKU: 07009C/096), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron los controles positivo y negativo provistos por el kit, así como la muestra "Hojas Control" perteneciente a la planta sembrada en el invernadero del IIBCE como un control negativo extra. El producto de reacción tras la DAS-ELISA se detectó por medición de absorbancia a una longitud de onda de 405 nm en el lector de placas *Thermo Scientific Varioskan® Flash*.

4. Resultados y discusión

4.1. Puesta a punto de la detección de TuYV mediante RT-PCR

Para poder detectar al virus TuYV en hojas de colza mediante RT-PCR, de forma confiable y robusta, fue necesario realizar una puesta a punto de la metodología a emplear en el laboratorio del Departamento de Biología Molecular del IIBCE. El proceso incluyó la puesta a punto de condiciones de PCR utilizando diferentes juegos de cebadores obtenidos de la bibliografía, diferentes Taq polimerasas y la evaluación de diferentes métodos de extracción de ARN.

4.1.1. Evaluación de juegos de cebadores para la amplificación de TuYV

En primer lugar se evaluó la eficiencia de diferentes juegos de cebadores que permiten amplificar diferentes zonas del genoma del virus TuYV: TuYV_Juego1, TuYV_Juego2 y TuYV_Juego3, según las condiciones de PCR reportadas por Slavíková et al. en 2022 [16], utilizando la enzima *Platinum™ Taq DNA Polymerase*. En la Figura 7 se muestra un esquema que ilustra la posición de los fragmentos a amplificar con cada juego de cebadores en referencia al genoma de TuYV. Los tres juegos permiten amplificar diferentes zonas de la región codificante del dominio *readthrough* P3-P5 (RTD) y la proteína P3a. Adicionalmente, se incluyó un control positivo interno en la PCR diseñada para detectar TuYV, para ello se incorporó el juego de cebadores UBQ que permite detectar la expresión de la ubiquitina de colza (un gen *housekeeping*). De esta forma, la amplificación de UBQ, en simultáneo con la amplificación de un fragmento de TuYV, sirve como control de no degradación del ADNc y de ausencia de inhibición en la PCR.

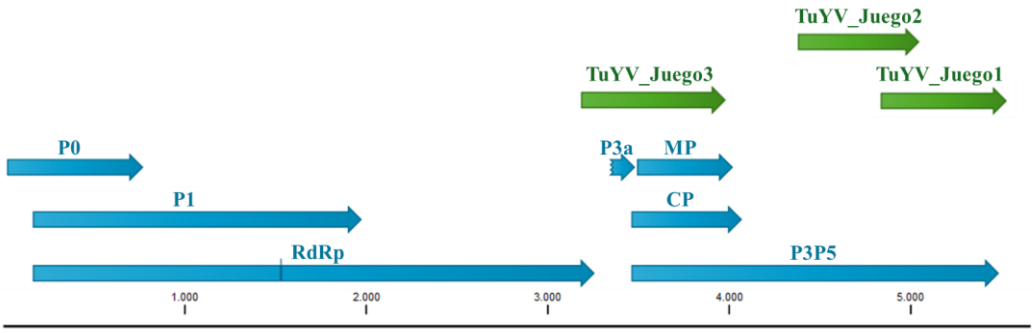

Figura 7. Representación del genoma de TuYV, sus regiones codificantes y las regiones amplificadas por los juegos de cebadores TuYV_Juego1, TuYV_Juego2 y TuYV_Juego3. Flechas azules indican las regiones codificantes: P0: proteína codificada por ORF 0; P1: Proteína codificada por ORF 1; RdRp: polimerasa de ARN dependiente de ARN, codificada por los ORF 1 y 2; P3a: proteína codificada por ORF 3a; MP: proteína de movimiento codificada por ORF 4; CP: proteína principal de la cápside, codificada por ORF 3; P3P5: proteína menor de la cápside, codificada por los ORF 3 y 5. Flechas verdes indican las regiones amplificadas por los juegos de cebadores utilizados para detectar TuYV. Figura generada con el programa CLC Main Workbench 24.0.1.

Para la puesta a punto se utilizaron dos muestras de colza provenientes de la chacra La Armonía, A1 y A3. Las mismas corresponden a las muestras utilizadas en el primer reporte de presencia de TuYV en Uruguay (realizada en 2023 por Unicampo Uruguay y el IIBCE). En la Figura 8 se encuentran las electroforesis en gel de agarosa con los resultados de RT-PCR utilizando los tres juegos de cebadores estudiados (TuYV_Juego1, TuYV_Juego2 y TuYV_Juego3) y ADNc de las muestras A1 y A3, así como de la muestra "Hojas Control" (control negativo). En la misma se evidencia la diferencia en el desempeño de los tres juegos de cebadores. Por un lado, se observa que con los juegos de cebadores TuYV_Juego1 y TuYV_Juego3 se logró amplificar fragmentos del tamaño esperado (696 pb y 797 pb, respectivamente) en las muestras A1 y A3. Por otro lado, si bien con el TuYV_Juego2 se obtuvo un fragmento del tamaño esperado (670 pb) para la muestra A1, no se obtuvo el fragmento esperado para la muestra A3 (la cual mostró ser positiva para TuYV utilizando los juegos de cebadores TuYV_Juego1 y TuYV_Juego3). Cabe destacar que UBQ se amplificó correctamente en todas las muestras, por lo que se descarta la posibilidad de una degradación del ADNc o inhibición de la reacción. Además, no se obtuvo amplificación para el control negativo "Hojas control" con ninguno de los juegos de cebadores utilizados, lo que confirma la ausencia amplificación inespecífica (sin generación de falsos positivos) o contaminación. De esta forma, la ausencia de amplificado para A3 con TuYV_Juego2 pudo deberse a que este juego de cebadores no detecta ciertas variantes virales debido a polimorfismos en la zona de hibridación de los cebadores, lo cual se debe estudiar en mayor profundidad. Ante estos resultados se decidió priorizar la detección de TuYV con los pares de cebadores TuYV_Juego1 y TuYV_Juego3, sin descartar el uso de TuYV_Juego2.

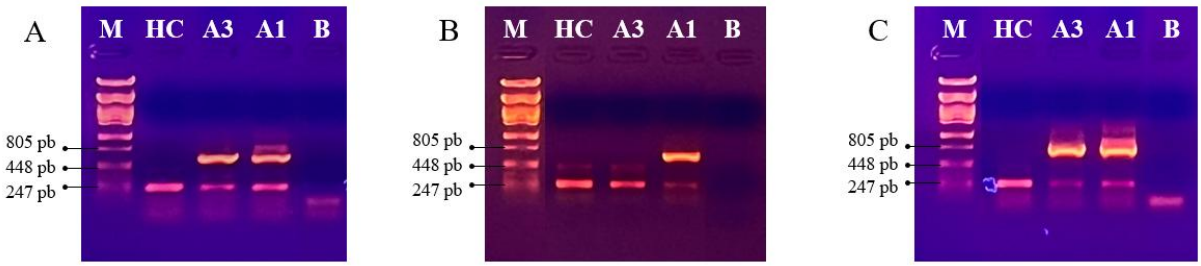

Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1,2% para visualizar los productos de RT-PCR realizadas con los juegos TuYV_Juego1 (A), TuYV_Juego2 (B) y TuYV_Juego3 (C), y juego UBQ como control interno para todos los casos. M: Marcador de peso molecular Lambda/PstI. HC: "Hojas Control". A1 y A3: Plantas 1 y 3 de la chacra La Armonía, respectivamente. B: Blanco.

4.1.2. Optimización de condiciones de PCR para la amplificación de TuYV

Otro aspecto a evaluar en la puesta a punto de la detección de TuYV fue las condiciones específicas de la reacción de PCR para la amplificación de los fragmentos del genoma viral. Se evaluaron condiciones de PCR que permitieran optimizar la amplificación de fragmentos del genoma viral, esto incluye el número de ciclos de amplificación, la temperatura de hibridación de cebadores y la polimerasa a utilizar.

Lo primero que se modificó respecto a lo reportado por Slavíková et al. [16] fue el número de ciclos. Se decidió aumentar de 30 a 40 el mismo, con el fin de optimizar la detección en casos de baja carga viral.

En cuanto a las temperaturas de hibridación, Slavíková y colaboradores [16] reportan utilizar una temperatura de 60°C. Se decidió realizar pruebas para evaluar dos temperaturas diferentes, 58°C y 60°C, teniendo en cuenta las temperaturas de melting (Tm) de los cebadores a utilizar (Tabla 1), utilizando el siguiente ciclado: 95°C 2 minutos; 40 ciclos (95°C 30s; 58°C o 60°C 1 min; 72°C 40s); 72°C 10 min. Con ambas temperaturas se logró amplificar el ADNc del virus, con la diferencia que al utilizar la temperatura de 58°C las bandas presentaron una mayor intensidad, permitiendo obtener unos resultados más claros visualmente. También se evaluó la alternativa de utilizar un ciclado *touchdown*, en el cual al disminuir gradualmente la temperatura de hibridación a medida que avanzan los ciclos se busca evitar la amplificación de ADN inespecíficamente o disminuir la formación de dímeros de cebadores en los primeros ciclos, a la vez que posteriormente se baja la temperatura para aumentar la probabilidad de hibridación de los cebadores. El ciclado *touchdown* utilizado fue el siguiente: 95°C 2 minutos; 2 ciclos (95°C 30s; 60°C 1 min; 72°C 40s); 2 ciclos (95°C 30s; 58°C 1 min; 72°C 40s); 36 ciclos (95°C 30s; 55°C 1 min; 72°C 40s); 72°C 10 min. Con este ciclado se obtuvieron algunas bandas inespecíficas y en algunos casos se vio un *smear* significativo, dificultando la interpretación de los resultados. En la Figura 9 se muestra ejemplos de los resultados obtenidos para las diferentes condiciones al utilizar el juego de cebadores TuYV_Juego1 para una muestra negativa ("Hojas Control") y una positiva (A1). Frente a estos resultados se decidió descartar este ciclado *touchdown* y mantener 58°C como la temperatura de hibridación de los cebadores para la detección de TuYV por RT-PCR.

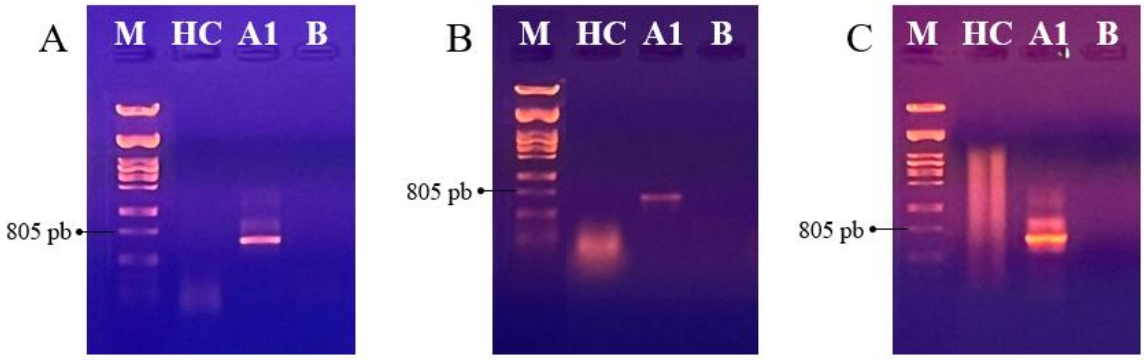

Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1% para visualizar los productos de RT-PCR realizadas con TuYV_Juego1 a diferentes temperaturas de hibridación: 58°C (A), 60°C (B) y ciclado touchdown (C). M = Marcador de peso molecular Lambda/PstI. HC: "Hojas Control". A1: Planta 1 de la chacra La Armonía. B: Blanco.

Como opción para mejorar la eficiencia de las PCR se decidió evaluar el desempeño de la enzima *Platinum™ Multiplex PCR Master Mix* (Applied Biosystems #4464268), una polimerasa diseñada para reacciones múltiplex, como alternativa a la Taq Platinum. En la Figura 10 se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos al realizar la amplificación con TuYV_Juego1 y UBQ en simultáneo bajo las mismas condiciones con las diferentes

polimerasas. Se observó que con la polimerasa Platinum Multiplex, si bien se obtuvieron bandas de mayor nitidez e intensidad para el control interno, también se obtuvo una amplificación menos específica, ya que se observó bandas adicionales a las esperadas para TuYV_Juego1 y UBQ. Teniendo en cuenta estos resultados, y que la polimerasa Platinum Multiplex es significativamente más costosa, se decidió continuar con la polimerasa Taq Platinum para la detección del TuYV.

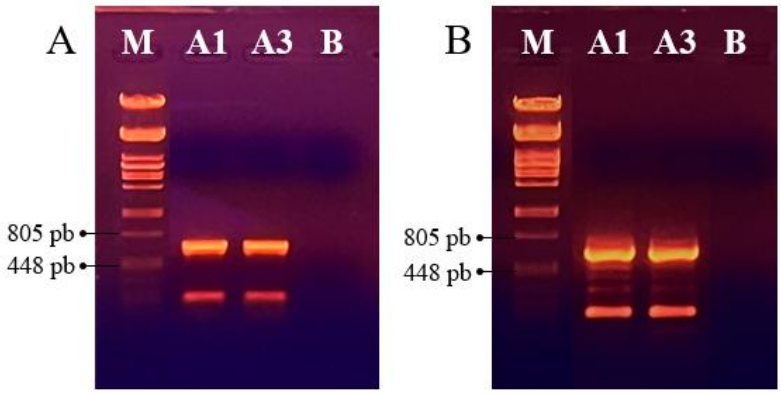

Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1% para visualizar los productos de RT-PCR realizadas con TuYV_Juego1 con diferentes enzimas polimerasa: Platinum™ Taq DNA Polymerase (A) y Platinum™ Multiplex PCR Master Mix (B). M = Marcador de peso molecular Lambda/PstI. A1 y A3: Plantas 1 y 3 de la chacra La Armonía, respectivamente. B: Blanco.

4.1.3. Evaluación de dos métodos de extracción de ARN

Durante la puesta a punto se utilizó como método de extracción de ARN el kit *PureLink™ RNA Mini Kit* de Invitrogen, basado en columnas de silica. Considerando el alto volumen de muestras a manejar a lo largo del proyecto propuesto, con el objetivo de reducir los costos de la detección de TuYV, se decidió evaluar el método de "Trizol casero", basado en una extracción con fenol e isotiocianato de guanidinio, como alternativa. Para ello, se probó ambos métodos de extracción para dos muestras y se comparó la cantidad, calidad e integridad del ARN obtenido mediante las técnicas de electroforesis en gel de agarosa y de Nanodrop. Una extracción de ARN de alta calidad es de suma importancia para los siguientes pasos en el proceso del diagnóstico, ya que no solo se requiere obtener una cantidad suficiente de ARN que permita la detección del virus, sino que también debe asegurarse la integridad del ARN y evitar contaminantes que puedan interferir con las posteriores reacciones (retrotranscripción y PCR).

En la Figura 11 se muestra un gel de agarosa en donde se compara los ARN extraídos por los diferentes métodos para dos muestras de hojas de colza. Para que los productos de extracción sean comparables, se partió de cantidades similares de tejido para cada muestra: para las extracciones con "Trizol casero" se partió de 47 mg de tejido de A1 y 54 mg de A3, y para las extracciones con kit se partió de 59 mg y 58 mg, respectivamente. Se puede observar que la extracción con kit produjo bandas menos intensas que la extracción con "Trizol casero", pero presenta una menor cantidad de bandas adicionales de menor peso molecular. Adicionalmente,

la mayor nitidez de las bandas correspondientes a los ARN ribosomales 18S y 28S para la extracción con kit puede ser indicador de una purificación con mayor integridad del ARN.

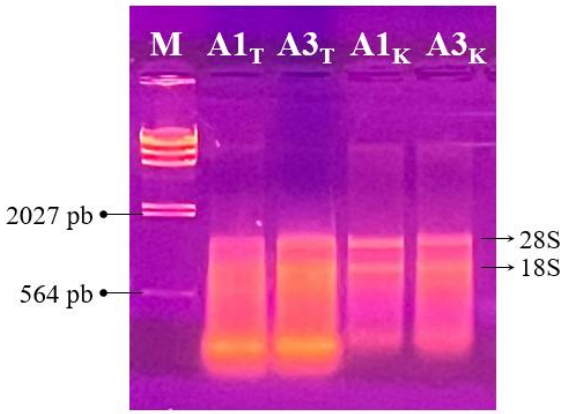

Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% para evaluar la calidad de ARN extraído por dos métodos. M: Marcador de peso molecular *Lambda DNA/HindIII*. $A1_T$ y $A3_T$: ARN extraído con método de "Trizol casero" de las plantas 1 y 3 de la chacra La Armonía. $A1_K$ y $A3_K$: ARN extraído con método de kit *PureLink*™ *RNA Mini Kit* de las plantas 1 y 3 de la chacra La Armonía.

Adicionalmente, en la Figura 12 se encuentra el espectro de absorbancia obtenido con el Nanodrop para las mismas muestras, y se puede ver que los resultados obtenidos concuerdan con lo evidenciado en la electroforesis en gel de agarosa. Por un lado, las concentraciones de las muestras de extracción con "Trizol casero" fueron significativamente mayores que las de extraídas con kit, lo cual explica las diferencias en la intensidad de las bandas en el gel de la Figura 11. Por otro lado, a pesar de obtener una concentración mayor en las extracciones con "Trizol casero", los perfiles de las muestras extraídas con kit se ajustan más a lo esperado para un ARN con menor cantidad de contaminantes. Los coeficientes 260/280 y 260/230 reflejan la relación entre el ácido nucleico y los contaminantes proteicos u orgánicos, respectivamente, que puedan haber quedado durante la purificación. Un coeficiente 260/280 de aproximadamente 2,0 es generalmente aceptado como de alta pureza para ARN en cuanto a ausencia de proteínas, mientras que una relación considerablemente menor puede indicar la presencia de proteínas, fenol u otros contaminantes con absorbancia a 280 nm. Por otro lado, el coeficiente 260/230 tiene un valor esperado en el rango de 1,8-2,2 para un ácido nucleico con alta pureza, y valores menores indican la posible contaminación por compuestos orgánicos o contaminantes con un pico de absorbancia a 230 nm [50]. De este modo, en un espectro de absorbancia típico para una extracción de ARN se espera un pico pronunciado a 260 nm, sin presencia de picos a 280 nm ni 230 nm. Al comparar los métodos de extracción realizados sobre las plantas 1 y 3 de la chacra La Armonía, se observó diferencias en la pureza del ARN obtenido para cada planta. Los valores de 260/280 fueron similares en todas las muestras, con pequeñas variaciones entre las extracciones con "Trizol casero" (2,04 en ambas plantas) y con kit (2,11 en la planta 1 y 2,16 en la planta 3), indicando que con ambos métodos se obtuvo un ARN relativamente puro en términos de contaminación por proteínas. Por otra parte, entre los coeficientes 260/230 se encontraron diferencias más marcadas. Para la planta 1, el ARN extraído con "Trizol casero" presentó un valor de 260/230 de 1,35, mientras que con el kit descendió a 0,73, indicando una mayor presencia de contaminantes orgánicos en esta última.

En la planta 3, el ARN extraído con “Trizol casero” tuvo un coeficiente 260/230 de 0,39, mientras que con el kit alcanzó un valor de 1,64, sugiriendo una mejor calidad del ARN obtenido con este último. Entre las muestras evaluadas, la extracción con kit de la planta 3 de la chacra La Armonía (representada en la parte D de la Figura 12) sería la que mejor cumple con los requisitos de pureza, aunque idealmente no debería presentar el pico a 230 nm.

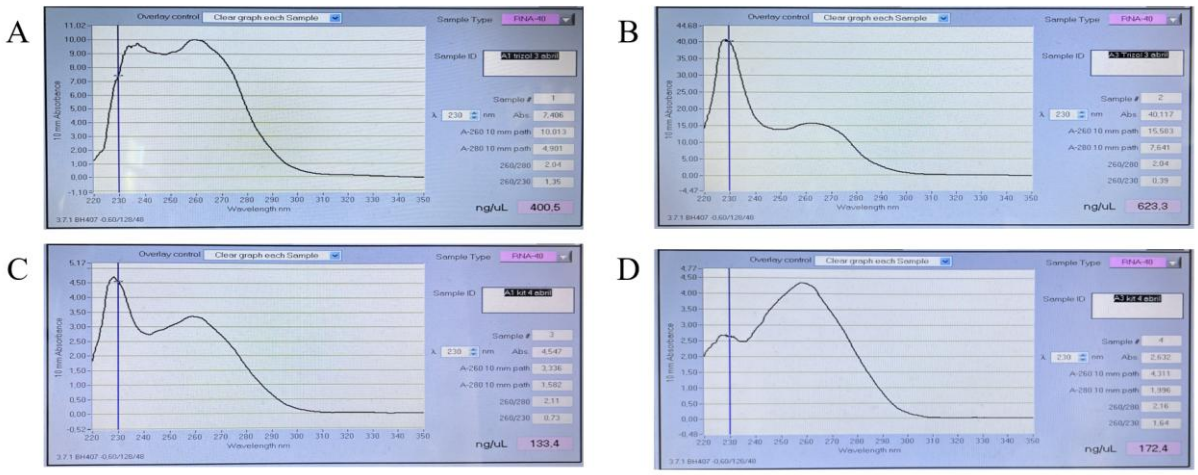

Figura 12. Espectro de absorbancia de diferentes muestras para evaluar la cantidad y calidad de ARN extraído por diferentes métodos. A y B: ARN extraído por método de Trizol casero de las plantas 1 y 3 de La Armonía, respectivamente. C y D: ARN extraído por método de kit *PureLink*™ *RNA Mini Kit* de las plantas 1 y 3 de La Armonía, respectivamente

Si bien la extracción con kit tuvo un mejor desempeño de acuerdo a los resultados hasta este punto, se decidió comprobar el desempeño de las muestras extraídas por los diferentes métodos en una RT-PCR dirigida a detectar TuYV. De este modo se comparó los resultados de RT-PCR sobre muestras de ARN extraídas con ambos métodos, utilizando en simultáneo un juego de cebadores para detectar TuYV (TuYV_Juego1) y uno para detectar ubiquitina de colza (UBQ) como control interno, de forma de determinar la integridad del material a lo largo del proceso. En la Figura 13 se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos al comparar ambos métodos y se observa que al utilizar las muestras extraídas con “Trizol casero” en una de ellas no se logró detectar la UBQ, mientras que para la misma muestra extraída con kit sí se detectó la UBQ. Esta diferencia podría deberse a la degradación del ARN en el proceso, o a una inhibición generada por contaminantes en las muestras extraídas con Trizol. Si bien este resultado podría deberse a un caso particular, otras RT-PCR de muestras extraídas con “Trizol casero” también tuvieron un peor desempeño que las muestras extraídas con kit.

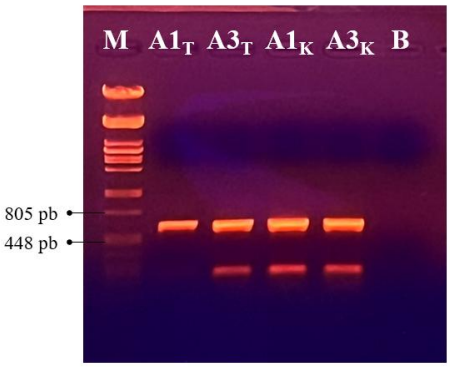

Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 1% para visualizar los productos de RT-PCR realizadas con TuYV_Juego1 y UBQ en simultáneo sobre diferentes muestras. M: Marcador de peso molecular *Lambda/PstI*. $A1_T$ y $A3_T$: RT-PCR del ARN extraído con Trizol de las plantas 1 y 2 de La Armonía. $A1_K$ y $A3_K$: RT-PCR del ARN extraído con kit de las plantas 1 y 2 de La Armonía. B: Blanco.

Frente a los resultados obtenidos se decidió utilizar el kit *PureLink™ RNA Mini Kit* como método para la extracción de ARN para la detección de TuYV en hojas de colza, ya que se obtuvo ARN de una calidad algo mejor y se demostró que en la RT-PCR tiene un mejor desempeño que muestras extraídas por el método de "Trizol casero".

En la Figura 14 se muestra un esquema del flujo de trabajo (*workflow*) a seguir para la detección de TuYV mediante RT-PCR, en base al método de RT-PCR establecido: extracción de ARN de hojas con el kit *PureLink™ RNA Mini Kit*; cuantificación con Nanodrop; tratamiento con DNasa I sobre 1 µg de ARN; retrotranscripción con hexámeros al azar; tres PCR independientes realizadas con Taq Platinum y los pares de cebadores TuYV_Juego1, TuYV_Juego2 o TuYV_Juego3, en los tres casos con juego de cebadores para amplificar la UBQ en simultáneo y utilizando el siguiente ciclado: 95°C 2 minutos; 40 ciclos (95°C, 30s; 58°C, 1 min; 72°C 1 min); 72°C 10 min; visualización del producto de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2%; y demostración de la presencia del TuYV en las muestras de resultado positivo mediante secuenciación Sanger.

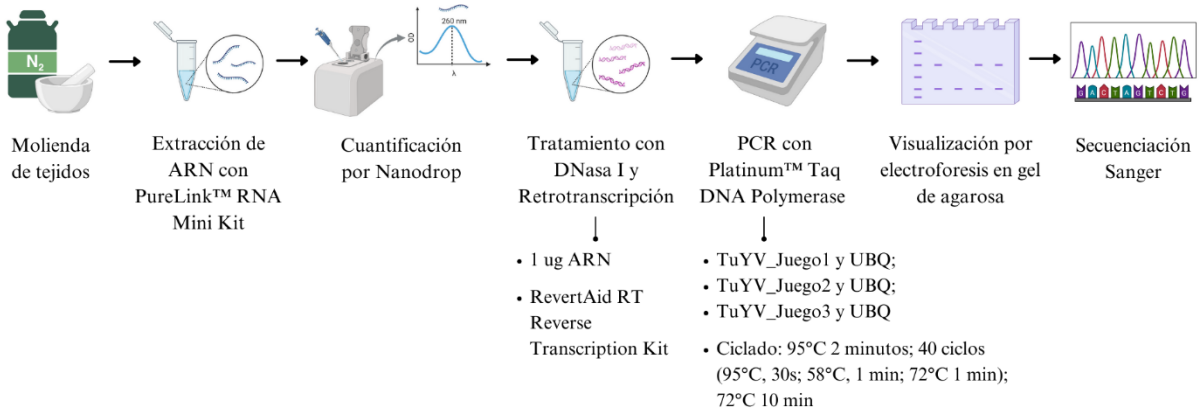

Figura 14. Esquema resumen del *workflow* desarrollado para la detección de TuYV mediante RT-PCR. Ilustración generada utilizando la herramienta web Biorender (https://www.biorender.com/)

4.2. Detección de TuYV en muestras de colza del litoral oeste uruguayo

Se analizaron 22 plantas con y sin síntomas de virosis procedentes de cuatro chacras del litoral oeste uruguayo, colectadas en la zafra 2023. En la Figura 15 se muestran ejemplos de los síntomas observados en las plantas analizadas. Se analizaron siete plantas de la variedad invernal *Phoenix CL* con síntomas de virosis provenientes de la chacra La Armonía (A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7), cinco plantas de la variedad *Phoenix CL* con síntomas de virosis provenientes de la chacra Bichadero (B2, B3, B4, B6, B7), cinco plantas de la variedad *Phoenix CL* con síntomas de virosis provenientes de la chacra Horqueta (H1, H2, H3, H4, H5), y cinco plantas de la variedad primaveral *Nuola 300* sin síntomas de virosis provenientes de una chacra en Camino Los Paraísos (S1, S2, S3, S4, S5). En la Figura 16 se muestra un mapa con la ubicación de las cuatro chacras. Adicionalmente, se analizaron las "Hojas Control" de plantas sembradas en el invernadero del IIBCE, como control de que muestras sin infección no resultaran positivas (falsos positivos).

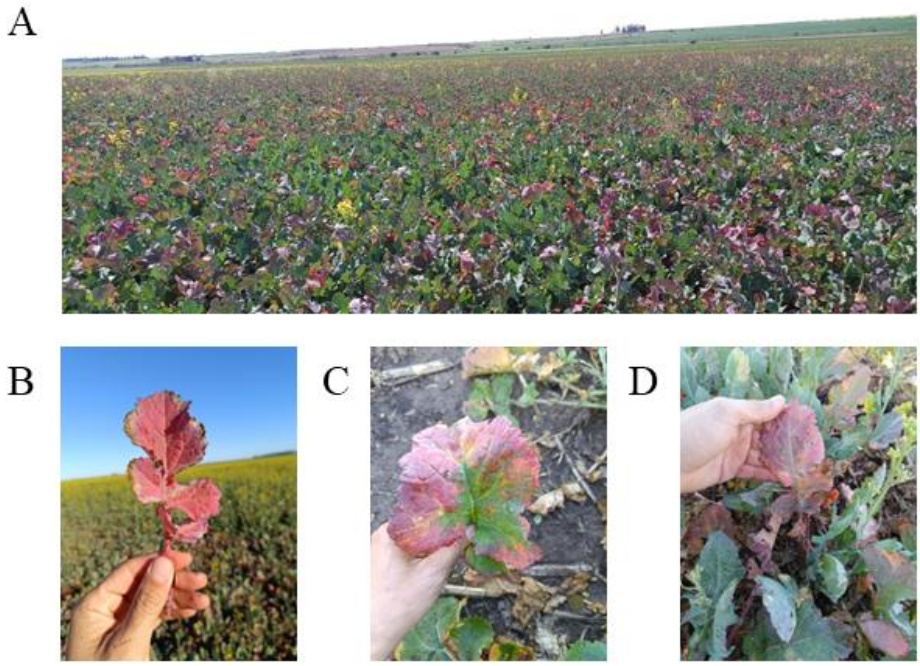

Figura 15. Síntomas de virosis por TuYV presentes en chacras uruguayas en 2023. A: Vista general de una chacra afectada. B, C y D: síntomas en hojas individuales. Imágenes proporcionadas por la empresa Unicampo Uruguay.

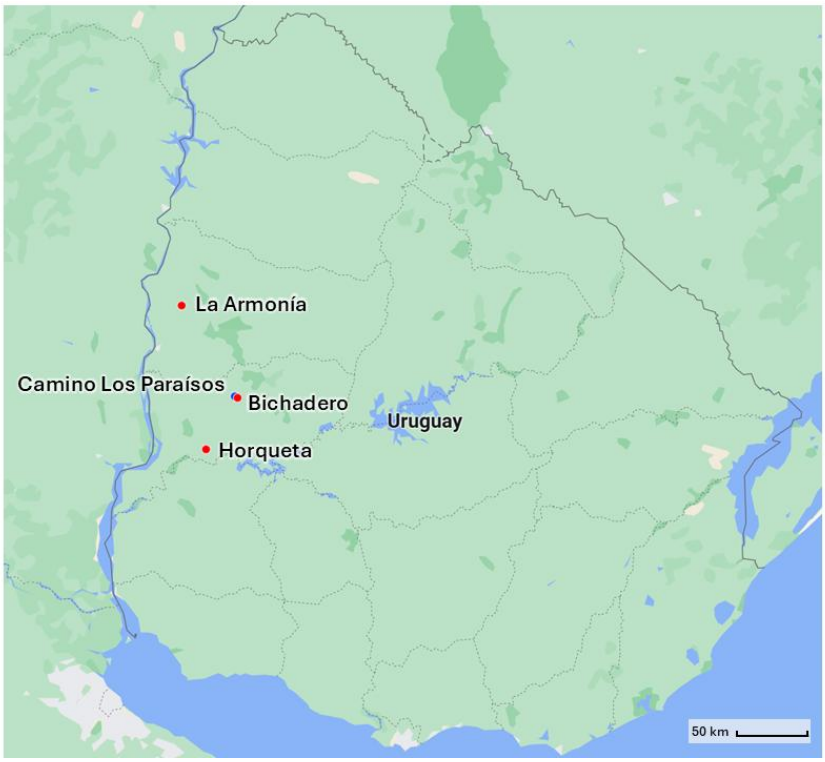

Figura 16. Mapa de Uruguay en donde se indica la ubicación de las chacras muestreadas en este trabajo. Ilustración generada utilizando la herramienta web Atlist (https://www.atlist.com/).

4.2.1. Detección de TuYV mediante RT-PCR

Se estudió la presencia de TuYV en las 22 muestras de colza del litoral oeste uruguayo siguiendo el método de RT-PCR establecido anteriormente (Figura 14). Se detectó la presencia del virus en las cuatro chacras analizadas, por lo que se puede asumir que hay una amplia distribución del TuYV entre los departamentos de Paysandú y Río Negro. Se asume que la distribución del mismo abarca una distancia de al menos 106 km (distancia entre las dos chacras más lejanas: La Armonía y Horqueta), y que probablemente el virus también se haya expandido a otras zonas del país. En la Tabla 3 se presenta de forma resumida los resultados obtenidos para la detección de TuYV en las muestras analizadas mediante RT-PCR.

Tabla 3. Resumen de los resultados obtenidos para la detección de TuYV mediante RT-PCR en 22 muestras provenientes de chacras del litoral oeste uruguayo, utilizando tres juegos de cebadores específicos.

Chacra	Muestra	TuYV_Juego1	TuYV_Juego2	TuYV_Juego3
La Armonía	A1	+	+	+
	A2	+	+	+
	A3	+	-	+
	A4	+	+	+
	A5	+	no realizado	+
	A6	+	no realizado	+
	A7	+	+	+
Bichadero	B2	+	+	+
	B3	+	+	+
	B4	+	+	+
	B6	+	+	+
	B7	+	+	+
Horqueta	H1	-	-	-
	H2	+	-	+
	H3	+	+	+
	H4	-	-	-
	H5	+	-	+
Camino Los Paraísos	S1	-	no realizado	-
	S2	+	-	+
	S3	-	no realizado	-
	S4	+	no realizado	+
	S5	+	no realizado	+
"Hojas Control" (control negativo)		-	-	-

Inicialmente se esperaba detectar la presencia del virus en muestras provenientes de plantas con síntomas y no detectar el virus en las muestras asintomáticas. Para las chacras La Armonía y Bichadero, los resultados coincidieron con lo esperado. De las siete muestras sintomáticas de la chacra La Armonía, todas resultaron positivas con los juegos de cebadores TuYV_Juego1 y TuYV_Juego3, pero con el juego TuYV_Juego2 no se obtuvo el fragmento esperado para una de las cinco muestras ensayadas (A3). En cuanto a las cinco muestras sintomáticas evaluadas de la chacra Bichadero, se obtuvo amplificación con los tres juegos de cebadores utilizados para todas las muestras. En el caso de las cinco muestras de la chacra Horqueta, pese a ser todas sintomáticas, para dos de ellas no se obtuvo amplificación con ninguno de los tres juegos de cebadores utilizados. Este resultado podría implicar que los síntomas no estaban asociados a virosis y podían deberse a otras causas, como estrés abiótico, pero es una posibilidad poco probable dado que otras muestras obtenidas de la misma chacra sí resultaron ser positivas para TuYV. Este resultado inesperado podría deberse a que en estas plantas se tuviera una baja carga

viral, por lo cual sería interesante poder realizar una técnica más sensible como la RT-qPCR e intentar evaluar esta posibilidad, o podría tratarse de variantes del virus que por polimorfismos o variabilidad genética los cebadores utilizados no permitieron amplificar los fragmentos esperados, para lo cual se podría evaluar la amplificación de otros fragmentos con cebadores diferentes o utilizar otra técnica independiente de cebadores. Por otra parte, de las tres muestras de la chacra Horqueta que sí resultaron positivas con los juegos de cebadores TuYV_Juego1 y TuYV_Juego3, dos de ellas (H2 y H5) no permitieron amplificar el fragmento esperado para el juego TuYV_Juego2.

Los resultados obtenidos para las muestras de la chacra de Camino Los Paraísos también fueron inesperados. A pesar de tratarse de muestras asintomáticas, tres de las cinco muestras evaluadas (S2, S4, S5) resultaron ser positivas con los juegos de cebadores TuYV_Juego1 y TuYV_Juego3. Cabe destacar que las muestras provenientes de esta chacra pertenecen a una variedad de colza (*Nuola 300*) diferente a la de las otras chacras con muestras sintomáticas (*Phoenix CL*), lo que podría significar que la ausencia de síntomas se deba a que se trata de una variedad de colza con mayor tolerancia a TuYV. Frente a estos resultados el Ing. Agr. Esteban Hoffman de la empresa Unicampo Uruguay consultó a su proveedor de semillas y confirmó que la variedad *Phoenix CL* es susceptible al virus mientras que *Nuola 300* es más tolerante (comunicación personal). Sería de interés poder estudiar la carga viral de estas muestras y compararlas con las muestras sintomáticas mediante qPCR, para evaluar si la falta de síntomas podría estar vinculada con una baja carga viral.

Es importante destacar que no se amplificó ningún fragmento de TuYV a partir de la muestra "Hojas Control", proveniente de la planta de colza crecida en el invernadero del IIBCE como control negativo, desestimando la posibilidad de haber obtenido falsos positivos en el proceso. Por otro lado, se resalta la ausencia de amplificación con el par de cebadores TuYV_Juego2 en múltiples muestras que fueron positivas con TuYV_Juego1 y TuYV_Juego3. Este resultado, que también se había observado en la puesta a punto, puede indicar la presencia de polimorfismos o variantes que impiden la hibridación de los cebadores.

En una última etapa, mediante secuenciación Sanger y posterior verificación de la identidad de las secuencias obtenidas utilizando la herramienta blastn del NCBI se demostró que los productos amplificados con los juegos de cebadores TuYV_Juego1, TuYV_Juego2 y TuYV_Juego3 eran los esperados, hubo coincidencia entre la secuencia de los fragmentos obtenidos y lo esperado según los genomas de TuYV existentes en la base de datos. De las 22 muestras estudiadas por RT-PCR, se secuenció el producto de PCR obtenido con el TuYV_Juego1 para 11 muestras (A1, A2, A3, A4, H2, H5, B6, B7, S2, S4, S5; representando el 61% de muestras positivas con TuYV_Juego1), el producto de PCR obtenido con el TuYV_Juego2 para 5 muestras (A1, A2, H3, B6, B7; representando el 50% de muestras positivas con TuYV_Juego2) y el producto de PCR obtenido con el TuYV_Juego3 para 11 muestras (A1, A2, A3, A4, H2, H5, B6, B7, S2, S4, S5; representando el 61% de muestras positivas con TuYV_Juego3). Todos los productos de PCR secuenciados derivaron de TuYV, confirmando la identidad del 59% de las PCR positivas para el TuYV obtenidas y la especificidad de la RT-PCR. Estos resultados, junto con la ausencia de falsos positivos en la

muestra del control negativo, permiten decir que la RT-PCR utilizada para la detección de TuYV es específica.

4.2.2. Detección de TuYV mediante DAS-ELISA

Con el fin de validar los resultados obtenidos por RT-PCR con un método alternativo se realizó un análisis de presencia o ausencia del TuYV mediante un método serológico sobre las mismas muestras de colza analizadas anteriormente por RT-PCR. Esto permite asegurar la confiabilidad de los resultados obtenidos mediante la comparación con una segunda técnica independiente. El inmunoensayo realizado fue un DAS-ELISA específico para detectar TuYV. Para ello se utilizó el kit *Loewe Biochemica GmbH Turnip Yellows Virus complete kit* como se detalla en la sección 3.9 de Metodología. En la Figura 17 se muestra un esquema representando el *workflow* para la detección de TuYV mediante DAS-ELISA. La detección con este kit está basada en el desarrollo de coloración amarilla en las muestras positivas al generarse 4-nitrofenol (4-NP) como producto de catálisis entre el sustrato, p-nitrofenil-fosfato (pNPP), y la fosfatasa alcalina (FA) conjugada a la IgG anti-TuYV que permite inferir sobre la presencia del virus. Se requiere utilizar controles adecuados para poder asegurar que un resultado es positivo y que no se trata de ruido de fondo. El kit proporciona sus propios controles para utilizar como verificación de reacciones positiva y negativa. En este trabajo se utilizó también la muestra "Hojas Control", proveniente de una planta negativa sembrada en el invernadero del IIBCE.

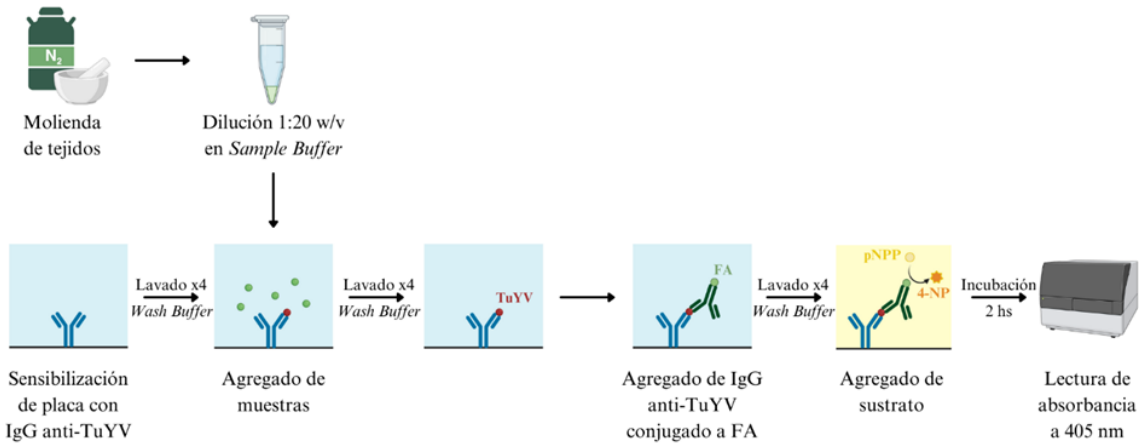

Figura 17. Esquema del workflow para la detección de TuYV mediante DAS-ELISA utilizando el kit *Loewe Biochemica GmbH Turnip Yellows Virus complete kit*. Ilustración generada utilizando la herramienta web Biorender (https://www.biorender.com/)

En la Tabla 4 se muestra los resultados de absorbancia a 405 nm obtenidos para las 22 muestras analizadas y los diferentes controles utilizados. Como se detalla en la tabla, los resultados obtenidos mediante la técnica de DAS-ELISA permitieron verificar los resultados obtenidos por RT-PCR, demostrando la validez de ambos métodos como estrategias para la detección del TuYV en muestras de colza. Para las muestras analizadas ambos métodos tuvieron igual desempeño. Para el total de las muestras positivas por RT-PCR se obtuvieron absorbancias mayores a las de los controles negativos y mayores al control positivo del kit. Para las cuatro

muestras negativas para TuYV por RT-PCR (H1, H4, S1, S3), en el análisis por DAS-ELISA se obtuvieron absorbancias menores al control negativo del kit y al control negativo "Hojas Control".

Tabla 4. Resumen de los resultados obtenidos para la detección de TuYV mediante DAS-ELISA en 22 muestras provenientes de chacras del litoral oeste uruguayo

Chacra	Muestra	Absorbancia 405 nm	Resultado DAS-ELISA	Resultado RT-PCR
La Armonía	A1	4,829	+	+
	A2	5,666	+	+
	A3	3,987	+	+
	A4	4,852	+	+
	A5	3,410	+	+
	A6	4,349	+	+
	A7	5,113	+	+
Bichadero	B2	6,000	+	+
	B3	2,409	+	+
	B4	4,681	+	+
	B6	6,000	+	+
	B7	6,000	+	+
Horqueta	H1	1,101	-	-
	H2	2,559	+	+
	H3	3,363	+	+
	H4	1,024	-	-
	H5	6,000	+	+
Camino Los Paraísos	S1	0,6305	-	-
	S2	2,841	+	+
	S3	1,049	-	-
	S4	4,549	+	+
	S5	4,118	+	+
"Hojas Control" (control negativo)		1,187	-	-
Control Positivo kit		2,406		
Control Negativo kit		1,280		

4.2.3. Primera aproximación para la detección de TuYV mediante qPCR

En una primera aproximación hacia la detección de TuYV mediante RT-qPCR se evaluó un juego de cebadores que pueda funcionar para su uso en este tipo de ensayos. Se evaluó el par de cebadores TuYV_Juego6, que permite amplificar un fragmento de 158 pb del genoma de TuYV. Se realizó RT-PCR (a tiempo final) con TuYV_Juego6 a la vez que UBQ sobre las 22

muestras evaluadas por RT-PCR y DAS-ELISA y sobre el control negativo “Hojas Control”. En este primer ensayo se pudo comprobar que las 22 muestras evaluadas fueron positivas para esta PCR, mientras que el control negativo “Hojas Control” no amplificó el fragmento del virus y sí a la ubiquitina. Se secuenció el producto obtenido a partir de las muestras H3, H4 y S3, resultaron coincidir con lo esperado. De esta forma, se avanzó en la posible detección del virus por RT-qPCR. En la Figura 18 se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos para algunas de las muestras evaluadas. Es importante destacar que las muestras H1, H4, S1 y S3, que fueron negativas por RT-PCR con TuYV_Juego1 y TuYV_Juego3 y por DAS-ELISA, en este caso resultaron ser positivas como se puede observar en la Figura 18. Además, entre los productos de PCR secuenciados se incluyó los de las muestras H4 y S3, comprobando que era lo esperado. En estos ensayos con TuYV_Juego6 y juego UBQ se observó que la UBQ, pese a ser el control interno, no siempre amplificó. Esto se pudo deber a que las RT utilizadas tenían un tiempo largo de guardado a -20°C. No obstante, el resultado más importante que era la detección de TuYV se logró con éxito. Dado que los resultados de RT-PCR con TuYV_Juego1 y TuYV_Juego3 y el ensayo con DAS-ELISA coincidieron para las muestras H1, H4, S1 y S3, los resultados con TuYV_Juego6 indican que la falta de detección del virus en estas muestras probablemente se debió a una baja carga viral en ellas y no a polimorfismos en los sitios de hibridación de los cebadores (dado que DAS-ELISA es una técnica independiente de cebadores), por lo que es de interés continuar con el estudio de la detección con una técnica con mayor sensibilidad y que también permita la cuantificación.

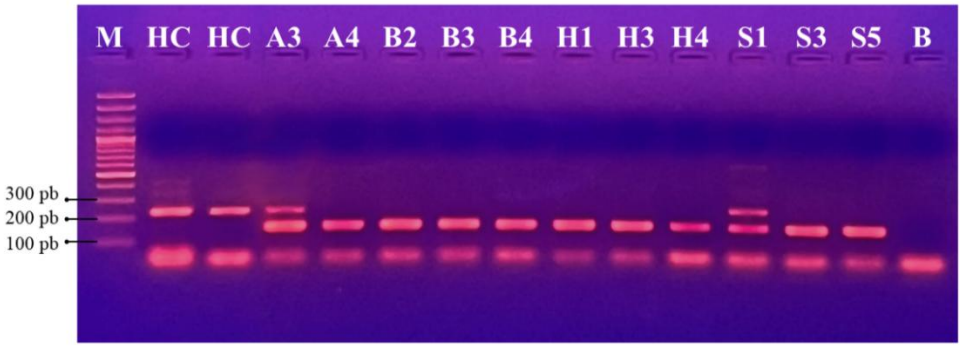

Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 2% para visualizar los productos de RT-PCR realizadas con TuYV_Juego6 y el juego UBQ como control interno. M = Marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder. HC = control negativo “Hojas Control”. A3 y A4 = Plantas 3 y 4 de la chacra La Armonía, respectivamente. B2, B3 y B4 = Plantas 2, 3 y 4 de la chacra Bichadero, respectivamente. H1, H3 y H4 = Plantas 1, 3 y 4 de la chacra Horqueta, respectivamente. S1, S3 y S4 = Plantas 1, 3 y 5 de la chacra en Camino Los Paraísos, respectivamente. B: Blanco.

Todo el trabajo y resultados obtenidos dirigidos a la detección de TuYV en muestras provenientes de cuatro chacras del litoral oeste uruguayo permiten suponer que el virus también se encuentra en otras partes del país y que puede continuar extendiéndose, por lo que se debe continuar con el análisis del TuYV en otras áreas donde se cultiva colza. Además, aún no se conoce el grado de afectación que puede tener el virus sobre el cultivo en Uruguay, por lo que es fundamental seguir evaluando sus posibles consecuencias. Adicionalmente, por más que ciertas plantas fueran asintomáticas, no se puede descartar que la presencia del virus en estas plantas no tenga consecuencias en el rendimiento de la producción, además de que el hecho de

estar infectadas las convierte en una potencial fuente de virus. Para los productores de colza esto implica la necesidad de un monitoreo de sus cultivos para poder detectar el virus de forma temprana en caso de que se encuentre presente, y de esta forma poder tomar las medidas agronómicas que correspondan para evitar grandes pérdidas económicas. Esta es la primera vez que se detecta el virus en el país, y es un hallazgo que no impacta únicamente sobre los productores locales, sino que también tiene una gran relevancia en la región ya que en Argentina no hay reportes de presencia de TuYV, pero dada su proximidad con Uruguay es probable que el virus ya esté presente allí.

4.3. Estudio bioinformático de secuencias de RTD y RdRp

Una vez analizadas todas las muestras, para continuar con el objetivo específico 3, se procedió con la obtención y estudio bioinformático de secuencias correspondientes a fragmentos del genoma del virus TuYV. Para ello, se obtuvieron múltiples fragmentos del genoma de TuYV provenientes de cuatro muestras de colza, una por chacra, que se secuenciaron y ensamblaron para posteriormente realizar un análisis filogenético.

4.3.1. Obtención de secuencias y ensamblado

Con el objetivo de obtener una secuencia consenso de TuYV representativa de cada chacra, se realizó la secuenciación Sanger de diferentes productos de RT-PCR provenientes de una muestra de colza por chacra utilizando juegos de cebadores que permitieran amplificar diferentes fragmentos del genoma. A medida que se avanzó con la secuenciación se diseñaron más juegos de cebadores para poder completar la secuencia de los fragmentos RTD y RdRp (Tabla 1). En la Figura 19 se muestra un esquema representando los fragmentos del genoma a amplificar con cada juego de cebadores utilizado, que permiten cubrir la región RTD y RdRp, y los fragmentos que pudieron obtenerse finalmente.

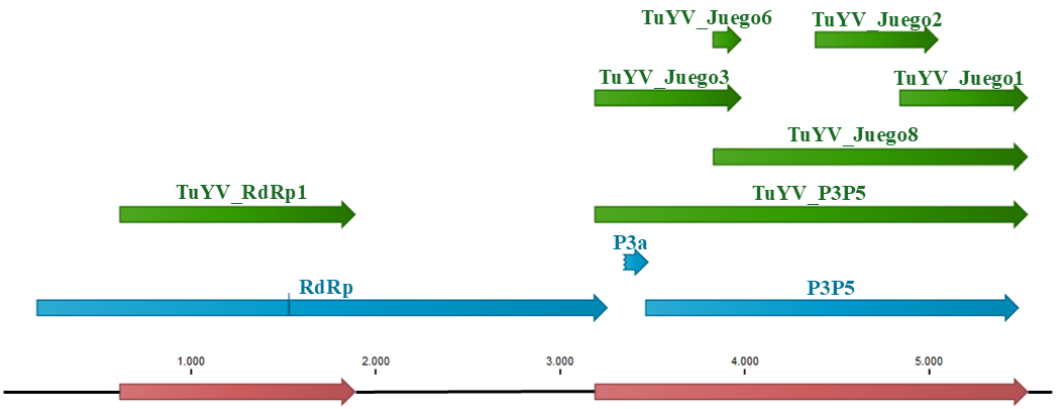

Figura 19. Representación del genoma de TuYV, las regiones amplificadas con cada juego de cebadores, y los fragmentos consenso obtenidos. Flechas azules indican las regiones codificantes para la polimerasa de ARN dependiente de ARN (RdRp), la proteína P3a y la proteína de fusión P3-P5. Flechas verdes indican las regiones amplificadas exitosamente con los diferentes juegos de cebadores. Flechas rojas indican los fragmentos de secuencia obtenidos en este trabajo para diferentes muestras. Figura generada con el programa CLC Main Workbench 24.0.1.

En la Tabla 5 se muestra los diferentes fragmentos que se amplificaron con éxito y se secuenciaron para cada una de las muestras de colza representativas de una chacra. Con los fragmentos obtenidos, se logró generar una secuencia consenso (2429 pb) que incluyó al dominio RTD entero y a la secuencia codificante para la proteína P3a de las muestras A4, B7, H5 y S2, denominadas de aquí en adelante RTD_A4, RTD_B7, RTD_H5 y RTD_S2, respectivamente. Por otro lado, para la RdRp no se logró amplificar los fragmentos esperados con los juegos TuYV_RdRp2 y TuYV_RdRp3 para ninguna de las muestras evaluadas. Únicamente se logró amplificar el fragmento generado con el par de cebadores TuYV_RdRp1 para las muestras A4, B7 y S2. Se secuenció el producto de PCR de cada una y se obtuvieron las secuencias denominadas RdRp_A4 (804 pb), RdRp_B7 (1191 pb) y RdRp_S2 (1023 pb), respectivamente.

Tabla 5. Fragmentos amplificados y secuenciados para obtener secuencias consenso de TuYV en muestras de colza provenientes de chacras del litoral oeste uruguayo.

Chacra	Muestra	Fragmentos amplificados y secuenciados de TuYV					
		RTD					RdRp
		TuYV_ Juego1	TuYV_ Juego2	TuYV_ Juego3	TuYV_ Juego8	TuYV_ P3P5	TuYV_ RdRp1
La Armonía	A4	X		X	X	X	X
Bichadero	B7	X	X	X	X		X
Horqueta	H5	X		X	X		
Camino Los Paraísos	S2	X		X	X	X	X

Una vez obtenidas las secuencias consenso de TuYV para cada muestra de colza representativa de cada chacras, se buscó mediante blastn en la base de datos del NCBI secuencias con el más alto porcentaje de identidad para cada una de ellas, con el fin de comprobar la identidad y precisión del ensamblaje. Se confirmó la identidad de TuYV para todas las secuencias, siendo el resultado con mayor coincidencia para cada una de ellas una secuencia de TuYV (Tabla 6).

Tabla 6. Secuencias de TuYV con mayor similitud a las secuencias consenso de TuYV obtenidas en este trabajo (obtenidas mediante BLAST).

Secuencia	Resultado con mayor coincidencia			
	Número de acceso	Descripción	Cobertura	Porcentaje de identidad
RTD_A4	OK030788.1	Turnip yellows virus isolate Ramsey-2 TuYV	99%	94,26%
RTD_B7	MN497806.1	Turnip yellows virus isolate Muenster_17	100%	97,83%
RTD_H5	MT955611.1	Turnip yellows virus isolate Geo15	98%	97,54%
RTD_S2	MT586589.1	Turnip yellows virus isolate MK113	99%	89,81%
RdRp_A4	OP797722.1	Turnip yellows virus isolate 12842-TuYV	96%	95,71%
RdRp_B7	MT586594.1	Turnip yellows virus isolate 5514a	100%	98,49%
RdRp_S2	MN497802.1	Turnip yellows virus isolate Salzlandkreis-1_18	100%	92,11%

Con el fin de obtener arboles filogenéticos que ayuden a determinar el parentesco de los virus identificados con otros previamente reportados, se realizó una búsqueda de secuencias por homología en la base de datos del NCBI. Esto permitiría obtener secuencias RTD y RdRp obtenidas en otras partes del mundo, y con estas y las secuencias consenso obtenidas en este trabajo generar alineamientos que permitieran realizar un análisis de filogenia.

4.3.2. Análisis filogenético con secuencias de RTD

En primer lugar se obtuvieron secuencias nucleotídicas de la base de datos de NCBI mediante búsqueda por homología con las secuencias consenso RTD_A4, RTD_B7, RTD_H5 y RTD_S2, y se descargaron las secuencias que cubrieran al menos el 70% del *query* para cada una de las secuencias consenso. En total se obtuvieron 134 secuencias de TuYV (Tabla 9 del Anexo 1), con un rango de porcentajes de identidad entre 76,93% y 98,04%. Con estas secuencias y las secuencias consenso obtenidas en este trabajo se realizó un alineamiento de acuerdo a lo establecido en el apartado 3.8.2 de metodología. Se generó un árbol filogenético a partir del alineamiento de secuencias nucleotídicas que abarcaban la región codificante para el dominio RTD y la secuencia codificante para proteína P3a (Figura 20) esperando poder identificar las secuencias de TuYV con mayor parentesco con las obtenidas en este trabajo y obtener indicios sobre el origen del TuYV encontrado en Uruguay. En la Figura 20 se observa cómo la filogenia realizada permitió separar a las secuencias analizadas en tres grupos diferenciados: Grupos I, II y III, en donde el Grupo III mostró estar a una mayor distancia genética que los Grupos I y II entre ellos. En otro estudio realizado con secuencias nucleotídicas que codifican para el dominio RTD de TuYV [16] los autores también identificaron 3 grupos diferenciados que coinciden con los grupos identificados en este trabajo, y las secuencias utilizadas en común entre ambos trabajos mostraron el mismo patrón de agrupamiento (señaladas con el código de colores que

se describe en la Figura 20). Esta consistencia apoya la existencia de los 3 grupos detectados en este trabajo y con ello la relación entre los fragmentos de genoma secuenciados aquí.

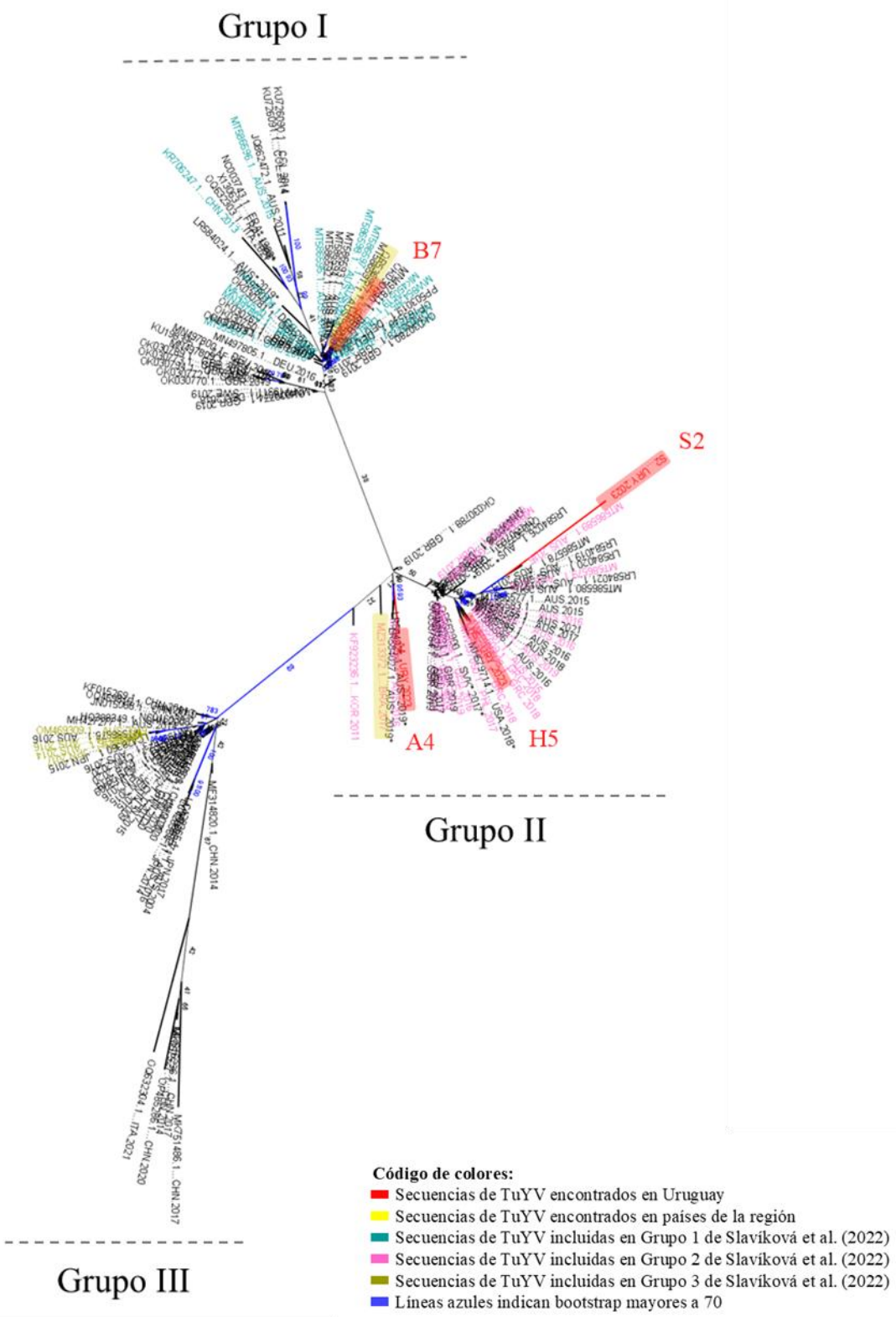

Figura 20. Árbol filogenético construido con el método Maximum Likelihood (bootstrap = 1000) a partir de alineamiento de secuencias nucleotídicas parciales de TuYV abarcando a la secuencia codificante para el dominio RTD y la proteína P3a. Figura generada con el programa FigTree v1.4.4.

Las 4 muestras uruguayas se ubicaron en los Grupos I y II, en donde RTD_B7 se encontró en el Grupo I y RTD_A4, RTD_H5 y RTD_S2 en el Grupo II. Esta separación de las muestras uruguayas demuestra que hay variabilidad del virus en el territorio, especialmente teniendo en cuenta que las muestras RTD_S2 y RTD_B7, pertenecientes a las dos chacras que se encuentran más cercanas geográficamente (2,3 km), se encontraron en grupos separados. Adicionalmente, frente a estos resultados parecería que la tolerancia de la variedad de colza *Nuola 300* no se debió a que la infección haya sido por una variante muy diferente del virus, ya que la muestra RTD_S2 se agrupó en el Grupo II junto con las muestras RTD_A4 y RTD_H5, provenientes de plantas de variedad *Phoenix CL*.

En cuanto a la relación con secuencias de TuYV de países de la región, se obtuvo una secuencia de TuYV proveniente de Brasil en 2017 (MZ313372.1) [36] y una proveniente de Chile en 2020 (OR536957.1) [35], las cuales se encontraron en el Grupo II y Grupo I respectivamente. La secuencia brasileña presentó un porcentaje de identidad de 92,77%, 93,40%, 92,69% y 85,78% con las muestras A4, B7, H5 y S2 respectivamente, y la secuencia chilena 96,20%, 97,83%, 91,03% y 92,75%. En el árbol filogenético, la secuencia de TuYV proveniente de Chile se encontró agrupada junto con la muestra RTD_B7 de este estudio en una rama con bootstrap 91, proporcionando evidencia de una posible relación evolutiva entre los virus de estas muestras y pudiendo indicar un posible origen de la llegada del virus al país. Sin embargo, si bien la muestra de Chile está muy cercana filogenéticamente con la muestra uruguaya RTD_B7, las otras 3 muestras uruguayas están más lejanas a pesar de estar a una distancia geográfica muy pequeña entre sí, esto podría deberse a múltiples entradas del virus al país o a una alta capacidad del virus de generar variantes genéticas. Si esta segunda posibilidad fuera cierta, inferir el origen del virus en el país en un análisis filogenético se vuelve muy dificultoso.

Con el fin de ahondar en el análisis las secuencias obtenidas, se tradujeron las secuencias nucleotídicas RTD_A4, RTD_B7, RTD_H5 y RTD_S2 para obtener las secuencias de aminoácidos para las proteínas P3-P5 y P3a correspondientes (P3P5_A4 y P3a_A4; P3P5_B7 y P3a_B7; P3P5_H5 y P3a_H5; P3P5_S2 y P3a_S2). Se utilizaron estas secuencias para realizar un blastp en la base de datos del NCBI y se descargaron las secuencias que cubrieron al menos el 90% del *query* para cada una de ellas, obteniendo en total 149 secuencias de P3-P5 (Tabla 9 del Anexo 1) con un rango de porcentajes de identidad entre 52,36% y 98,52% con las secuencias obtenidas en este trabajo, y 15 secuencias de P3a (Tabla 9 del Anexo 1) con un rango de porcentajes de identidad entre 56,82% y 100% con las secuencias obtenidas en este trabajo.

En la Figura 21 se muestra el árbol filogenético generado a partir del alineamiento de las secuencias de las proteínas P3-P5. Las secuencias aminoacídicas se agruparon en su mayoría de forma similar a sus correspondientes secuencias nucleotídicas. Se mantuvieron agrupadas la mayoría de las secuencias pertenecientes a los tres grupos identificados anteriormente (señalado con código de colores en la Figura 21), con la excepción de las secuencias APG31661.1 y APG31667.1 provenientes de Colombia en 2014 [34] para el Grupo II y la secuencia WQB05953.1 proveniente de Italia en 2021 [31] para el Grupo III. Las muestras uruguayas se distribuyeron de forma similar que anteriormente, con la muestra P3P5_B7 separada de las otras

tres muestras uruguayas, remarcando la existencia de variabilidad del virus en las muestras uruguayas que repercute en las secuencias proteicas, pudiendo afectar su estructura y función.

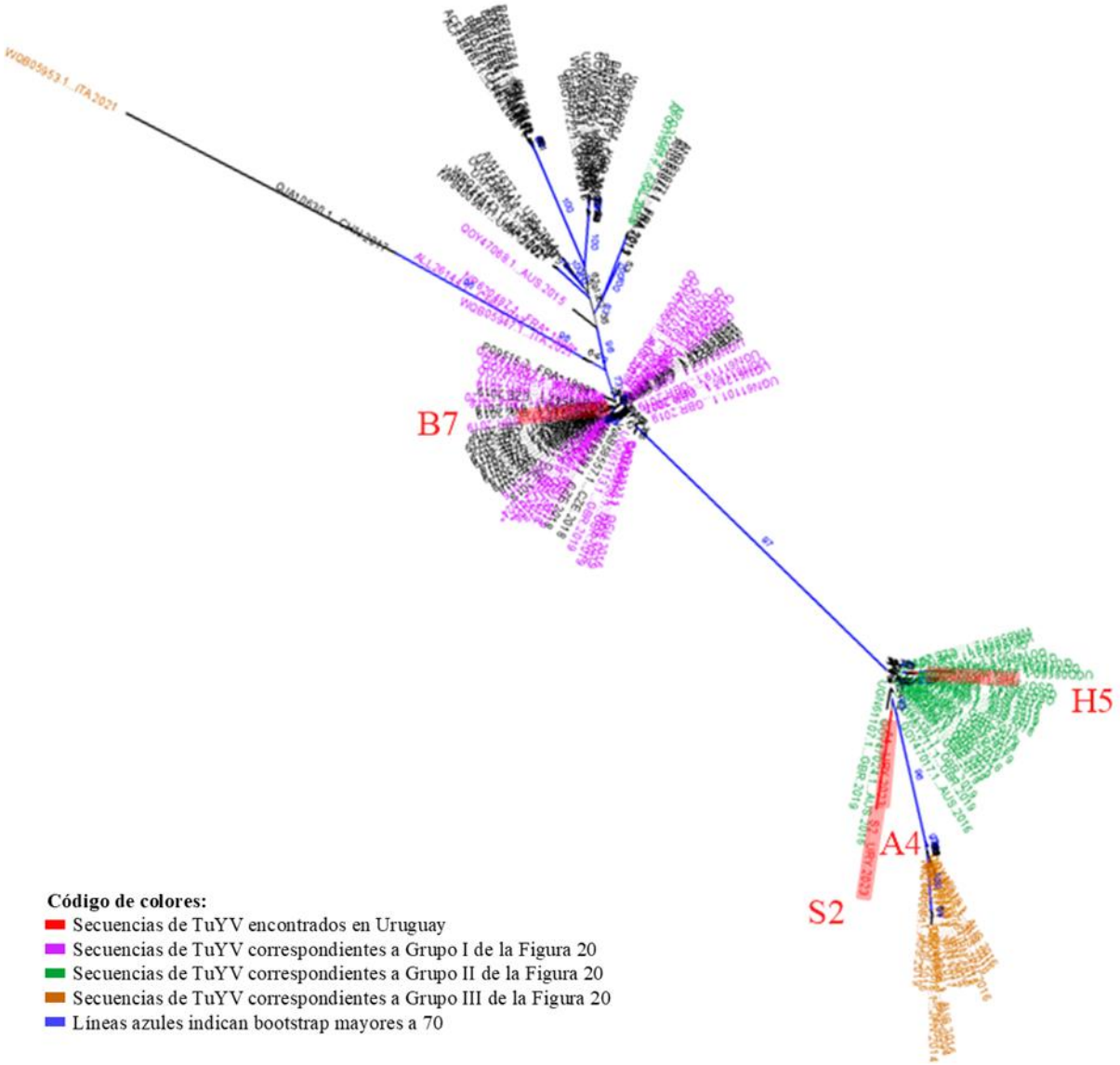

Figura 21. Árbol filogenético construido con el método Maximum Likelihood (bootstrap = 1000) a partir del alineamiento de secuencias aminoacídicas de la proteína P3-P5 perteneciente a TuYV. Figura generada con el programa FigTree v1.4.4.

Por otra parte, en la Figura 22 se muestra el árbol filogenético generado en base al alineamiento de las secuencias aminoacídicas correspondientes a la proteína P3a. El resultado que se obtuvo difiere de lo observado previamente, ya que, si bien las secuencias se agruparon en tres grupos diferenciados, no se observa una correlación clara entre la distribución de las secuencias en los grupos definidos en este análisis y la del árbol basado en secuencias nucleotídicas (señalado con código de colores en la Figura 22). Incluso la agrupación de las muestras uruguayas fue diferente: P3a_A4 se agrupó junto con P3a_B7, mientras que P3a_H5 y P3a_S2 se ubicaron en

un grupo separado, en contraste con el patrón observado previamente donde A4, H5 y S2 se agrupaban juntas en un grupo aparte de B7.

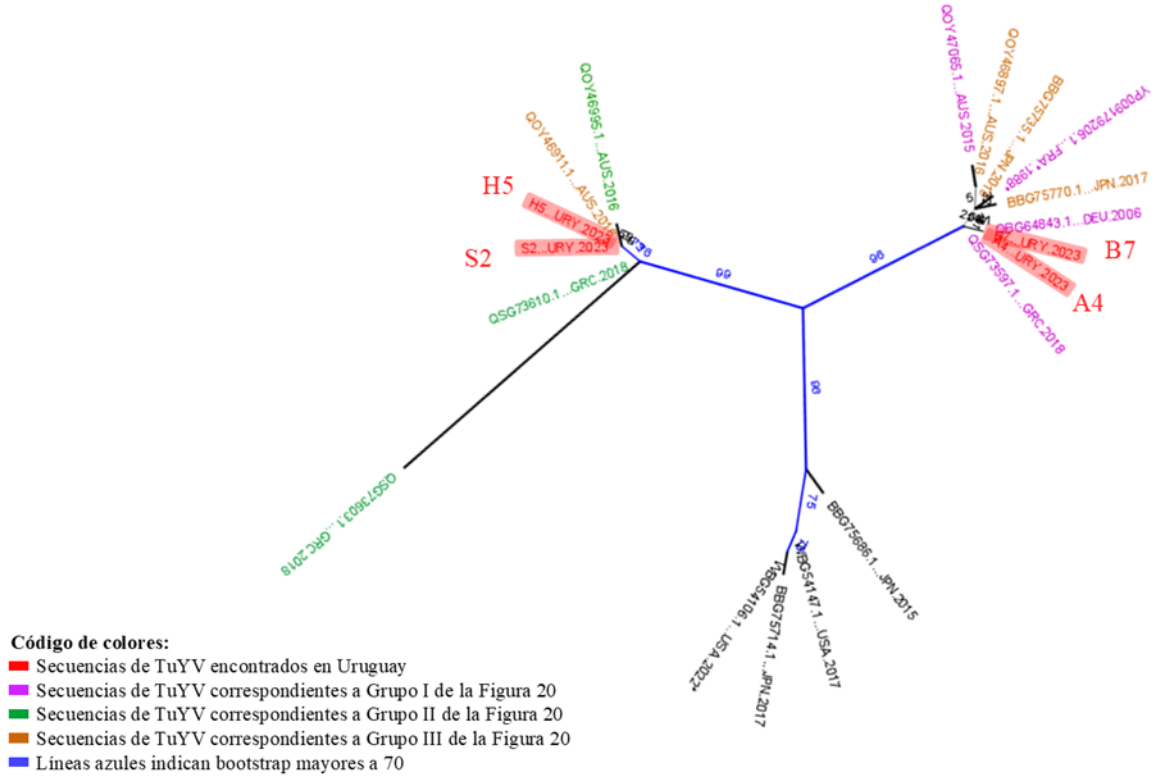

Figura 22. Árbol filogenético construido con el método Maximum Likelihood (bootstrap = 1000) a partir del alineamiento de secuencias aminoacídicas de la proteína P3a perteneciente al TuYV.
Figura generada con el programa FigTree v1.4.4.

Este resultado refuerza el hecho de que el virus presenta una alta variabilidad genética. La agrupación de las secuencias en este nuevo árbol difiere de lo visto previamente, en este árbol A4 y B7 se encuentran juntas en un grupo y H5 y S2 en otro, mientras que anteriormente B7 se encontraba separada de las otras tres que se mantenían juntas en un mismo grupo. Al tratarse de un fragmento del genoma de tamaño pequeño (138 nt), la presencia de polimorfismos podría ser suficiente para separar a las secuencias de forma diferencial. Sin embargo, al analizar las secuencias del fragmento estudiado se observó que no presentaban polimorfismos individuales que explicaran la separación en el árbol, sino que se agrupaban en dos conjuntos bien definidos: A4 y B7 presentan un alto grado de similitud entre sí, mientras que H5 y S2 conforman otro grupo con una alta similitud entre ellas. Dado que los virus de ARN tienen una alta capacidad de recombinación y que esto fue evidenciado para TuYV por Filardo et al. [22], frente a estos resultados se hipotetizó que la diferencia en la agrupación de las muestras uruguayas podría deberse a eventos de recombinación. La validez de esta hipótesis se estudió en el apartado 4.3.4.

4.3.3. Análisis filogenético de RdRp

Se obtuvieron secuencias nucleotídicas correspondientes a RdRp de la base de datos de NCBI mediante búsqueda por homología con las secuencias consenso de un fragmento de 804pb de

RdRp obtenidas en este trabajo: RdRp_A4, RdRp_B7 y RdRp_S2. Se descargaron aquellas secuencias que cubrieron al menos el 70% del *query* para cada una de las secuencias consenso, obteniendo un total de 131 secuencias de TuYV (Tabla 9 del Anexo 1) con un rango de porcentajes de identidad entre 84,80% y 98,49% con las secuencias de este trabajo, y se realizó un alineamiento. En la Figura 23 se muestra el árbol filogenético generado a partir del alineamiento de secuencias nucleotídicas del fragmento de RdRp. Se observa que no se obtuvieron los mismos grupos que en el árbol de secuencias nucleotídicas abarcando al dominio RTD (señalados con código de colores en la Figura 21), demostrando variabilidad en las secuencias del virus a nivel mundial. A pesar de esto, en las muestras uruguayas sí se mantuvo la distribución ya que RdRp_A4 y RdRp_S2 se agruparon juntas mientras que RdRp_B7 se encontró separada. De esta forma, si bien las muestras uruguayas presentan una distribución similar a lo visto previamente, se resalta la variabilidad en las secuencias del virus a nivel global.

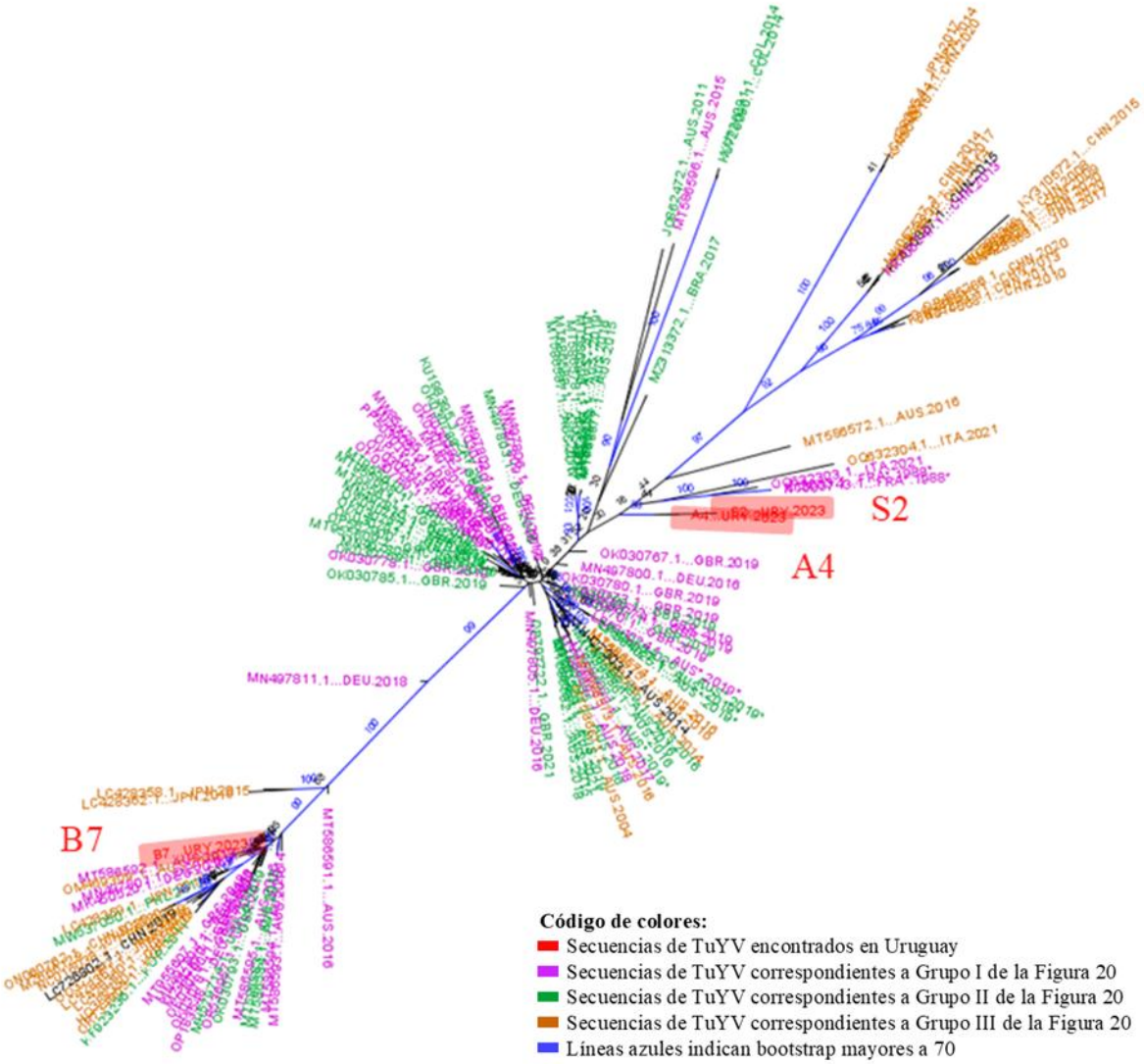

Figura 23. Árbol filogenético construido con el método Maximum Likelihood (bootstrap = 1000) a partir de alineamiento de secuencias nucleotídicas parciales de TuYV abarcando un fragmento de la secuencia codificante de RdRp. Figura generada con el programa FigTree v1.4.4.

4.3.4. Análisis de recombinación de secuencias en RTD

Frente a la hipótesis de la existencia de eventos de recombinación en las secuencias que codifican para el domino RTD y la proteína P3a, se decidió realizar un análisis de recombinación utilizando el programa RDP4 y el alineamiento de secuencias nucleotídicas generado previamente para la obtención del árbol filogenético de la Figura 20. En este análisis, se identificaron 3 posibles eventos de recombinación en las secuencias nucleotídicas de TuYV provenientes de muestras de colza del litoral, clasificados como Evento I, Evento II y Evento III en la Figura 24. El Evento I se identificó en las muestras RTD_A4, RTD_H5 y RTD_S2, el Evento II en las muestras RTD_A4 y RTD_B7, y el Evento III en la muestra RTD_H5.

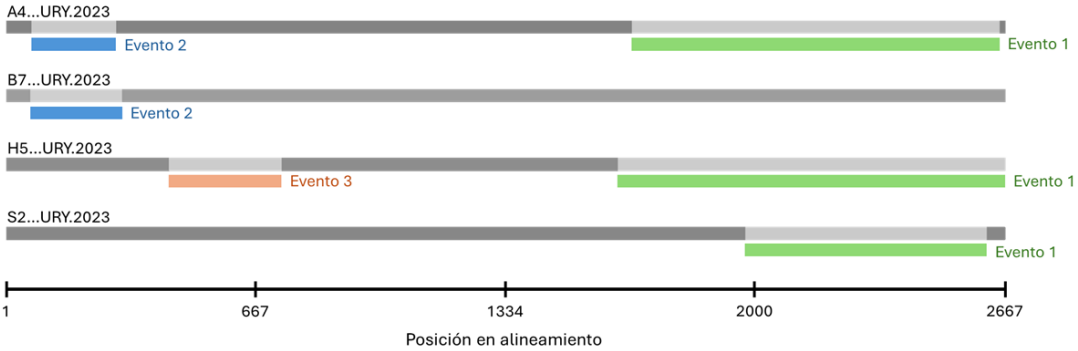

Figura 24. Representación de los eventos de recombinación identificados en las secuencias de TuYV provenientes de muestras de colza del litoral oeste uruguayo. La línea negra indica la posición en la secuencia nucleotídica del fragmento RTD. En verde se indica el Evento I, en azul el Evento II y en naranja el Evento III. Figura generada con el programa RDP4 v.4.101.

La presencia de estos eventos de recombinación permite dar una explicación a las diferencias en estructura de los árboles generados para las secuencias nucleotídicas RTD, las proteínas P3-P5 y las proteínas P3a (Figuras 20, 21 y 22). Por un lado, el hecho de que no se identificó el Evento I en la muestra RTD_B7 brinda una explicación al porque B7 agrupó del resto de las muestras uruguayas en los árboles de secuencias nucleotídicas RTD y de las proteínas P3-P5. Al tratarse de un fragmento de gran tamaño (aproximadamente 690 nt) que abarca una amplia zona del fragmento RTD evaluado (posición en alineamiento: 1632 a 2667 nt) y que difiere en RTD_B7 respecto a las otras tres (los porcentajes de identidad entre los fragmentos correspondientes a la zona donde están los eventos de recombinación para las distintas muestras se encuentran en la Tabla 7), tuvo un impacto importante en las filogenias de las secuencias nucleotídicas RTD y de las proteínas P3-P5.

Tabla 7. Porcentajes de identidad entre los tres eventos de recombinación identificados en las secuencias de TuYV provenientes de muestras de colza del litoral oeste uruguayo.

Secuencia nucleotídica correspondiente	Porcentaje de identidad entre secuencias				
Evento 1		A4	B7	H5	S2
	A4		47,83%	96,51%	70,12%
	B7	47,83%		47,8%	42,53%
	H5	96,51%	47,83%		70,12%
	S2	70,12%	42,53%	70,12%	
Evento 2		A4	B7	H5	S2
	A4		97,56%	68,55%	68,55%
	B7	97,56%		70,16%	70,97%
	H5	68,55%	70,16%		96,15%
	S2	68,55%	70,97%	96,15%	
Evento 3		A4	B7	H5	S2
	A4		99,67%	95,07%	99,34%
	B7	99,67%		95,39%	99,01%
	H5	95,07%	95,39%		95,07%
	S2	99,34%	99,01%	95,07%	

Por otro lado, el Evento II representa un fragmento del genoma de menor tamaño (aproximadamente 245 nt) que se encuentra posicionado al inicio del fragmento estudiado (posición en alineamiento: 68 – 330 nt), en la zona correspondiente a la secuencia nucleotídica que codifica para P3a. Para este fragmento, las muestras A4 y B7 comparten un 97,56% de identidad entre sí y difieren de S2 y H5, que comparten un 96,15% entre sí (Tabla 7). De esta forma, se explica la distribución de las muestras en el árbol filogenético para la proteína P3a, ya que A4 y B7 agrupan juntas a la vez que comparten el fragmento correspondiente al Evento II. Estos resultados indican que la variabilidad detectada en las secuencias de los virus encontrados en Uruguay se debe en parte a eventos de recombinación presentes en los genomas virales. Sería de interés poder secuenciar más fragmentos del genoma, o idealmente el genoma entero, para poder analizar otros posibles eventos de recombinación que aporten información sobre la variabilidad genética del virus.

Se sabe que las PCR sobre muestras complejas como virus con genoma de ARN pueden producir quimeras generadas por la amplificación de más de una molécula viral que difieren en secuencia y coexisten en la muestra. En este trabajo se descarta la posibilidad de que las secuencias obtenidas se deban a un artefacto de PCR ya que los eventos de recombinación estudiados se detectaron en secuencias provenientes de diferentes productos de PCR independientes, con diferentes tamaños, amplificados con diferentes juegos de cebadores, que provenían de una única muestra.

Asimismo, los resultados obtenidos por el análisis de recombinación permiten explicar la razón por la cual no se obtuvo amplificación con el par de cebadores TuYV_Juego2 en algunas

muestras. El cebador directo, TuYV_3rtpF, se encuentra entre las posiciones 1174 y 1193 nt del alineamiento y el cebador reverso, TuYVF6-AS, entre las posiciones 1944 y 1978 nt del mismo. Por otro lado, el fragmento del genoma en que se encuentra el Evento I de recombinación evidenciado por este análisis se ubica entre las posiciones 1632 y 2667 nt del alineamiento, por lo que incluye la zona de unión del cebador reverso TuYVF6-AS. De esta forma, la presencia del Evento I de recombinación no permitió la hibridación del cebador TuYVF6-AS en las muestras que tenían el Evento I, A4, H5 y S2, impidiendo la amplificación del fragmento esperado para TuYV_Juego2 (Tabla 5). En el caso de la muestra B7, que no tenía el Evento I de recombinación, sí hubo amplificación con el juego de cebadores TuYV_Juego2.

5. Análisis Económico

Con el fin estudiar la posibilidad de brindar un servicio de detección de TuYV para los productores de colza en Uruguay basado en RT-PCR, a desarrollarse en el Departamento de Biología Molecular del IIBCE, se realizó un análisis económico sobre el protocolo por RT-PCR utilizado en este trabajo y se evaluaron alternativas que pudieran implementarse con el fin optimizar el mismo y reducir los costos en el laboratorio. En la Tabla 8 se muestra el costo estimado para el análisis por RT-PCR de 1 muestra o 18 muestras, como máximo de muestras a analizar a la vez (delimitado por el número máximo de muestras a analizar en un gel de agarosa con 20 pocillos, disponible en el laboratorio, y la capacidad máxima de la centrifuga disponible en el laboratorio). Los costos analizados incluyen insumos plásticos, reactivos de biología molecular (que incluye kit de extracción de ARN, DNasa I, kit de RT, hexámeros al azar, polimerasa Taq y otros reactivos para PCR como cebadores y dNTPs, agarosa, marcador de peso molecular, entre otros) y el costo de operario (RRHH). Los números en la tabla representan el costo mínimo ya que no se considera la amortización de los equipos y su mantenimiento, consumo de luz y agua, limpieza, ni la posibilidad de requerir repeticiones en alguna etapa del proceso.

Tabla 8. Costo estimado para la detección de TuYV mediante RT-PCR.

Etapa del proceso	**En caso de 1 muestra**			**En caso de 18 muestras**		
	Plásticos (U$S)	Reactivos (U$S)	RRHH (7 U$S/hr)	Plásticos (U$S)	Reactivos (U$S)	RRHH (7 U$S/hr)
Extracción de ARN y cuantificación por Nanodrop	1,6	7,3	14,0	22,2	131,4	15,8
Tratamiento con DNasa I y RT	0,9	8,4	17,5	16,5	150,7	19,3
PCR	2,7	0,8	17,5	12,6	13,6	19,3
Electroforesis en gel de agarosa	0,1	5,1	8,8	0,6	6,3	10,5
Costo total	84,7 U$S			418,6 U$S		
Costo por muestra	**84,7 U$S**			**23,3 U$S**		

Tomando en cuenta los insumos y reactivos utilizados en este trabajo, el costo aproximado para el análisis de una muestra es de 84,7 U$S, mientras que al analizar 18 muestras en conjunto el costo por muestra se reduce a 23,3 U$S. Esto es debido a que hay ciertos materiales y reactivos que se utilizan en la misma cantidad sin importar el número de muestras y, como el tiempo de trabajo requerido para analizar diferentes cantidades de muestras es similar, el costo de operario varía poco. Siendo así, en el caso de ofrecer el servicio de detección de TuYV se analizarían múltiples muestras a la vez para lograr reducir los costos en el laboratorio. Asimismo, se podrían considerar ciertos cambios en el proceso para reducir aún más los costos como, por ejemplo, cambiar algunos de los reactivos por alternativas más económicas, como podría ser la polimerasa Taq utilizada, el kit de extracción de ARN, o implementar una alternativa a la molienda de muestras que insuma menos tiempo del operador.

Adicionalmente, puesto que ya se verificó la presencia del TuYV en Uruguay y se confirmó mediante secuenciación, podrían considerarse otras técnicas alternativas que sean más económicas. Una posible alternativa es realizar la detección TuYV mediante DAS-ELISA, una técnica que no solo es más económica, sino que se utilizó durante este trabajo y se comprobó que funciona de forma similar a la PCR con los juegos de cebadores TuYV_Juego1 y TuYV_Juego3 en las muestras estudiadas (indicando que puede tener una sensibilidad equivalente). Sin embargo, los estudios realizados con TuYV_Juego6 (diseñado para RT-qPCR) mostraron que con este juego se logra una mayor sensibilidad que con TuYV_Juego1, TuYV_Juego3 o DAS-ELISA, revalorizando el uso de RT-PCR para la detección en muestras con menor carga viral (como lo esperado para campos en donde la infección aún no se ha propagado mucho). Detectar el virus mediante RT-qPCR, una técnica con mayor sensibilidad, permitiría adelantar la detección a etapas aún más tempranas, lo cual sería beneficioso para tomar las medidas necesarias para mitigar el daño; aunque se trate de una técnica más costosa generaría ahorros mucho más importantes que un DAS-ELISA con menor sensibilidad.

Otra alternativa interesante de explorar es la técnica de LAMP (*Loop-Mediated Isothermal Amplification*), una técnica de amplificación de alta especificidad y velocidad realizada en una única reacción a una temperatura constante [51]. Congdon et al. [42] desarrollaron un ensayo de RT-LAMP para detectar TuYV en plantas de colza y en el pulgón vector a partir de extracciones crudas y de ARN total, con detección basada en un análisis cuantitativo en tiempo real utilizando el equipo especializado Optigene Genie® II. En ese estudio se demostró que el TuYV se detecta por RT-LAMP utilizando cebadores específicos, por lo que sería interesante evaluar la posibilidad de realizar un ensayo de RT-LAMP colorimétrico, donde la detección no sea cuantitativa y a tiempo real, y por ende no requiera equipos especializados, sino que se obtenga un resultado visual directo con igual rapidez, e incluso podría utilizarse directamente en el campo. La detección por RT-LAMP colorimétrico es una técnica utilizada para la detección de otros virus vegetales como por ejemplo *Tobacco Mosaic Virus* (TMV) [52], *Chrysanthemum Chlorotic Mottle Viroid* (CChMVd) [53], *Bean Common Mosaic Virus* (BCMV) [54] y *Soybean Mosaic Virus* (SMV) [55]. El desarrollo de esta técnica ofrecería una nueva metodología de alta especificidad como alternativa para la detección de TuYV, ofreciendo la ventaja de rapidez de detección además de ser más económico.

6. Discusión General

Previo a este trabajo, en el Laboratorio del Departamento de Biología Molecular del IIBCE se detectó por primera vez la presencia del virus TuYV en Uruguay, específicamente en dos plantas de una chacra en el departamento de Paysandú. En este trabajo se amplió el estudio de detección del virus a más plantas (un total de 22) y otras chacras del litoral oeste uruguayo (un total de cuatro chacras).

En primer lugar se realizó una puesta a punto del método de detección de TuYV por RT-PCR en el laboratorio. Se evaluaron diferentes juegos de cebadores, condiciones de PCR y métodos de extracción de ARN (en la Figura 14 se muestra el método de detección que se implementó tras la puesta a punto). Se incluyó un control interno para asegurar la calidad del ADNc y evitar falsos negativos, que resultó muy útil posteriormente cuando se estudió un gran número de muestras. Durante el proceso de puesta a punto se presentaron desafíos relacionados con la selección de cebadores y la optimización del ciclado de PCR para evitar amplificaciones inespecíficas. La ausencia de amplificación con el juego de cebadores TuYV_Juego2 brindó un primer indicio sobre la variabilidad del virus en Uruguay y dio lugar a continuar ahondando en ese aspecto durante el trabajo.

Posteriormente, se estudiaron 22 muestras de colza provenientes de cuatro chacras del litoral oeste uruguayo. Mediante técnicas moleculares y serológicas se confirmó la presencia del virus en una zona del territorio más amplia, abarcando los departamentos de Paysandú y Río Negro, demostrando la distribución del mismo en chacras que distan hasta 106 km. Se debe evaluar la incidencia de TuYV en otras regiones del país que puedan verse afectadas para poder determinar la distribución del mismo en el territorio.

En cuanto a las técnicas utilizadas para la detección del virus, se realizó el análisis de las muestras mediante RT-PCR con los juegos TuYV_Juego1, TuYV_Juego2 y TuYV_Juego3 y mediante DAS-ELISA utilizando el kit *Loewe Biochemica GmbH Turnip Yellows Virus complete kit*. Se obtuvieron los mismos resultados para las 22 muestras con ambas técnicas (cuando la RT-PCR se realizó con los juegos TuYV_Juego1 o TuYV_Juego3), indicando una sensibilidad similar entre ellas. El estudio de 22 muestras por RT-PCR, con la verificación de la identidad de los productos amplificados mediante secuenciación Sanger (61% de los productos de RT-PCR obtenidos con TuYV_Juego1 y TuYV_Juego3 se secuenciaron y todos coincidieron con lo esperado) y la validación con DAS-ELISA mostró que el método de detección era específico y robusto. Los resultados indicaron que la sensibilidad del método era similar a la del DAS-ELISA. En una segunda etapa, se trabajó con otro juego de cebadores que permite amplificar un fragmento del genoma pequeño (158 pb), TuYV_Juego6, con el que se detectó la presencia del virus en muestras en donde no se había detectado el virus con las otras técnicas (RT-PCR utilizando los juegos TuYV_Juego1, TuYV_Juego2 y TuYV_Juego3 o el test serológico por DAS-ELISA). Esto pudo deberse a baja carga viral en las muestras. Se debe continuar trabajando en una puesta a punto de la detección de TuYV con juegos de cebadores que permitan amplificar fragmentos más pequeños del genoma de modo de poder realizar la

detección del virus en etapas tempranas de la infección cuando la carga viral es baja. Se considera la posibilidad de realizar la detección de TuYV mediante RT-qPCR, una técnica que, si bien es más costosa, es más sensible y permitiría una detección temprana y con ello la posibilidad de mitigar daños en el cultivo tempranamente. Consideramos que una detección temprana, aunque sea de mayor costo, permitiría evitar grandes pérdidas económicas (probablemente compensando el gasto de la detección).

Por otra parte, al comienzo del proyecto se esperaba encontrar una correlación entre síntomas y virosis de tal modo que no se detectara presencia del virus en las muestras asintomáticas, provenientes de la chacra en Camino Los Paraísos. Sin embargo, los resultados no coincidieron con esta hipótesis y sí se detectó el virus en las muestras asintomáticas. Teniendo en cuenta que las plantas asintomáticas evaluadas eran de la variedad primaveral de colza *Nuola 300*, diferente a la variedad invernal *Phoenix CL* de las plantas sintomáticas, se dedujo que la falta de síntomas a pesar de la infección con TuYV se debía a una mayor tolerancia de *Nuola 300*. Ante la constatación de la presencia del virus en estas plantas mediante RT-PCR y secuenciación, el Ing. Agr. Esteban Hoffman de la empresa Unicampo Uruguay consultó a su proveedor de semillas y confirmó que la variedad *Nuola 300* presenta mayor tolerancia al virus mientras que la variedad *Phoenix CL* es susceptible (comunicación personal); no se obtuvo información detallada sobre qué mecanismo genético está involucrado en dicha tolerancia. Teniendo estos resultados en cuenta, durante la zafra de 2024 se suspendió la siembra de la variedad *Phoenix CL* de colza en las chacras asesoradas por Unicampo Uruguay (12% del área cosechada en Uruguay), y los productores han observado una disminución significativa de los síntomas en comparación con el año anterior (comunicación personal). Este hallazgo pone de manifiesto la necesidad de tener un sistema de vigilancia y diagnóstico de TuYV que permita a los productores de colza tomar decisiones rápidas frente a diferentes escenarios de infección y evitar pérdidas por el virus y lograr maximizar su producción.

No se puede descartar la posibilidad de que el rendimiento de las plantas de colza de variedad *Nuola 300* se vea afectado por la presencia del virus, a pesar de la carencia de síntomas. En la zafra de 2023 en chacras asesoradas por Unicampo Uruguay, si bien las variedades primaverales no presentaron síntomas visuales, estas no alcanzaron el rendimiento esperado. Se plantea la hipótesis de que el virus podría estar afectando al rendimiento en variedades tolerantes, en mayor o menor grado, y hay interés en estudiar su impacto. Igualmente, incluso si no tuviera un impacto en el rendimiento de las variedades tolerantes y por más que estas sean asintomáticas, el hecho de estar infectadas las convierte en un reservorio de virus. Son un componente más en el sistema colza-pulgón-virus que promueve la persistencia del virus y su permanencia en el sistema agrícola. De la misma forma que las malezas portadoras de virus son un riesgo para el cultivo de colza, una variedad asintomática de colza infectada puede favorecer la propagación a otras variedades de colza susceptibles. De esta forma, es importante diagnosticar también a las plantas asintomáticas e incluirlas dentro de las estrategias de manejo y control del virus.

Una vez culminado el proceso de detección de TuYV en las muestras de colza evaluadas, se continuó con la secuenciación de fragmentos del genoma de TuYV y su análisis bioinformático.

Se realizó árboles filogenéticos con secuencias nucleotídicas que abarcan la secuencia codificante del dominio RTD y P3a, con secuencias aminoacídicas de la proteína P3-P5, con secuencias aminoacídicas de la proteína P3a y con secuencias nucleotídicas que abarcan un fragmento del gen que codifica para la polimerasa RdRp. Se observó una coincidencia en la topología del árbol generado con secuencias RTD y el árbol generado con secuencias de la proteína P3-P5 (cuya secuencia codificante está incluida en el fragmento RTD). En estos árboles se generaron tres grupos distintivos que coinciden con los reportados por Slavíková et al. [16]. Sin embargo, al analizar los otros árboles la distribución de las secuencias varió considerablemente. Esto brindó indicios sobre la posible existencia de eventos de recombinación en las secuencias virales. Al realizar un análisis de recombinación, se identificó eventos de recombinación en las muestras representativas de cada chacra evaluada. Esto explicó la distribución de las secuencias en los diferentes árboles filogenéticos realizados, brindando una posible explicación para la variabilidad encontrada en virus de origen uruguayo. Estos hallazgos resaltan la importancia de evaluar múltiples genes al realizar análisis filogenéticos y evolutivos, ya que, de haber culminado el análisis tras la coincidencia entre los primeros dos árboles generados, la existencia de eventos de recombinación podría haber pasado desapercibida. Idealmente, la secuenciación del genoma completo permitiría un análisis más profundo. Dada la dificultad para amplificar fragmentos de la región 5', una estrategia viable sería la secuenciación por NGS (*Next Generation Sequencing*), ya que este enfoque es independiente de la amplificación por PCR y permitiría obtener una caracterización más completa de los virus presentes en las diferentes muestras de colza.

El análisis de secuencias reveló una alta variabilidad entre las muestras de TuYV estudiadas, lo que dificulta la determinación de un posible origen del virus en Uruguay. Incluso se observó diferencias entre las secuencias nucleotídicas obtenidas (con los juegos de cebadores TuYV_Juego1 y TuYV_Juego3) a partir de diferentes plantas dentro de una misma chacra. Por lo tanto, la diversidad genética observada en los árboles filogenéticos probablemente no se deba a diferentes orígenes del virus, sino a una gran capacidad del virus para generar variabilidad. Sería interesante poder estudiar la variabilidad viral dentro de una misma planta y evaluar la posible divergencia. Para ello, se podría utilizar la secuenciación de genoma completo mediante tecnologías como Nanopore o PacBio que permitirían estudiar múltiples moléculas genómicas de una misma planta y, entre otras cosas, poder analizar la tasa de mutaciones e incidencia de recombinación.

En suma, los datos generados en este trabajo no permiten determinar con certeza el origen del virus en el país. No obstante, la cercanía filogenética de las secuencias uruguayas con las secuencias reportadas en Chile y Brasil sugiere un posible vínculo epidemiológico en la región.

7. Conclusiones

Se demostró la presencia del virus TuYV en cultivos de colza ubicados en cuatro chacras de los departamentos de Paysandú y Río Negro.

Se desarrolló un método de detección de TuYV por RT-PCR, que resultó ser específico según la verificación por secuenciación Sanger del 59% de las RT-PCR con resultado positivo.

Se validó el método de detección de TuYV por RT-PCR (desarrollado en este trabajo) con una técnica serológica por DAS-ELISA, utilizando el kit comercial *Loewe Biochemica GmbH Turnip Yellows Virus complete kit*.

Dieciocho de las 22 muestras analizadas resultaron positivas para TuYV utilizando el método de detección desarrollado y el kit *Loewe Biochemica GmbH Turnip Yellows Virus complete kit*, indicando una sensibilidad similar de ambos métodos.

Pruebas de RT-PCR con un juego de cebadores que permiten amplificar un fragmento de 158 pb permitió detectar el TuYV en las 22 muestras analizadas, indicando una mayor sensibilidad de la RT-PCR utilizando estos cebadores.

Mediante análisis filogenético y análisis de recombinación se evidenció una alta variabilidad genética del TuYV en Uruguay, coincidente con la variabilidad reportada en otras partes del mundo.

No se logró determinar el origen exacto del virus en Uruguay.

8. Referencias bibliográficas

[1] Raboanatahiry N, Li H, Yu L, Li M. Rapeseed (Brassica napus): Processing, utilization, and genetic improvement. Agronomy. 2021;11(9). doi:10.3390/agronomy11091776

[2] Greer SF, Hackenberg D, Gegas V, Mitrousia G, Edwards D, Batley J, Teakle GR, Barker GC, Walsh JA. Quantitative Trait Locus Mapping of Resistance to Turnip Yellows Virus in Brassica rapa and Brassica oleracea and Introgression of These Resistances by Resynthesis Into Allotetraploid Plants for Deployment in Brassica napus. Frontiers in Plant Science. 2021;12. doi:10.3389/fpls.2021.781385

[3] Hackenberg D, Asare-Bediako E, Baker A, Walley P, Jenner C, Greer S, Bramham L, Batley J, Edwards D, Delourme R, et al. Identification and QTL mapping of resistance to Turnip yellows virus (TuYV) in oilseed rape, Brassica napus. Theoretical and Applied Genetics. 2020;133(2):383–393. doi:10.1007/s00122-019-03469-z

[4] Asare-Bediako E. Brassicaceae - Turnip yellows virus interactions [PhD thesis]. University of Warwick. 2011 [citado 2025 Mar 10]. Disponible desde: https://wrap.warwick.ac.uk/44041/

[5] Vizi R, Kiss J, Turóczi G, Dobra N, Pálinkás Z. Turnip Yellows Virus Field Infection in Oilseed Rape: Does It Impact the Yield and Quality? Agronomy. 2023;13(9). doi:10.3390/agronomy13092404

[6] Colza, la sorpresa del año: "Está cerrando el mejor balance entre todos los cultivos de invierno". El País: Rurales. 2024 [citado 2025 Mar 10]. Disponible desde: https://rurales.elpais.com.uy/mercados/colza-la-sorpresa-del-ano-esta-cerrando-el-mejor-balance-entre-todos-los-cultivos-de-invierno

[7] FAO. FAOSTAT statistical database. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). [citado 2025 Mar 10]. Disponible desde: https://www.fao.org/faostat/en/#home

[8] Rava C. Colza: situación y perspectivas. Anuario OPYPA. 2022 [citado 2025 Mar 10]:217–235. Disponible desde: https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/anuario-opypa-2022/anuario-opypa-2022

[9] Rava C, Borges M, Ferraro B, Lanfranco B, Fernández E. El complejo oleaginoso en Uruguay en la zafra 2023/2024, sus desafíos y perspectivas. Revista INIA. 2024 [citado 2025 Mar 10];(79):33–37. Disponible desde: https://inia.uy/revista-inia-uruguay-ndeg-79-diciembre-2024

[10] Rava C, Borges M, Ferraro B, Lanfranco B, Fernández E. El complejo oleaginoso en Uruguay en la zafra 2022/2023 y sus perspectivas. Revista INIA. 2023 [citado 2025 Mar 10];(75):45–50. Disponible desde: https://www.inia.uy/revista-inia-uruguay-ndeg-75-diciembre-2023

[11] Couto P, Zanotta G, Arenare L, Fontan V, Fossati S, Gonzalez J, Lavista N, Mendez A, Palou G, Acosta I, et al. Encuesta Agrícola Invierno 2023. Oficina de Estadísticas

Agropecuarias (DIEA). 2023 [citado 2025 Mar 10]. Disponible desde: https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/noticias/diea-presenta-resultados-encuesta-agricola-invierno-2023

[12] URUPOV. Teledetección del Cultivo de Colza | Zafra 2024. URUPOV. 2024 [citado 2025 Mar 10]. Disponible desde: https://www.urupov.org.uy/wp-content/uploads/2024/12/INFORME-COLZA-2024-URUPOV-final.pdf

[13] Blasina y Asociados. La colza brilla en un mercado de granos con precios flojos. El Observador. 2024 [citado 2025 Mar 10]. Disponible desde: https://www.elobservador.com.uy/agro/la-colza-brilla-un-mercado-granos-precios-flojos-n5975098

[14] Lyonnet J. Uruguay va camino a duplicar el área de colza y carinata en la próxima zafra. Blasina y Asociados. 2025 [citado 2025 Mar 10]. Disponible desde: https://blasinayasociados.com/uruguay-va-camino-a-duplicar-el-area-de-colza-y-carinata-en-la-proxima-zafra/

[15] Greer SF, Surendran A, Grant M, Lillywhite R. The current status, challenges, and future perspectives for managing diseases of brassicas. Frontiers in Microbiology. 2023;14. doi:10.3389/fmicb.2023.1209258

[16] Slavíková L, Ibrahim E, Alquicer G, Tomašechová J, Šoltys K, Glasa M, Kundu JK. Weed Hosts Represent an Important Reservoir of Turnip Yellows Virus and a Possible Source of Virus Introduction into Oilseed Rape Crop. Viruses. 2022;14(11). doi:10.3390/v14112511

[17] Newbert MJ. The genetic diversity of Turnip yellows virus in oilseed rape (Brassica napus) in Europe, pathogenic determinants, new sources of resistance and host range [PhD thesis]. University of Warwick. 2016 [citado 2025 Mar 10]. Disponible desde: https://wrap.warwick.ac.uk/79104/

[18] Duffus JE, Russell GE. Serological and host range evidence for the occurence of beet western yellows virus in Europe. Phytopathology. 1970;60:1199–1202.

[19] Mayo MA. Virology Division News: ICTV at the Paris ICV: Results of the Plenary Session and the Binomial Ballot. Arch Virol. 2002 [citado 2025 Mar 10];147:2254–2260. Disponible desde: www.danforthcenter.org/iltab/ictvnet

[20] Asare-Bediako E, Jones JE, Hambidge AJ, Stevens M, Mead A, Jenner CE, Walsh JA. The incidence of turnip yellows virus in oilseed rape crops (Brassica napus L.) in three different regions of England over three consecutive growing seasons and the relationship with the abundance of flying Myzus persicae. Annals of Applied Biology. 2020 [citado 2025 Mar 10];176(2):130–137. Disponible desde: https://wrap.warwick.ac.uk/44041/. doi:10.1111/aab.12565

[21] Stevens M, McGrann G, Clark B. Turnip yellows virus (syn Beet western yellows virus): an emerging threat to European oilseed rape production? HGCA Research Review 69. 2008 [citado 2025 Mar 10]. Disponible desde: https://www.researchgate.net/publication/237460066

[22] Filardo F, Nancarrow N, Kehoe M, McTaggart AR, Congdon B, Kumari S, Aftab M, Trębicki P, Rodoni B, Thomas J, et al. Genetic diversity and recombination between turnip yellows virus strains in Australia. Archives of Virology. 2021;166(3):813–829. doi:10.1007/s00705-020-04931-w

[23] Smirnova E, Firth AE, Miller WA, Scheidecker D, Brault V, Reinbold C, Rakotondrafara AM, Chung BYW, Ziegler-Graff V. Discovery of a Small Non-AUG-Initiated ORF in Poleroviruses and Luteoviruses That Is Required for Long-Distance Movement. PLoS Pathogens. 2015;11(5). doi:10.1371/journal.ppat.1004868

[24] Al-Waeli M, Farzadfar S, Pourrrahim R. Complete Genome Sequence of Turnip yellows polerovirus from Iraq: Insight into the Factors Affecting the Genetic Variability of TuYV Populations. Basrah Journal of Agricultural Sciences. 2024;37(2):206–220. doi:10.37077/25200860.2024.37.2.16

[25] Macleod K, Greer SF, Bramham LE, Pimenta RJG, Nellist CF, Hackenburg D, Teakle GR, Barker GC, Walsh JA. A review of sources of resistance to turnip yellows virus (TuYV) in Brassica species. Annals of Applied Biology. 2023;183(3):200–208. doi:10.1111/aab.12842

[26] Delfosse VC, Barrios Barón MP, Distéfano AJ. What we know about poleroviruses: Advances in understanding the functions of polerovirus proteins. Plant Pathology. 2021;70:1047–1061. doi:10.1111/ppa.13368

[27] Schliephake E, Graichen K, Rabenstein F. Investigations on the vector transmission of the Beet mild yellowing virus (BWYV) and the Turnip yellows virus (TuYV). Journal of Plant Diseases and Protection. 2000;107(1):81–87.

[28] Verdier M, Boissinot S, Baltenweck R, Negrel L, Brault V, Ziegler-Graff V, Hugueney P, Scheidecker D, Krieger C, Chesnais Q, et al. The Turnip Yellows Virus Capsid Protein Promotes Access of Its Main Aphid Vector Myzus persicae to Phloem Tissues. Plant, Cell and Environment. 2024 Mar 1. doi:10.1111/pce.15303

[29] Yadav S, Rathee M. Sucking Pests of Rapeseed-Mustard. In: Omkar, editor. Sucking Pests of Crops. Springer Nature Singapore Pte Ltd. 2020; 2020. p. 187–232. doi:10.1007/978-981-15-6149-8

[30] Jay CN, Rossall S, Smith HG. Effects of beet western yellows virus on growth and yield of oilseed rape (Brassica napus). Journal of Agricultural Science. 1999;133(2):131–139. doi:10.1017/S0021859699006711

[31] Kwak M, Troiano E, Kil EJ, Parrella G. High-throughput sequencing detected a virus–viroid complex in a single pokeweed plant. Frontiers in Plant Science. 2024;15. doi:10.3389/fpls.2024.1435611

[32] Ibrahim E, Rychlá A, Alquicer G, Slavíková L, Peng Q, Klíma M, Vrbovský V, Trebicki P, Kundu JK. Evaluation of Resistance of Oilseed Rape Genotypes to Turnip Yellows Virus. Plants. 2023;12(13). doi:10.3390/plants12132501

[33] Puthanveed V, Singh K, Poimenopoulou E, Pettersson J, Siddique AB, Kvarnheden A. Milder Autumns May Increase Risk for Infection of Crops with Turnip Yellows Virus. Phytopathology. 2023;113(9):1788–1798. doi:10.1094/PHYTO-11-22-0446-V

[34] Gutiérrez Sánchez PA, Jaramillo Mesa H, Marín Montoya M. Next generation sequence analysis of the forage peanut (Arachis pintoi) virome. Revista Facultad Nacional de Agronomia Medellin. 2016;69(2):7881–7891. doi:10.15446/rfna.v69n2.59133

[35] Zamorano A, Carevic P, Gamboa C, Cui W, Curkovic T, Córdova P, Higuera G, Ramos-Castillo L, Quiroga N, Fiore N. Old and New Aphid-Borne Viruses in Coriander in Chile: An Epidemiological Approach. Viruses. 2024;16(2). doi:10.3390/v16020226

[36] Greer SF, Newbert MJ, Rodrigues LK, Oliveira AM, Chaves ALR, Calegario RF, Barker GC, Eiras M, Walsh JA. First report of Turnip yellows virus in Brazil. New Disease Reports. 2021;44(2). doi:10.1002/ndr2.12045

[37] Berry PM, Spink JH. A physiological analysis of oilseed rape yields: Past and future. Journal of Agricultural Science. 2006;144(5):381–392. doi:10.1017/S0021859606006423

[38] Castro M, Stewart S, Vázquez D, Morales X, Manaslisky S, Castro B. Resultados experimentales de la Evaluación Nacional de Cultivares de Colza - Período 2021. INASE-INIA. 2022 Jan 31 [citado 2025 Mar 10]. Disponible desde: https://www.inia.org.uy/convenio_inase_inia/Evaluacion_CI/Ano2021/PubColzaPeriodo2021.pdf

[39] Castro M, Stewart S, Vázquez D, Morales X, Manaslisky S, Castro B. Resultados experimentales de la Evaluación Nacional de Cultivares de Colza - Período 2022. INASE-INIA. 2023 Jan 24 [citado 2025 Mar 10]. Disponible desde: https://www.inia.org.uy/convenio_inase_inia/Evaluacion_CI/Ano2022/PubColzaPeriodo2022.pdf

[40] Castro M, Stewart S, Vázquez D, Morales X, Manaslisky S, Castro B. Resultados experimentales de la Evaluación Nacional de Cultivares de Colza - Período 2023. INASE-INIA. 2024 Jan 26 [citado 2025 Mar 10]. Disponible desde: https://www.inia.org.uy/convenio_inase_inia/Evaluacion_CI/Ano2023/PubColzaPeriodo2023.pdf

[41] Castro M, Stewart S, Vázquez D, Morales X, Aquino C, Castro B. Resultados experimentales de la Evaluación Nacional de Cultivares de Colza - Período 2024. INASE-INIA. 2025 Jan 31 [citado 2025 Mar 10]. Disponible desde: https://www.inia.org.uy/convenio_inase_inia/Evaluacion_CI/Ano2024/PubColzaPeriodo2024.pdf

[42] Congdon BS, Kehoe MA, Filardo FF, Coutts BA. In-field capable loop-mediated isothermal amplification detection of Turnip yellows virus in plants and its principal aphid vector Myzus persicae. Journal of Virological Methods. 2019;265:15–21. doi:10.1016/j.jviromet.2018.12.014

[43] Jeong J-J, Ju H-J, Noh J. A Review of Detection Methods for the Plant Viruses. Research in Plant Disease. 2014;20(3):173–181. doi:10.5423/rpd.2014.20.3.173

[44] Resolución N° 60/019 DGSA: Extender la exigencia de presentación de receta profesional y los términos requeridos para la misma que se establecen en el decreto Nº482/009 para la compraventa de productos insecticidas (importados o fabricación nacional). Dirección General de Servicios Agrícolas | Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. 2019 [citado 2025 Mar 10]. Disponible desde: https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/institucional/normativa/resolucion-n-60019-dgsa-extender-exigencia-presentacion-receta-profesional

[45] Yang H, Liu J, Huang S, Guo T, Deng L, Hua W. Selection and evaluation of novel reference genes for quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) based on genome and transcriptome data in Brassica napus L. Gene. 2014;538(1):113–122. doi:10.1016/j.gene.2013.12.057

[46] Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. Molecular Biology and Evolution. 2021;38(7):3022–3027. doi:10.1093/molbev/msab120

[47] Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T. Creating the CIPRES Science Gateway for Inference of Large Phylogenetic Trees. New Orleans, LA, USA; 2010. doi:10.1109/GCE.2010.5676129.

[48] Stamatakis A. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. Bioinformatics. 2014;30(9):1312–1313. doi:10.1093/bioinformatics/btu033

[49] Martin DP, Murrell B, Golden M, Khoosal A, Muhire B. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. Virus Evolution. 2015;1(1). doi:10.1093/ve/vev003

[50] Thermo Fisher Scientific. Thermo Scientific NanoDrop Spectrophotometers Nucleic acid measurements. [citado 2025 Mar 10]. Disponible desde: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/manuals/ts-nanodrop-nucleicacid-olv-r2.pdf

[51] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Research. 2000;28(12).

[52] Supakitthanakorn S, Vichittragoontavorn K, Sunpapao A, Kunasakdakul K, Thapanapongworakul P, Ruangwong OU. Tobacco Mosaic Virus Infection of Chrysanthemums in Thailand: Development of Colorimetric Reverse-Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT–LAMP) Technique for Sensitive and Rapid Detection. Plants. 2022;11(14). doi:10.3390/plants11141788

[53] Supakitthanakorn S, Vichittragoontavorn K, Kunasakdakul K, Mukjang N, Phuakjaiphaeo C, Ruangwong OU. Development of Colorimetric Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Technique for Rapid, Sensitive and Convenient Detection of

Chrysanthemum Chlorotic Mottle Viroid (CChMVd) in Chrysanthemum. Chiang Mai Journal of Science. 2022;49(5):1296–1306. doi:10.12982/CMJS.2022.079

[54] Çelik A, Morca AF, Emiralioğlu O, Yeken MZ, Özer G, Çiftçi V. The use of colorimetric loop-mediated isothermal amplification assay for naked-eye detection of bean common mosaic virus. Physiological and Molecular Plant Pathology. 2023;125. doi:10.1016/j.pmpp.2023.102017

[55] Li C, Guo S, Sun M, Niu J, Yin C, Du W, Zhao J, Liu D, Yue A. A Colorimetric RT-LAMP Assay for Rapid Detection of Soybean mosaic Virus SC15. ACS Omega. 2024;9(27):29765–29775. doi:10.1021/acsomega.4c03372

9. Anexos

9.1. Anexo 1 – Secuencias utilizadas en los análisis filogenéticos

Tabla 9. Secuencias de TuYV de la base de datos de NCBI, obtenidas mediante búsqueda por BLAST, utilizadas para la generación de árboles filogenéticos

Secuencia nucleotídica de TuYV (Accession N°)	Secuencia proteína P3-P5 (Accession N°)	Secuencia proteína P3a (Accession N°)	Origen	Año de colecta	Grupo en árbol RTD (Figura 20)
HQ388349.1			China	2008	3
HQ388350.1			China	2009	3
HQ388351.1			China	2009	3
JN015068.1			China	2010	3
JQ862472.1			Australia	2011	2
KF015269.1			China	2011	3
KF923236.1			Corea del Sur	2011	2
KR706247.1	ALL26144.1		China	2013	1
KU198395.1			Sudáfrica	2014	2
KU726090.1	APG31661.1		Colombia	2014	2
KU726091.1	APG31667.1		Colombia	2014	2
KY310572.1			China	2015	3
LC428358.1	BBG75736.1	BBG75735.1	Japón	2015	3
LC428359.1	BBG75743.1		Japón	2015	3
LC428360.1	BBG75750.1		Japón	2015	3
LC428361.1	BBG75757.1		Japón	2017	3
LC428362.1	BBG75764.1		Japón	2016	3
LC428363.1	BBG75771.1	BBG75770.1	Japón	2017	3
LC428364.1	BBG75778.1		Japón	2014	3
LC428365.1	BBG75785.1		Japón	2017	3
LC701523.1	BDH21061.1		Australia	2019	2
LR584019.1			Australia*	2019*	2
LR584020.1			Australia*	2019*	2
LR584021.1			Australia*	2019*	2
LR584024.1			Australia*	2019*	1
LR584025.1			Australia*	2019*	2
LR584026.1			Australia*	2019*	2
LR584027.1			Australia*	2019*	2
MF314820.1			China	2014	3
MH427277.1			Australia	2014	3
MH579714.1			Estados Unidos	2018*	2
MK057527.1			China	2014	3
MK450519.1	QBG64847.1	QBG64843.1	Alemania	2006	1

MK450520.1	QBG64852.1		Alemania	2016	1
MK616236.1			China	2017	3
MK751486.1			China	2017	3
MN497800.1			Alemania	2016	1
MN497801.1	QKG32979.1		Alemania	2017	1
MN497802.1	QKG32985.1		Alemania	2018	1
MN497803.1	QKG32991.1		Alemania	2016	2
MN497804.1	QKG32997.1		Alemania	2018	1
MN497805.1	QKG33003.1		Alemania	2016	1
MN497806.1	QKG33009.1		Alemania	2017	1
MN497807.1	QKG33015.1		Alemania	2018	1
MN497808.1	QKG33021.1		Alemania	2016	2
MN497809.1	QKG33027.1		Alemania	2016	1
MN497810.1			Alemania	2017	2
MN497811.1	QKG33039.1		Alemania	2018	1
MT586571.1	QOY46891.1		Australia	2004	3
MT586572.1	QOY46898.1	QOY46897.1	Australia	2016	3
MT586573.1	QOY46905.1		Australia	2016	3
MT586574.1	QOY46912.1	QOY46911.1	Australia	2016	3
MT586575.1	QOY46919.1		Australia	2016	3
MT586576.1			Australia	2014	3
MT586577.1	QOY46933.1		Australia	2015	2
MT586578.1	QOY46940.1		Australia	2015	2
MT586579.1	QOY46947.1		Australia	2016	2
MT586580.1	QOY46954.1		Australia	2016	2
MT586581.1	QOY46961.1		Australia	2015	2
MT586582.1	QOY46968.1		Australia	2018	2
MT586583.1	QOY46975.1		Australia	2015	2
MT586584.1			Australia	2016	2
MT586585.1			Australia	2016	2
MT586586.1	QOY46996.1	QOY46995.1	Australia	2016	2
MT586587.1	QOY47003.1		Australia	2017	2
MT586588.1			Australia	2016	2
MT586589.1	QOY47017.1		Australia	2016	2
MT586590.1	QOY47024.1		Australia	2016	2
MT586591.1	QOY47031.1		Australia	2016	1
MT586592.1	QOY47038.1		Australia	2012	1
MT586593.1	QOY47045.1		Australia	2016	1
MT586594.1	QOY47052.1		Australia	2014	1
MT586595.1	QOY47059.1		Australia	2016	1
MT586596.1	QOY47068.1	QOY47065.1	Australia	2015	1
MT586597.1	QOY47073.1		Australia	2018	1
MT586598.1	QOY47080.1		Australia	2017	1

MT955607.1	QSG73600.1	QSG73597.1	Grecia	2018	1
MT955608.1	QSG73607.1	QSG73603.1	Grecia	2018	2
MT955609.1	QSG73614.1	QSG73610.1	Grecia	2018	2
MT955610.1	QSG73621.1		Grecia	2018	2
MT955611.1	QSG73628.1		Grecia	2018	2
MW537050.1			Filipinas	2017	2
MW854285.1	QYA72423.1		Alemania	2021*	1
MZ313372.1	UGD08560.1		Brasil	2017	2
MZ442679.1			Turquía	2019	1
MZ666129.1			China	2020	3
NC_003743.1	NP_620487.1	YP_009179206.1	Francia*	1988*	1
NC_016038.2			China	2008	3
OK030750.1	UGN61229.1		Reino Unido	2019	1
OK030767.1	UGN61086.1		Reino Unido	2019	1
OK030769.1			Reino Unido	2019	2
OK030770.1	UGN61101.1		Reino Unido	2019	1
OK030771.1	UGN61107.1		Reino Unido	2019	2
OK030772.1	UGN61113.1		Reino Unido	2019	1
OK030773.1	UGN61119.1		Reino Unido	2019	1
OK030774.1	UGN61125.1		Reino Unido	2019	1
OK030778.1	UGN61136.1		Reino Unido	2019	1
OK030780.1			Reino Unido	2019	1
OK030781.1	UGN61151.1		Reino Unido	2019	1
OK030782.1	UGN61157.1		Reino Unido	2019	1
OK030783.1	UGN61163.1		Reino Unido	2019	1
OK030784.1	UGN61169.1		Reino Unido	2019	2
OK030785.1	UGN61175.1		Reino Unido	2019	2
OK030788.1	UGN61181.1		Reino Unido	2019	2
OK030789.1	UGN61187.1		Reino Unido	2019	1
OK030790.1	UGN61193.1		Reino Unido	2019	1
OK030791.1	UGN61199.1		Reino Unido	2019	2
OK030792.1	UGN61205.1		Reino Unido	2019	2
OK030793.1	UGN61211.1		Reino Unido	2019	2
OK030794.1	UGN61217.1		Reino Unido	2007	1
OK030798.1	UGN61223.1		Reino Unido	2019	2
OM469309.1	UOG94995.1		Australia	2019	3
ON060762.1			China	2020	3
ON804808.1			China	2020	3
ON804809.1			China	2020	3
ON804810.1			China	2020	3
OP183548.1	WFJ08527.1		Alemania	2017	1
OP485286.1			China	2020	3
OP562900.1	WBY50542.1		Eslovaquia	2017*	2

OP699025.1	WAB58512.1		República Checa	2019	2
OP699028.1	WAB58521.1		República Checa	2019	2
OP699039.1	WAB58554.1		República Checa	2019	2
OP699041.1	WAB58560.1		República Checa	2019	2
OP719311.1	WDZ04303.1		Suecia	2019	1
OP797722.1	WDD45000.1		Reino Unido	2021	2
OQ377541.1	WIC44028.1		Australia	2019	3
OQ469815.1			China	2013	3
OQ632303.1	WQB05947.1		Italia	2021	1
OQ632304.1	WQB05953.1		Italia	2021	3
OR536957.1	WNK12383.1		Chile	2020	1
OR734903.1			Corea del Sur	2020	3
PP171755.1			Australia	2021	2
PP503019.1	WYC12584.1		Alemania*	2024*	1
X13063.1			Francia*	1988*	1
	ACF48396.1		China	2008*	
	ACF48402.1		China	2008*	
	ADR74374.1		China	2009	
	ADR74380.1		China	2009	
	AIX02799.1		Corea del Sur	2012	
	AND83065.1		Francia	2011	
	AND83071.1		Francia	2013	
	AND83077.1		Francia	2013	
	AVI15637.1		Estados Unidos	2014	
	BAP16756.1		Japón	2014	
	BAP16763.1		Japón	2014*	
	BAP16768.1		Japón	2014*	
	BAP16773.1		Japón	2014*	
	BAP16788.1		Japón	2014*	
	BAW27640.1		Corea del Sur	2012	
	BBG75687.1		Japón	2015	
	BBG75694.1		Japón	2015	
	BBG75708.1		Japón	2014	
	BBG75715.1		Japón	2017	
	BBG75722.1		Japón	2017	
	BBG75729.1		Japón	2017	
	BCM78812.1		Corea del Sur	2019	
	NP_840098.1		Estados Unidos*	2002*	
	P09515.2		Francia*	1988*	
	QHB45573.1		China	2016	
	QHB45578.1		China	2016	
	QJA10630.1		China	2017	

	UKD40713.1		China	2017	
	UOW59964.1		Corea del Sur	2012	
	UOW59970.1		Corea del Sur	2012	
	UUT43404.1		Estados Unidos	1993	
	UUT43415.1		Estados Unidos	2018*	
	UXK95480.1		Chipre	2015	
	UYW66195.1		Corea del Sur	2021	
	WAB58506.1		República Checa	2019	
	WAB58509.1		República Checa	2019	
	WAB58515.1		República Checa	2019	
	WAB58518.1		República Checa	2019	
	WAB58524.1		República Checa	2018	
	WAB58527.1		República Checa	2019	
	WAB58530.1		República Checa	2018	
	WAB58533.1		Eslovaquia	2019	
	WAB58536.1		Eslovaquia	2019	
	WAB58539.1		República Checa	2018	
	WAB58542.1		República Checa	2019	
	WAB58545.1		Eslovaquia	2019	
	WAB58548.1		República Checa	2019	
	WAB58551.1		República Checa	2019	
	WAB58557.1		República Checa	2018	
	WAB58563.1		Eslovaquia	2019	
	WAB58566.1		República Checa	2018	
	WAB58569.1		República Checa	2018	
	WAB58572.1		República Checa	2019	
	WAB58575.1		República Checa	2019	
	WAB58578.1		República Checa	2018	
	WAB58581.1		Eslovaquia	2019	
	WBG54101.1		Estados Unidos	2022*	
	WBG54142.1		Estados Unidos	2017	
	WKE35844.1		Corea del Sur	2021	
	WKE35870.1		Corea del Sur	2021	
		BBG75686.1	Japón	2015	
		BBG75714.1	Japón	2017	
		WBG54106.1	Estados Unidos	2022*	
		WBG54147.1	Estados Unidos	2017	
KX650867.1			China	2015	
LC726802.1			China	2019	
MH427303.1			Australia	2014	

* Datos que no están especificados en los datos provistos por el NCBI, por lo que se tomó el dato de año y/o lugar de colecta descrito en la publicación asociada a la secuencia.