

628  
/CM  
AM

**Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria  
FONDO DE PROMOCIÓN DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA**

**CONVENIO DE VINCULACION TECNOLOGICA  
Entre INIA y la Universidad de la República**

**POR UNA PARTE:** el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, (en adelante INIA), con domicilio a estos efectos en Ruta 50 Km 11, departamento de Colonia, representado en este acto por el Dr. Alvaro Roel en su calidad de Presidente, **y POR OTRA PARTE:** la Universidad de la República, a través de la Facultad de Ciencias (en adelante, el Ejecutor), con domicilio en Iguá 4225, Montevideo, representado en este acto por el Dr. Rodrigo Arocena, acuerdan en celebrar el presente Convenio:

**1°. Antecedentes**

I.- El INIA realizó un llamado a interesados en presentar propuestas de investigación, relativas al sector agropecuario, a ser financiado a través del Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria (en adelante, FPTA) de dicho Instituto.

II.- El Ejecutor, en respuesta a dicho Llamado, presentó su Propuesta.

III.- Por resolución de la Junta Directiva de INIA N° 4203/13, de fecha 6 de noviembre de 2013, luego de realizar un análisis exhaustivo de la pertinencia y calidad de las propuestas formuladas para el llamado FPTA 2012, se resolvió aprobar el financiamiento del Proyecto del Ejecutor.

IV.- En su mérito, procede formalizar el presente Convenio de Vinculación Tecnológica.

**2° Objeto**

El INIA y el Ejecutor se vinculan con el propósito de llevar a cabo el Proyecto conjunto cuyo título es **"Diagnóstico, caracterización molecular y regionalización de virus y viroides de gran impacto para el sector cítrico nacional."**, (en adelante "el proyecto") conforme a la Propuesta presentada (Anexo 1) y ajustado a lo expresado en el presente Convenio. Los Términos de Referencia del Técnico Responsable del Proyecto (Anexo 2) y el Acuerdo con Terceros (Anexo 3), se adjuntan y forman parte de este Convenio. ✓

**3° Monto total del Proyecto**

El INIA aportará la suma de **U\$S 151.104** (dólares americanos ciento cincuenta y un mil, ciento cuatro) con recursos provenientes del Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria, creado por el artículo 18 de la ley 16.065 de 6 de octubre de 1989 y en la Resolución N° 89/91 de 30 de julio de 1991 de la Junta Directiva del INIA. Un 10 % (diez por ciento) de este monto, se destinará al financiamiento de gastos de análisis, supervisión y seguimiento del Proyecto. ✓

**4. Plazo**

El presente Convenio tendrá una vigencia de **36** meses a partir del día **1° de Julio de 2014**. En caso de no finalizar el proyecto en el período estipulado, la posibilidad de su prórroga será prerrogativa del INIA. A los efectos, el INIA evaluará la ejecución global técnico- financiera del mismo una vez finalizado el plazo previamente establecido. La prórroga que eventualmente pueda disponerse por parte de INIA no excederá el término de seis meses. ✓

#### **5°. Contraparte técnica del INIA**

El INIA integrará una Contraparte constituida por:

- La Gerencia Programática-Operativa, que nucleará la información y documentación respecto al avance y logros del Proyecto, y coordinará la ejecución técnica con la financiera.
- La Gerencia de Administración y Finanzas, que analizará y evaluará la administración y ejecución financiera del Proyecto.
- Uno o más especialistas en el área de investigación objeto de este Convenio, que supervisarán y evaluarán la marcha e informes técnicos del Proyecto.

#### **6°. Obligaciones del Ejecutor**

El Ejecutor declara conocer y aceptar todas condiciones, requisitos y procedimientos del Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria y, en particular, se obliga a:

- I. Cumplir el objetivo general y los objetivos específicos, desarrollar las actividades programadas y alcanzar sus resultados esperados, de acuerdo al documento del Proyecto y cronograma de ejecución técnico y presupuestal del mismo.
- II. Tomar los recaudos necesarios y ponerlos a disposición de INIA para que éste pueda proceder al registro o protección de los productos y o procesos susceptibles de amparo jurídicos, que eventualmente puedan resultar de la investigación o estudio objeto de este Convenio.
- III. Preparar y entregar a INIA los documentos que a continuación se indican, los que serán analizados para su aprobación por la Contraparte técnica mencionada en la cláusula 5ta:
  - a) Un informe de avance semestral al 30 de Junio y 31 de Diciembre de cada año, donde se detallará el estado de ejecución del proyecto. Deberán incluirse en el mismo los avances obtenidos hasta ese momento, con las observaciones que se consideren pertinentes.
  - b) Un Informe Final del Proyecto, según pautas fijadas por INIA, que recoja toda la información científica generada y los resultados del Proyecto, sin perjuicio de los datos e informes parciales que durante la ejecución del mismo se recaben.
  - c) Preparar y entregar a INIA toda la información requerida para ejercer los derechos de propiedad intelectual y proceder al registro o protección de los productos y o procesos que puedan resultar de la investigación o estudio objeto de este convenio.
  - d) Un documento para publicar, de acuerdo al formato propuesto por INIA. El mismo deberá ser presentado en forma conjunta con el Informe Final. La entrega de este artículo y el Informe Final serán condición previa para el último desembolso del proyecto. El INIA podrá publicar el mencionado documento con cargo al Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria.
- IV. Rendir cuentas por los fondos recibidos de INIA, de conformidad con lo previsto en la cláusula 8ª.
- V. Recabar el compromiso de los terceros previstos en su propuesta (instituciones, tesis, evaluadores de tesis, consultores u otras figuras vinculados al Proyecto), mediante la firma del Compromiso que se adjunta al presente Convenio como Anexo 3, debiéndolo entregar a INIA a efectos de habilitar los desembolsos.

3

- VI. En caso de requerir la participación de un tercero no previsto en la propuesta, el Ejecutor deberá recabar la previa aceptación expresa de INIA. Una vez aprobado, el Ejecutor deberá recabarle su compromiso mediante la firma del Anexo 3. El incumplimiento de alguno de estos requisitos habilita a INIA a suspender los desembolsos hasta tanto los mismos sean subsanados.

### **7°. Seguimiento del Proyecto**

El INIA queda expresamente facultado para:

- A. Reunir periódicamente a los responsables de la ejecución de la o las organizaciones intervinientes en el Proyecto, para que presenten y examinen los trabajos en marcha o cuya ejecución se propone.
- B. Efectuar el seguimiento, control y evaluación de las actividades previstas y establecer el grado de avance del Proyecto. Para ello, podrá solicitar información referida a resultados alcanzados y objetivos cumplidos, ejecución financiera y cumplimiento del programa presupuestal, disponibilidad de fondos, así como cualquier otra información que considere pertinente sobre el desarrollo del mismo.

### **8°. Administración y ejecución financiera**

Constituyen el marco financiero del Convenio, los procedimientos que con relación al programa presupuestal, a continuación se mencionan.

- A. Administrador. Previo a efectuarse los desembolsos por parte de INIA, el ejecutor deberá identificar a la persona o entidad responsable de la administración de los fondos que le sean otorgados como consecuencia del presente Convenio.
- B. Desembolsos
  - En oportunidad de cada desembolso que efectúe el INIA, las contrapartes librarán el recibo oficial correspondiente.
  - El INIA desembolsará un 85% del monto total aprobado al Proyecto. Constituirá un Fondo Rotatorio para cubrir los gastos relacionados con la ejecución del Proyecto. El mismo no excederá del 15% sobre el monto aprobado. Para obtener el desembolso de los recursos remanentes, el Ejecutor deberá presentar las correspondientes rendiciones finales de la utilización del Fondo Rotatorio. El INIA desembolsará hasta la suma debidamente rendida presentada en tal instancia. La fecha límite correspondiente a este último desembolso será determinada por I.N.I.A..
  - El INIA podrá ampliar o renovar el Fondo Rotatorio si así se le solicita justificadamente, a medida que se utilicen los recursos; asimismo podrá reducirlo o cancelarlo en el caso que determine que los recursos suministrados exceden las necesidades del Proyecto.
  - Tanto la constitución como la renovación del Fondo Rotatorio se considerarán desembolsos para los efectos de este Contrato.
  - En los proyectos en donde se requiera la participación de terceros, INIA se reserva el derecho a no efectuar los desembolsos hasta tanto el Ejecutor no remita el Compromiso firmado por esos terceros (Anexo 3). Del mismo modo, en caso de que el Ejecutor requiera la participación de terceros no previstos en la Propuesta, INIA podrá suspender los desembolsos hasta tanto no se cuenta con la aprobación expresa y con la firma del Compromiso (Anexo 3).
  - Se podrá suspender los desembolsos al Ejecutor, hasta tanto no se dé cumplimiento a lo dispuesto con relación a las obligaciones del mismo, establecidas en las cláusulas 6ª y en la presente, de este Convenio, incluyendo la justificación en forma

razonable del uso de fondos de este financiamiento. Asimismo, será causal de suspensión de desembolsos, el surgimiento de circunstancias extraordinarias que a juicio de INIA, hagan improbable que el Ejecutor pueda cumplir las obligaciones contraídas en dicho Convenio, o que no permitan satisfacer los propósitos que se tuvieron en cuenta al celebrarlo.

- A menos que se haya acordado con el Ejecutor, expresamente y por escrito prorrogar los plazos para efectuar los desembolsos, la porción del Fondo que no hubiere sido comprometida o desembolsada, según sea el caso, dentro del correspondiente plazo, quedará automáticamente cancelada.
- El INIA podrá efectuar desembolsos a su vez, mediante pagos por cuenta de los Ejecutores y de acuerdo con él, por sumas no inferiores a U\$S 5.000 (dólares americanos cinco mil), o mediante otro método que las partes acuerden por escrito.

C. Rendiciones de cuentas

- Las rendiciones de cuentas de los fondos provistos por el Financiamiento y los Ejecutores, que se presenten durante la ejecución del Proyecto, deberán cumplir con las formalidades establecidas.
- Al 30 de Junio y 31 de Diciembre de cada año, el ejecutor deberá presentar un estado financiero, donde se detallará la ejecución presupuestal, conjuntamente con la rendición de cuentas completa a esa fecha. El plazo para la presentación de este informe, que resulta indispensable para el trabajo de evaluación de la auditoría externa, será de 20 días corridos.
- Los eventuales cambios de rubros en el presupuesto originalmente aprobado, deben ser debidamente justificados y obtener aprobación por la Contraparte, previamente a su consideración en la rendición de cuentas respectiva.

D. Auditorías

El INIA podrá disponer la realización de auditorías financiero - contables y de gestión de los proyectos, si así lo entendiere conveniente.

E. Responsabilidad administrativa en materia financiero - contable.

El Ejecutor declara que para la implementación de las actividades en materia financiero-contable que conlleva el presente Convenio de vinculación tecnológica observará las disposiciones legales y reglamentarias vigentes en la materia, particularmente el Texto Ordenado de Contabilidad y Administración Financiera (TOCAF) y Normas de Conducta en la Función Pública (Decreto 30/003). Cualquier apartamiento a estas disposiciones que pudiera eventualmente producirse será de exclusiva responsabilidad del Ejecutor

F. Bienes adquiridos en el marco del Proyecto.

Los bienes que se financien con recursos provenientes de fondo de Promoción de tecnología Agropecuaria, se dedicarán exclusivamente para los fines del Proyecto, y deberán ser adquiridos a nombre de INIA, y serán propiedad de éste. La Junta Directiva del INIA tiene la potestad de transferir los mismos al Ejecutor del Proyecto, a título comodato u otro que convengan, si así lo entendiere conveniente, una vez finalizado y aprobado el informe final y entregado el artículo para publicar referido en la cláusula 6.III.d. y el informe de cierre elaborado por las Contraparte.

**9°.** Responsabilidades laborales

El presente convenio no implicará, de ninguna manera, el reconocimiento de derechos laborales, sociales, previsionales, de la seguridad social ni ningún otro a favor de los recursos humanos por una de las partes con relación a la otra, de manera que en todo momento los recursos humanos involucrados en la ejecución del Proyecto mantendrán su relación contractual solamente con la entidad signataria del presente con la cual

4/27  
M

establecieron originalmente su vinculación, aún en caso de desarrollar tareas de investigación en lugares físicos pertenecientes a la otra, por lo cual las partes se comprometen a mantenerse recíprocamente indemnes en estos temas. Para el caso que la persona se desempeñare originalmente en ambas entidades, su relación para con cada una de ellas continuará en forma independiente, no implicando este acuerdo modificación alguna al respecto.

En mérito a lo precedentemente expresado, será obligación exclusiva del Ejecutor, atender los requerimientos de los recursos humanos que por su cuenta implique en la ejecución del Proyecto, ya sean personales o del Banco de Previsión Social, Ministerio de Trabajo y Seguridad Social, Banco de Seguros del Estado o de cualquier otro organismo público y/o privado.

Los recursos humanos que el Ejecutor requiera para la realización del proyecto, deberá ser debidamente documentada a través de los instrumentos legales que correspondan, registrando en términos expresos todas las obligaciones contenidas en el presente Convenio, en especial la confidencialidad y protección de los resultados. Esta documentación deberá acreditarse ante INIA en oportunidad de rendir gastos por este concepto.

El INIA se reserva el derecho de exigir al Ejecutor, antes de efectuar la entrega de cualquier suma que le corresponda bajo el presente Convenio, que justifique que sus integrantes se encuentran al día en el pago de sus obligaciones laborales y de seguridad social. En caso que el Ejecutor no justifique lo antedicho dentro del plazo de cinco días corridos contados desde el pedido formulado por INIA, éste tendrá derecho a retener la suma que corresponda hasta la justificación que deberá hacer el Ejecutor a satisfacción de INIA.

#### **10°. Participación de terceros**

Fuera de los casos previstos en la Propuesta, el Ejecutor no podrá subcontratar ni ceder, total ni parcialmente, ninguna de las obligaciones que son puestas a su cargo en virtud del presente contrato, salvo que cuenta con el previo consentimiento expreso de INIA.

En todos los casos en que el Ejecutor requiera la participación de un tercero (ya sea por estar previsto en la propuesta o por ser admitido por INIA posteriormente), será obligación del Ejecutor recabarle la ratificación del presente Convenio, mediante la firma del Compromiso que se adjunta como Anexo 3. La omisión de dicho requisito habilita a INIA a retener los desembolsos al Ejecutor, hasta tanto se cumpla en formalizar dicha ratificación.

#### **11°. Rescisión**

El presente Convenio podrá ser rescindido de común acuerdo entre las partes.

El INIA podrá rescindir, en forma administrativa y sin necesidad de declaración judicial, el convenio de vinculación tecnológica cuando se hubieren constatado incumplimientos o violaciones de cualquiera de las cláusulas establecidas, previa comunicación escrita y luego que la otra parte no hubiere remediado dicho incumplimiento dentro de los treinta días de recibida la comunicación del mismo por medio fehaciente.

En caso de verificarse la rescisión del presente Convenio de Vinculación Tecnológica los árbitros (clausula 18) previstos en el presente Convenio, analizará y laudará respecto a las compensaciones, daños y perjuicios, así como respecto a cualquiera otra situación no prevista en el Convenio que amerite ser laudada a consecuencia de la rescisión.

SM  
ML

### **12°. Propiedad intelectual**

Los resultados, productos y/o procesos que puedan obtenerse en el Proyecto objeto de este Convenio, susceptibles del amparo jurídico como tales, así como la titularidad, distribución y gastos, ha sido acordada entre las partes de la siguiente forma: 50% (cincuenta por ciento) para cada parte.

### **13°. Difusión de la información**

El INIA tendrá derecho a una licencia sin cargo, no exclusiva e irrevocable en todos los países para traducir, reproducir y distribuir públicamente artículos científicos, informes y libros técnicos que resulten directamente del proyecto al que refiere el presente Acuerdo. Las copias distribuidas públicamente de los trabajos protegidos por derechos de autor y elaborados conforme a la presente disposición incluirán los nombres de los autores de dicho trabajo y demás participantes del proyecto, a menos que éstos expresamente soliciten no ser nombrados.

En el caso que el Ejecutor realice la difusión de la investigación a través de cualquier medio tanto oral como escrito (conferencias, docencia, ponencias en congresos, publicaciones, etc.) deberá mencionar en forma expresa la identificación de las fuentes de financiamiento del proyecto. La información a difundir deberá ser previamente revisada por el INIA, el cual si no estuviere de acuerdo con su contenido, podrá solicitar las modificaciones o aclaraciones necesarias y exigir que se mencionen las fuentes de financiamiento en forma destacada.

### **14°. Confidencialidad**

Las Partes se obligan a manejar con absoluta reserva toda la información referida al Proyecto y aquella de propiedad de cada Parte que sea entregada en calidad de confidencialidad. A tal efecto, el Ejecutor exigirá las mismas condiciones a terceros participantes como ser instituciones, tesis, evaluadores de tesis, consultores u otras figuras vinculados al Proyecto, mediante la firma del Compromiso adjunto al presente convenio (Anexo 3).

Durante la vigencia de este Convenio de Vinculación Tecnológica y luego de la terminación del mismo, el Ejecutor se compromete a mantener en reserva y no divulgar por cualquier medio (oral u escrito), la existencia de productos, subproductos o procesos que puedan ser apropiados, patentados o comercializados, con valor económico surgidos de la actividad del Proyecto, salvo que INIA expresamente lo autorice.

### **15°. Exoneración de responsabilidad**

El Ejecutor se obliga a indemnizar y mantener indemne a INIA, así como a sus directores y empleados, de cualquier y toda acción, amenaza de acción, demanda o procedimiento, de cualquier naturaleza, que pueda efectuar cualquier persona física o jurídica, pública o privada, que surja como resultado de su actuación bajo el presente convenio y de la realización del Proyecto, contra cualquier y todo reclamo, gastos, pérdidas o daños (incluido los honorarios razonables de los abogados) que puedan resultar en virtud de acciones u omisiones del Ejecutor. La presente obligación comprende -principalmente y sin que signifique limitación alguna-, todo reclamo de índole laboral de parte de los que participen en las actividades del Proyecto, como de cualquier otra persona física o

jurídica vinculada o no al Proyecto, así como de cualquier reclamo que pudiera resultar a consecuencia de cualquier controversia sobre la titularidad de las innovaciones.

En tal hipótesis el INIA deberá: (i) enviar inmediatamente una notificación por escrito al Ejecutor en la que se indica la existencia del evento objeto de indemnización, (ii) proporcionar toda la información necesaria así como cooperar y asistir en la medida que ello sea razonablemente necesario para la defensa en dicha acción o reclamo, y (iii) autorizar al Ejecutor a defender o contestar dicha acción o reclamo, si lo entiende adecuado.

#### **16°. Alcance**

En cualquier circunstancia o hecho que tenga relación con este Convenio, las partes mantendrán la individualidad y autonomía de sus respectivas estructuras técnicas y administrativas y asumirán particularmente, en consecuencia, las responsabilidades consiguientes.

#### **17°. Sanciones.**

En caso de inobservancia de las obligaciones contraídas por parte de la entidad Ejecutora y/o del Técnico Responsable del Proyecto y/o de cualquier recurso humano del que se valga para la ejecución del proyecto, determinará la suspensión inmediata de los desembolsos (Cláusula 8ª literal B) y la rescisión del convenio prevista en la Cláusula 11ª. Todo ello sin perjuicio de las demás indemnizaciones que procedan de acuerdo con la normativa general y al Reglamento del FPTA

#### **18°. Arbitraje**

Toda cuestión o divergencia, reclamación o duda que surja entre las partes, referida a la interpretación, ejecución, resolución de este contrato, o que en cualquier forma se relacione con él, directa o indirectamente, será solucionada por medio de árbitros, amigables componedores, de acuerdo al procedimiento establecido en el Libro II Título VII del Código General del Proceso.

#### **19°. Fuerza Mayor**

Ninguna de las partes será responsable frente a la otra por retrasos o incumplimientos en cualquiera de las obligaciones impuestas por el presente Convenio, cuando estos incumplimientos se hubieren originados por causa de fuerza mayor fuera del control razonable y sin que medie omisión o negligencia de alguna de ellas.

#### **20°. Comunicaciones**

Todas las comunicaciones entre las partes referentes a este Convenio se efectuarán por escrito, por correo electrónico, telegrama colacionado, o carta certificada con aviso de retorno, tomándose por cumplidas cuando su destinatario las haya recibido en los domicilios denunciados en el exhorto. Las comunicaciones por fax se considerarán cumplidas si son legibles y la máquina receptora ha acusado su recibo.

#### **21°. Competencia**

En caso de controversias judiciales, las partes acuerdan quedar sometidas a la competencia de los Tribunales y Jueces del departamento de Montevideo.

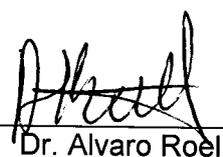
804  
M

**22°. Contenido del Convenio**

En todo lo no previsto en el presente Convenio, primará lo previsto en el Reglamento Operativo para el FPTA 2012 y las Bases del Llamado FPTA 2012 y, en su defecto, lo previsto en las Propuesta del Ejecutor, documentos que las partes admiten conocer. Existiendo contradicciones entre lo dispuesto en dichos instrumentos, primará lo previsto en el presente Contrato, en el Reglamento, en las Bases y en las Propuestas, conforme a dicho orden de prelación

**23°. Otorgamiento**

Para constancia se firman dos ejemplares de igual tenor en Montevideo, a los 12 días del mes de mayo de 2014.-



Dr. Alvaro Roel  
Presidente  
I.N.I.A.



Dr. Rodrigo Arocena  
Rector  
UDELAR



Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria  
URUGUAY

FONDO DE PROMOCIÓN DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA (FPTA)

10.102

8/11/12  
M

**Identificación del Proyecto**

<b>Convocatoria</b>	Llamado FPTA 2012
<b>Código Técnico</b>	FPTA_310
<b>Título del Proyecto</b>	Diagnóstico, caracterización molecular y regionalización de virus y viroides de gran impacto para el sector cítrico nacional.
<b>Resumen Publicable del Proyecto</b>	<p>Los cítricos son el cultivo frutal más importante a nivel económico en el mundo. En el Uruguay, la citricultura es un rubro con fuerte impacto socio-económico, y constituye un sector exportador en expansión, el de mayor importancia dentro del área hortifrutícola. En el Uruguay se cultivan 17.018 hectáreas (ha) con un total de 7.531.000 plantas, de las cuales 5.895.000 son productivas ubicadas en 13.542 (ha). La zona norte es la región cítrica por excelencia, con un 83% (14.200 ha) de la superficie total cultivada, concentrando el 90% de la producción de naranja, mandarina y pomelo. Por otro lado, la zona sur abarca el 17% (2.800 ha) y genera el 70% de la producción de limón. Desde el punto de vista comercial, la naranja constituye el 50% de la producción cítrica nacional y representa el 55% de las exportaciones, seguido de mandarina y limón, con un 35% y 10% respectivamente; produciéndose un ingreso aproximado de 80 millones de dólares anuales por concepto de dichas exportaciones. Existen diversas enfermedades provocadas por patógenos virales y viroidales que afectan este tipo de cultivos, causando grandes pérdidas económicas que se estiman en el orden del 30% de la producción cítrica nacional. Los virus que provocan las enfermedades conocidas como Tristeza (CTV) y Psorosis (CPsV), junto con el viroide que produce la Exocortis (CEVd), son los agentes de esta naturaleza de mayor incidencia en los cultivos cítricos de nuestro país.</p> <p>Con el fin de estudiar la actual incidencia de CTV, CPsV y CEVd, en las zonas cítricas del Uruguay, se propone implementar metodologías de biología molecular para el diagnóstico y caracterización de estos agentes patógenos. Proponemos analizar variedades de interés comercial, como naranjas de los grupos Navel y Valencia, mandarinas del grupo de las Clementinas y también limones, abarcando distintas regiones cítricas del país y con un número de muestras estadísticamente significativo. a fin de obtener un panorama completo y actualizado de la situación. Determinaremos para CTV el grado de severidad de las estirpes presentes en las distintas zonas cítricas. Estas herramientas e información serán muy útiles para INIA- Plan Nacional de Saneamiento de Citrus, el MGAP y generará conocimiento para un futuro programa de Protección Cruzada. También serán de gran utilidad para los productores, y la información generada permitirá aumentar la producción a través de mejoras en el manejo. El proyecto tendrá una duración de 3 años y generará información sin precedente y de gran utilidad para todos los actores involucrados en la producción cítrica nacional.....</p>
<b>Líder del Proyecto</b>	Humberto Rodney Colina Muñoz
<b>Fecha de Inicio</b>	01/04/2014
<b>Fecha de Fin</b>	31/03/2017
<b>Presupuesto FPTA (US\$)</b>	135.994,00

**Institución Ejecutora**

<b>Institución</b>	Facultad de Ciencias
<b>Dirección</b>	Iguá 4225
<b>Teléfono</b>	2525 -- 8618 al 23
<b>E-mail</b>	rodneycolina1@gmail.com
<b>Celular</b>	098306912
<b>Aporte Financiero del Ejecutor (US\$)</b>	0.00

Aporte Valorizado del Ejecutor	Valor Estimado (US\$)

INIA Dirección Nacional  
INIA La Estanzuela  
INIA Las Brujas  
INIA Salto Grande  
INIA Tacuarembó  
INIA Treinta y Tres

Andes 1365 P. 12, Montevideo  
Ruta 50 Km. 11, Colonia  
Ruta 48 Km. 10, Canelones  
Camino a l Terrible, Salto  
Ruta 5 Km. 386, Tacuarembó  
Ruta 8 Km. 281, Treinta y Tres

Tel: 598 2902 0550  
Tel: 598 4574 8000  
Tel: 598 2367 7641  
Tel: 598 4733 5156  
Tel: 598 4632 2407  
Tel: 598 4452 2023

Fax: 598 2902 3633  
Fax: 598 4574 8012  
Fax: 598 2367 7609  
Fax: 598 4732 9624  
Fax: 598 4632 3969  
Fax: 598 4452 5701

[iniadn@dn.inia.org.uy](mailto:iniadn@dn.inia.org.uy)  
[iniale@e.inia.org.uy](mailto:iniale@e.inia.org.uy)  
[inia\\_lb@lb.inia.org.uy](mailto:inia_lb@lb.inia.org.uy)  
[inia\\_sg@sg.inia.org.uy](mailto:inia_sg@sg.inia.org.uy)  
[iniatbo@tb.inia.org.uy](mailto:iniatbo@tb.inia.org.uy)  
[iniatt@tyt.inia.org.uy](mailto:iniatt@tyt.inia.org.uy)

## FONDO DE PROMOCIÓN DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA (FPTA)

### Equipo Técnico

Investigador	Institución	Especialidad
Humberto Rodney Colina Muñoz	Udelar/Regional Norte	Enfermedades de las plantas
María José Benitez Galeano	Udelar/Regional Norte	Enfermedades de las plantas
Federico Dalmao Artigas	Udelar/Regional Norte	Métodos matemáticos y estadísticos
Luciana Burutaran	Udelar/Regional Norte	Enfermedades de las plantas
Mariana Espino	Cámara de Exportadores de Citrus del Uruguay	Cultivo

### Verificables Generales del Proyecto (Productos 1, 2, 4 Y 5)

<b>Producto:</b>	Se obtendrá un desarrollo biotecnológico de gran importancia para el sector productivo, INIA y el MGAP. Estos desarrollos quedarán disponibles para otros posibles usuarios y podrán ser debidamente transferidos en una etapa posterior a este proyecto.
<b>Tipo:</b>	5-Vinculación Tecnológica
<b>Categoría:</b>	5.5-Intercambio y transferencia de conocimientos y tecnologías
<b>Indicador:</b>	5.5.1-Asistencia técnica/Consultorías de terceros para INIA nacionales
<b>Año:</b>	2016
<b>Semestre:</b>	2

<b>Producto:</b>	Se obtendrá un desarrollo biotecnológico de gran importancia para el sector productivo, INIA y el MGAP. Estos desarrollos quedarán disponibles para otros posibles usuarios y podrán ser debidamente transferidos en una etapa posterior a este proyecto.
<b>Tipo:</b>	5-Vinculación Tecnológica
<b>Categoría:</b>	5.5-Intercambio y transferencia de conocimientos y tecnologías
<b>Indicador:</b>	5.5.1-Asistencia técnica/Consultorías de terceros para INIA nacionales
<b>Año:</b>	2016
<b>Semestre:</b>	2

<b>Producto:</b>	Presentación y discusión de resultados con el Sector Productivo, técnicos del sector cítrico, autoridades de INIA y el equipo de investigación que llevará adelante el presente proyecto.
<b>Tipo:</b>	2-Comunicación y Transferencia de Tecnología
<b>Categoría:</b>	2.4-Publicaciones de Divulgación
<b>Indicador:</b>	2.4.1-Revista INIA
<b>Año:</b>	2016
<b>Semestre:</b>	2

<b>Producto:</b>	Habrán estudiantes de postgrado participando como parte del proyecto, por lo cual entendemos que un proyecto de ésta magnitud debe generar la formación de recursos humanos que luego le permitan dar continuidad al tema de investigación y desarrollo aquí planteado.
<b>Tipo:</b>	4-Desarrollo del Capital Intelectual
<b>Categoría:</b>	4.4-Tesis / Monografías / Proyectos
<b>Indicador:</b>	4.4.3-De maestría
<b>Año:</b>	2016
<b>Semestre:</b>	2

### Rubros y Códigos Agrícolas

	CT	Total
A50	50,00	50,00
F01	40,00	40,00
H20	10,00	10,00
<b>Total</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>

### Contribución a la Resolución del Problema Identificado

INIA Dirección Nacional  
 INIA La Estanzuela  
 INIA Las Brujas  
 INIA Salto Grande  
 INIA Tacuarembó  
 INIA Treinta y Tres

Andes 1365 P. 12, Montevideo  
 Ruta 50 Km. 11, Colonia  
 Ruta 48 Km. 10, Canelones  
 Camino a l Terrible, Salto  
 Ruta 5 Km. 386, Tacuarembó  
 Ruta 8 Km. 281, Treinta y Tres

Tel: 598 2902 0550  
 Tel: 598 4574 8000  
 Tel: 598 2367 7641  
 Tel: 598 4733 5156  
 Tel: 598 4632 2407  
 Tel: 598 4452 2023

Fax: 598 2902 3633  
 Fax: 598 4574 8012  
 Fax: 598 2367 7609  
 Fax: 598 4732 9624  
 Fax: 598 4632 3969  
 Fax: 598 4452 5701

[iniadn@dn.inia.org.uy](mailto:iniadn@dn.inia.org.uy)  
[iniale@le.inia.org.uy](mailto:iniale@le.inia.org.uy)  
[inia\\_lb@lb.inia.org.uy](mailto:inia_lb@lb.inia.org.uy)  
[inia\\_sg@sg.inia.org.uy](mailto:inia_sg@sg.inia.org.uy)  
[iniatbo@b.inia.org.uy](mailto:iniatbo@b.inia.org.uy)  
[iniatt@tyt.inia.org.uy](mailto:iniatt@tyt.inia.org.uy)

## FONDO DE PROMOCIÓN DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA (FPTA)

El presente proyecto titulado "Diagnóstico, caracterización molecular y regionalización de virus y viroides de gran impacto para el sector cítrico nacional" se enmarca en la temática identificada por INIA:

V-Sistema vegetal intensivo

V- X.VIII Puesta a punto y validación de técnicas moleculares para el diagnóstico de enfermedades de alto impacto económico en cultivos hortofrutícolas y su relevamiento a nivel país.

El presente proyecto realizará contribuciones reales muy importantes y aplicadas al problema identificado por INIA, los cuales se pasan a explicar.

El sector cítrico nacional posee una potencialidad productiva muy superior a la actual. Sin embargo la existencia de enfermedades producidas por los patógenos descritos en éste proyecto, generan pérdidas millonarias anualmente, la cuales pueden ir aumentando en el futuro, si no se procede a encontrar una solución de fondo que permita en el mediano plazo una mejora sustantiva en los niveles de producción.

En éste sentido, entendemos que los estudios moleculares masivos de campo que planteamos llevar adelante, permitirán caracterizar el grado de afectación de los cultivares cítricos por los mencionados patógenos en las distintas regiones cítricas del país. Los resultados de presente proyecto contribuirán directamente al sector productivo, generando conocimiento que le permitirá a los productores disminuir las pérdidas y la incidencia de éstas enfermedades, a través del mejoramiento en el manejo. Se contribuirá también a solucionar el problema que actualmente causa CTV, generando conocimiento extremadamente útil sobre las características genéticas del virus y grados de severidad en cepas locales. Dicha información será de gran utilidad en el mediano plazo cuando se plantee a nivel nacional la implementación de un programa de protección cruzada; los cuales ya han sido implementados con mucho éxito y han logrado mejorar considerablemente la producción en otros países.

Se contribuirá también de manera sustantiva al sector cítrico así como directamente a INIA, en que se podrá contar a nivel nacional con metodologías modernas altamente confiables en términos técnicos, que permiten no solo la detección sino que también la caracterización molecular de una importante gama de patógenos. Dichas metodologías contribuirán fortaleciendo al actual Programa de Saneamiento de Cítricos que ha desarrollado INIA. Estas metodologías podrán ser transferidas a INIA y/o puestas al servicio de los productores que así deseen acceder a ellas y también al Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca.

Las metodologías con las cuales se va a contribuir serán las siguientes:

- a) técnicas de biología molecular para la detección y caracterización de los siguientes virus: CTV, CPsV y Satsuma Dwarf.
- b) técnicas de biología molecular para la detección de los siguientes viroides: "Citrus Exocortix Viroid" (CEVd); Cachexia "Hop Stunt Viroid" (HSVd), "Citrus bent leaf viroid (CBLVd), Citrus viroid III (CVD-III) y Citrus viroid IV (CVD-IV).

El proyecto se centrará en el estudio de CTV y su caracterización genética para establecer severidad y en la detección de CPsV y el viroide CEVd. Pero se tendrá al final del proyecto las metodologías desarrolladas para la detección de todos los patógenos previamente mencionados en los ítems a) y b).

En la actualidad el sector cítrico nacional ha logrado importantes avances a fin de abrir un mercado exportador sumamente grande en cuanto volúmenes de exportación y sumamente exigente: Estados Unidos. Para cumplir con algunas de las exigencias a la hora de exportar a éste tipo de mercados es necesario poder probar que los cítricos estén libres de ciertos patógenos, cumpliendo con normas de calidad, para ello entendemos que el presente proyecto aportará nuevas y modernas metodologías que le permitirán al sector contar con ellas cuando así sea necesario.

INIA Dirección Nacional  
INIA La Estanzuela  
INIA Las Brujas  
INIA Salto Grande  
INIA Tacuarembó  
INIA Treinta y Tres

Andes 1365 P. 12, Montevideo  
Ruta 50 Km. 11, Colonia  
Ruta 48 Km. 10, Canelones  
Camino a l Terrible, Salto  
Ruta 5 Km. 386, Tacuarembó  
Ruta 8 Km. 281, Treinta y Tres

Tel: 598 2902 0550  
Tel: 598 4574 8000  
Tel: 598 2367 7641  
Tel: 598 4733 5156  
Tel: 598 4632 2407  
Tel: 598 4452 2023

Fax: 598 2902 3633  
Fax: 598 4574 8012  
Fax: 598 2367 7609  
Fax: 598 4732 9624  
Fax: 598 4632 3969  
Fax: 598 4452 5701

[iniadn@dn.inia.org.uy](mailto:iniadn@dn.inia.org.uy)  
[iniale@le.inia.org.uy](mailto:iniale@le.inia.org.uy)  
[inia\\_lb@lb.inia.org.uy](mailto:inia_lb@lb.inia.org.uy)  
[inia\\_sg@sg.inia.org.uy](mailto:inia_sg@sg.inia.org.uy)  
[iniatbo@tb.inia.org.uy](mailto:iniatbo@tb.inia.org.uy)  
[iniatt@tyt.inia.org.uy](mailto:iniatt@tyt.inia.org.uy)

## FONDO DE PROMOCIÓN DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA (FPTA)

### Descripción del Problema Identificado

Los cítricos son el cultivo frutal más importante a nivel económico en el mundo. En el Uruguay, la citricultura es un rubro con fuerte impacto socio-económico, y constituye un sector exportador en expansión, el de mayor importancia dentro del área hortifrutícola (Comisión Honoraria Nacional del Plan Citrícola, 1996). En el Uruguay se cultivan 17.018 hectáreas (ha) con un total de 7.531.000 plantas, de las cuales 5.895.000 son productivas ubicadas en 13.542 (ha). La zona norte es la región cítrica por excelencia, con un 83% (14.200 ha) de la superficie total cultivada, concentrando el 90% de la producción de naranja, mandarina y pomelo. Por otro lado, la zona sur abarca el 17% (2.800 ha) y genera el 70% de la producción de limón. Desde el punto de vista comercial, la naranja constituye el 50% de la producción cítrica nacional y representa el 55% de las exportaciones, seguido de mandarina y limón, con un 35% y 10% respectivamente; produciéndose un ingreso aproximado de 80 millones de dólares anuales por concepto de dichas exportaciones (MGAP Enc. N° 299, feb. 2011).

Las distintas especies de cítricos son susceptibles a numerosas enfermedades causadas por diversos microorganismos cuya consecuencia directa es la disminución en la producción, lo que provoca enormes pérdidas económicas en todas las zonas afectadas del mundo (Moreno et al., 2008). Las enfermedades de mayor importancia son aquellas cuya vía o ruta de transmisión es el injerto, siendo los agentes responsables parásitos intracelulares tales como virus y viroides, que se propagan junto con el material vegetal. Algunas de estas enfermedades transmisibles por injerto se logran controlar fácilmente mediante saneamiento y certificación del material vegetal a propagar (Navarro, 1993). Sin embargo, no todas presentan esta única vía de propagación. La transmisión mecánica con herramientas de corte (poco frecuente) o a través de insectos que actúan como vectores del patógeno (muy frecuente), son también mecanismos de gran impacto en cuanto a la dispersión de los agentes, lo que dificulta enormemente su control. Existen diversas enfermedades provocadas por patógenos virales y viroidales que afectan este tipo de cultivos, causando grandes pérdidas económicas que se estiman en el orden del 30% de la producción cítrica nacional (Bertalmio et al. 2012). Los virus que provocan las enfermedades conocidas como Tristeza y Psorosis, junto con el viroide que produce la Exocortis, son los agentes de esta naturaleza de mayor incidencia en los cultivos cítricos de nuestro país (MGAP, 1981). Estos agentes se caracterizan por disminuir el vigor de los árboles afectados así como su vida útil, producir frutos de menor tamaño, calidad y en cantidades menores, e incluso pueden provocar la muerte de los árboles. El "Virus de la Tristeza de los Cítricos" (CTV) es endémico en muchos países del mundo así como también en Uruguay; se transmite por el insecto vector *Toxoptera Citricida*, el cual se encuentra ampliamente distribuido en nuestro país. CTV se clasifica en cepas "Suaves", "Intermedias" y "Severas", de acuerdo al grado de severidad que provoca la enfermedad sobre la planta huésped.

Diversos estudios revelan que CTV es el agente causante de la mayor y más devastadora epidemia con resultados que han cambiado la industria de la citricultura a nivel global (Moreno et al., 2008). En la década de 1930, tras la exportación de árboles desde Australia y Sudáfrica a Sudamérica, esta enfermedad golpeó la industria cítrica de Brasil y Argentina. Se ha documentado que más de 100 millones de árboles han muerto en todo el mundo a causa de esta enfermedad hasta comienzos de la década del 2000 (Roistacher et al., 2010).

Las plantaciones cítricas comerciales en Uruguay, hasta la década de los 1940, se encontraban injertadas sobre un patrón de naranjo amargo (*Citrus aurantium* L.), variedad cítrica tolerante a viroides. Sin embargo, la aparición de razas severas de CTV generó una pandemia a nivel mundial afectando variedades cítricas injertadas sobre este portainjerto (catalogado como susceptible a este virus), provocando la muerte de millones de plantas y obligando a la sustitución de naranjo amargo por variedades alternativas que se comportaran de manera tolerante a CTV (Bar-Joseph et al., 1989). De esta manera, aproximadamente el 90% de las plantas cítricas nacionales, se establecieron con el patrón *Poncirus trifoliata* L. Raf y sus híbridos (Citrange), los cuales son variedades tolerantes a CTV pero altamente susceptibles a las infecciones por viroides.

En cuanto a la Psorosis, es una de las enfermedades virales más antiguas descritas en los cítricos. Fue descrita y nombrada en 1896, en Florida (USA) por Swingle y Webber, aunque no fue hasta 1933 que Fawcett reconoce su etiología viral (Fawcett, 1933). En un tiempo, Psorosis fue la enfermedad más destructiva de los cítricos. Actualmente y debido a la diseminación natural de Psorosis, es aún considerada una enfermedad destructiva en algunos campos. Se encuentra distribuida por todo el mundo causando graves problemas en muchas regiones incluyendo América del Sur, áreas del Mediterráneo y Asia (Roistacher, 1993; Martelli y D'Onghia, 1998).

Por último, en Uruguay han sido reportadas cuatro especies de viroides cítricos, siendo la de mayor impacto a nivel productivo la del *Citrus Exocortis* Viroid (CEVd), co-infectando diferentes variedades de Citrus. Los aislados se obtuvieron mediante un relevamiento de plantaciones nacionales de las zonas de Paysandú, Salto, Canelones y San José (Pagliano et al., 1998; Pagliano et al., 2000). En la región, principalmente en los países que limitan con Uruguay, el reporte de viroides cítricos mantiene la misma tendencia de distribución (Pagliano et al., 2000). En el estado de San Pablo, Brasil, se detectó con técnicas moleculares la presencia de tres de estos viroides incluyendo CEVd en bloques de plantas madres de categoría fundación. Resultados similares fueron reportados para Concordia, Argentina.

En suma, distintos virus y viroides afectan de manera directa a todo el sistema socioeconómico vinculado a los cítricos, incluyendo desde pérdidas para el propio productor y la disminución en el empleo de recolectores zafrales, hasta una baja importante en los niveles de exportación de la fruta, generando todo ello un impacto absoluto negativo para el sector y para el país.

Debido a que las vías de transmisión de dichos patógenos son a través de injertos infectados, insectos vectores y la utilización de materiales de poda infectados; es de suma importancia implementar metodologías rápidas, específicas, sensibles y de bajo costo, que permitan el diagnóstico y caracterización de plantas para una posterior liberación de las mismas al campo, libres de dichos agentes. Los países con citricultura de avanzada han basado su éxito en el empleo de Programas de Certificación utilizando plantas libres de enfermedades, especialmente las causadas por virus y viroides. A su vez, respecto a CTV, el cual se transmite no solo por injerto sino también por un insecto vector, se ha descrito que al momento la única forma de control de la enfermedad es la generación de un programa de "Protección Cruzada" mediante la utilización de cepas suaves o atenuadas del virus para pre-inmunizar las plantas y así evitar la super-infección por otras variantes más severas del patógeno (Roistacher et al., 2010; Folimonova, 2013).

Con el fin de estudiar la actual incidencia de CTV, Psorosis (CPsV) y CEVd, en las zonas cítricas del Uruguay, se propone implementar metodologías de biología molecular para el diagnóstico y caracterización de estos agentes patógenos. Estas herramientas serán factibles de ser incorporadas en el Plan Nacional de Saneamiento de Citrus. Hasta el momento en nuestro país no se han utilizado técnicas de biología molecular con los fines previamente mencionados. Es así que se ha llegado a la conclusión de que se requieren de metodologías rápidas, sensibles y confiables, que permitan identificar los agentes implicados en la inducción de los distintos síntomas. La elevada sensibilidad, especificidad y reproducibilidad proporcionada por la técnica molecular denominada RT-PCR son las razones principales que justifican su aplicación para la detección de la mayoría de los patógenos; estudios que luego pueden ser ampliados cuando se obtienen las respectivas secuencias y éstas nos permiten realizar análisis filogenéticos de gran utilidad. INIA ha realizado un gran esfuerzo en el desarrollo del Programa Nacional de Saneamiento y nuestra propuesta generará nuevas herramientas complementarias que lo fortalecerán. En cuanto a la generación de un programa de Protección Cruzada, consideramos es de vital importancia comenzar a desarrollarlo, aunque entendemos es un camino largo de transitar. Al momento se ha desarrollado con éxito este programa en varios países altamente competentes en el mercado exportador. En Brasil el programa comenzó en 1960 y se lograron liberar 8 millones de árboles protegidos, que luego de 40 años siguen produciendo frutas de buena calidad sin que se haya quebrado la resistencia. La situación es similar en Sudáfrica, principal país exportador del sur. La protección cruzada implementada en algunas variedades comenzó en 1984 y continúa funcionando hasta la fecha. En Perú el sistema viene funcionando desde hace 21 años, y en países como Argentina, Japón, Australia e India ya han logrado la identificación de cepas suaves, las cuales se encuentran en etapa de prueba (Roistacher et al., 2010). Se ha descrito que para que la Protección Cruzada funcione correctamente se deben utilizar variantes suaves identificadas provenientes de la misma región geográfica y perteneciente al mismo genotipo de la variante severa que se desea controlar, así como también la especificidad relacionada a la variante cítrica (Folimonova, et al., 2010). En una revisión publicada en abril de este año, Folimonova detalló las etapas necesarias para lograr el desarrollo eficiente de un programa de Protección Cruzada. Como primer paso es necesario identificar el genotipo del aislado severo que necesita ser controlado. Luego debe encontrarse un aislado suave de ese genotipo para ser utilizado como aislado pre inmunizador de plantas de las variedades comerciales de interés, o también se puede atenuar una cepa severa aislada en la zona de interés, en el caso de no detectar cepas suaves (Folimonova, 2013).

Basándonos en las experiencias de éxito de Protección Cruzada implementadas por los países mencionados y con ese objetivo central como meta final de mediano y largo plazo, planteamos en el presente proyecto generar conocimientos que serán de gran importancia y utilidad para el mencionado fin. En éste

INIA Dirección Nacional	Andes 1365 P. 12, Montevideo	Tel: 598 2902 0550	Fax: 598 2902 3633	<a href="mailto:iniadn@dn.inia.org.uy">iniadn@dn.inia.org.uy</a>
INIA La Estanzuela	Ruta 50 Km. 11, Colonia	Tel: 598 4574 8000	Fax: 598 4574 8012	<a href="mailto:iniiale@le.inia.org.uy">iniiale@le.inia.org.uy</a>
INIA Las Brujas	Ruta 48 Km. 10, Canelones	Tel: 598 2367 7641	Fax: 598 2367 7609	<a href="mailto:inia_lb@lb.inia.org.uy">inia_lb@lb.inia.org.uy</a>
INIA Salto Grande	Camino a l Terrible, Salto	Tel: 598 4733 5156	Fax: 598 4732 9624	<a href="mailto:inia_sg@sg.inia.org.uy">inia_sg@sg.inia.org.uy</a>
INIA Tacuarembó	Ruta 5 Km. 386, Tacuarembó	Tel: 598 4632 2407	Fax: 598 4632 3969	<a href="mailto:iniatbo@tb.inia.org.uy">iniatbo@tb.inia.org.uy</a>
INIA Treinta y Tres	Ruta 8 Km. 281, Treinta y Tres	Tel: 598 4452 2023	Fax: 598 4452 5701	<a href="mailto:iniatt@tyt.inia.org.uy">iniatt@tyt.inia.org.uy</a>

## FONDO DE PROMOCIÓN DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA (FPTA)

sentido proponemos, mediante el uso de herramientas de biología molecular altamente sensibles y específicas, conocer en profundidad el grado de afectación producida por CTV, CPsV y CEVd, en las distintas variedades cítricas y regiones geográficas del Uruguay. Para ello estudiaremos un número estadísticamente significativo de plantas a fin de obtener un panorama completo de la situación en las distintas regiones del país.

A pesar de la existencia de reportes previos que indicaban la presencia de éstos agentes, no existen al día de hoy cifras estadísticamente confiables respecto a la distribución y prevalencia de las distintas enfermedades que afectan los cultivos de cítricos en el Uruguay. Por ello, entendemos es necesario generar datos actualizados sobre el grado de afectación causada por los mencionados virus y viroides. Proponemos analizar variedades de interés comercial, como naranjas de los grupos Navel y Valencia, mandarinas del grupo de las Clementinas y también limones, abarcando distintas regiones cítricas del país y con un número de muestras estadísticamente significativo.

En cuanto a los estudios que realizaremos en CTV y los cuales son parte central del presente proyecto; proponemos generar distintos tipos de información. Una parte de esa información consistirá en generar el diagnóstico molecular del virus y establecer su dispersión geográfica e impacto a nivel país. Otra información altamente relevante se generará mediante la amplificación, secuenciación y análisis filogenético de tres genes distintos del genoma viral a fin de establecer la severidad de las cepas de CTV. Se podrá construir y determinar la existencia o no de regiones geográficas que presenten estirpes de CTV con determinados grados de severidad y establecer las relaciones filogenéticas que existen con otros CTV de la región. También se generará información de gran importancia en cuanto a la identificación de cepas suaves que circulen en las distintas variedades comercialmente relevantes del país, la cuales podrán luego ser utilizadas en el programa de protección cruzada a generarse en el mediano plazo.

Para lograr el éxito en el presente proyecto y de acuerdo a los objetivos trazados, contamos con el apoyo logístico en las colectas de muestras de un grupo muy significativo (en cuanto a áreas plantadas y volúmenes de producción) de productores y técnicos; cuyo apoyo a éste proyecto ha quedado plasmado a través de la carta anexada de la Cámara de Exportadores Cítricos del Uruguay, en la cual se expresa dicha voluntad.

Por otro lado y como aporte fundamental para lograr las metas planteadas, destacamos que nuestro grupo de investigación ha logrado desarrollar exitosamente las técnicas de RT-PCR para la amplificación de tres genes altamente informativos de CTV (Iglesias et al., 2008), y también poseemos experiencia importante en realizar los respectivos estudios filogenéticos para establecer la severidad de las estirpes. De la misma manera, hemos desarrollado la técnica de RT-PCR para la detección de CPsV (Roy et al., 2005) y CEVd (Bernard et al., 2006).

A su vez, es importante destacar que nuestro recientemente creado laboratorio, cuenta con toda la tecnología necesaria para llevar adelante dicho proyecto. También contamos con un equipo multidisciplinario robusto conformado por bioquímicos, biólogos, ingenieros agrónomos, estadista y especialistas en producción cítrica.

INIA Dirección Nacional	Andes 1365 P. 12, Montevideo	Tel: 598 2902 0550	Fax: 598 2902 3633	<a href="mailto:iniadn@dn.inia.org.uy">iniadn@dn.inia.org.uy</a>
INIA La Estanzuela	Ruta 50 Km. 11, Colonia	Tel: 598 4574 8000	Fax: 598 4574 8012	<a href="mailto:iniale@le.inia.org.uy">iniale@le.inia.org.uy</a>
INIA Las Brujas	Ruta 48 Km. 10, Canelones	Tel: 598 2367 7641	Fax: 598 2367 7609	<a href="mailto:inia_lb@lb.inia.org.uy">inia_lb@lb.inia.org.uy</a>
INIA Salto Grande	Camino a l Terrible, Salto	Tel: 598 4733 5156	Fax: 598 4732 9624	<a href="mailto:inia_sg@sg.inia.org.uy">inia_sg@sg.inia.org.uy</a>
INIA Tacuarembó	Ruta 5 Km. 386, Tacuarembó	Tel: 598 4632 2407	Fax: 598 4632 3969	<a href="mailto:iniatbo@tb.inia.org.uy">iniatbo@tb.inia.org.uy</a>
INIA Treinta y Tres	Ruta 8 Km. 281, Treinta y Tres	Tel: 598 4452 2023	Fax: 598 4452 5701	<a href="mailto:iniatt@tyt.inia.org.uy">iniatt@tyt.inia.org.uy</a>

## FONDO DE PROMOCIÓN DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA (FPTA)

### Antecedentes y Justificación

La enfermedad de los cítricos conocida comúnmente como "tristeza" es causada por el virus denominado Virus de la Tristeza de los Cítricos (Citrus Tristeza Virus, CTV) siendo una de las enfermedades transmisibles por injerto y vectores más importante a nivel mundial. Diversos estudios revelan que CTV es el agente causante de la mayor y más devastadora epidemia con resultados que han cambiado la industria de la citricultura a nivel global (Moreno et al., 2008). Al momento se encuentra catalogada, desde su aparición hace dos siglos, como la enfermedad más destructiva y más estudiada en cítricos (Roistacher et al., 2010). La capacidad de destrucción de CTV es tan grande, que entre 1940-50, logró matar más de 20 millones de árboles en el Sur del Continente es decir, Brasil, Argentina y Uruguay (Rocha-Peña et al. 1995). Esta enfermedad ha causado la muerte de más de 100 millones de árboles injertados sobre naranjo amargo; un importante debilitamiento y baja productividad de varios millones más en el mundo entero. En España, donde hizo su aparición más recientemente ha destruido unos 8 millones de árboles (Bar-Joseph et al., 1989b; Roistacher & Moreno, 1991; Moreno et al., 2008).

La tristeza se originó en Asia y se mantuvo allí por muchos años en variedades resistentes, propagadas por cortes. Luego, se establecieron nuevas áreas de citricultura en otros continentes utilizando semillas que al inicio estaban libres de CTV, ya que el virus no se trasmite por esta vía. Posteriormente, CTV fue introducido a casi todas las áreas productoras de cítricos, transmitido en material de injerto infectado con el virus o a través de plantas enteras. Wallace y colaboradores reportaron en 1956: "Registros encontrados en Sudáfrica indican que 1400 árboles de naranjo Lue Gim Gong injertados en limón rugoso fueron exportados a Argentina en julio de 1930; seguido por una exportación de 250 Navels, 500 Valencias, 350 Lue Gim Gong y 100 Ruby en limón rugoso un año después" (Extraído de Roistacher et al., 2010).

CTV pertenece al género Closterovirus dentro de la familia Closteroviridae (Bar-Joseph et al., 1979). Como todos los miembros de esta familia, los viriones presentan una cápside formada por dos proteínas que se ensamblan formando una estructura helicoidal de morfología filamentosa (2000 x 11 nm). El genoma está formado por una molécula de ARN simple de polaridad positiva, de 19.3Kb aproximadamente, que presenta doce marcos abiertos de lectura (Open Reading Frames, ORF) y que codifican para diecisiete productos proteicos. En sus extremos 5' y 3' se encuentran dos regiones no traducidas (5' y 3' Untranslated Regions, UTR) de 107 y 273 nucleótidos, respectivamente (Agranovsky, 1996; Febres et al., 1996). Estas regiones se caracterizan por presentar estructuras secundarias complejas involucradas en la replicación viral. La región 3' UTR es la más conservada de todo el genoma viral mientras que la región 5' UTR es la más variable, llegando a tener en ocasiones valores de identidad menores al 50% entre las diferentes estirpes. Este aspecto de la región 5' UTR ha permitido diferenciar y clasificar a CTV en tres grupos (I, II y III) con una identidad de secuencias intra-grupo superior al 88% y con identidades inter-grupo del 55-57% entre los grupos I y II, 62-64% entre los grupos II y III, y 44-45% entre los grupos I y III (López et al., 1998).

Otros estudios que involucran análisis de secuencia de la región 5' UTR, han revelado que la mayoría de las estirpes pertenecientes al grupo III, son en general asintomáticas o menos agresivas, pero, cuando además se detectan estirpes pertenecientes a los grupos I y II o ambos, éstos se corresponden con fenotipos muy severos (López et al., 1998).

Mediante un estudio filogenético realizado con secuencias completas de siete aislados de CTV, Moreno y colaboradores clasificaron al virus en tres grupos bien diferenciados: uno que incluye a los aislados más agresivos, otro que incluye aislados esencialmente asintomáticos y un tercero formado por aislados de virulencia intermedia (Moreno et al., 2008). También se ha logrado agrupar mediante el análisis de secuencias parciales de tres genes del virus en estas mismas tres categorías, de acuerdo a su virulencia, en un estudio realizado en Argentina en 2008. En este trabajo se utilizaron regiones de los genes codificantes de las proteínas de cápside p25 y p27, siendo la primera la proteína mayoritaria, y también el gen p23 que está involucrado en el silenciamiento por ARN interferencia (Iglesias et al., 2008). Sin embargo, al igual que otros virus con genoma de ARN, los aislados de CTV están compuestos por una población de variantes de secuencia, a veces muy divergentes, que complica la asociación de los síntomas con variantes específicas de secuencia (Rubio et al., 2001; Ayllón et al., 2006).

Recientemente, ha habido un cambio en la clasificación de CTV, basándose en resultados obtenidos por análisis de secuencias parciales o genomas completos. En lugar de la clásica clasificación en tres grupos de virulencia suave, intermedia y severa, se han obtenido, mediante análisis filogenéticos, seis genotipos de los cuales uno corresponde a las cepas suaves, otro a las de virulencia intermedia y los restantes cuatro genotipos estarían agrupando cepas severas con diferencias a nivel de secuencia y de sintomatología (Biswas et al., 2012; Matos et al., 2013). Esto refleja una gran divergencia entre las cepas severas existentes a nivel mundial. Dada la gran variabilidad mostrada por CTV, se ha estipulado que la única forma de controlar el virus, es mediante la identificación y aislamiento de una cepa suave local para pre-inmunizar el árbol antes de ser liberado a campo y generar resistencia de esa manera a una super infección por cepas severas de la enfermedad (Roistacher et al., 2010).

Aunque existen aislados de CTV esencialmente asintomáticos, se ha descrito la existencia de sintomatología con distintos grados de severidad causadas por CTV que van desde las más leves a las más severas. La mayoría de los aislados pueden causar uno o más de los siguientes síntomas: i) necrosis de células del floema de plantas injertadas sobre naranjo amargo debajo de la unión injerto-pie (Tristeza), ii) enanismo y acanaladuras en la madera de lima, pomelo o naranjo dulce ("stem pitting", SP) y iii) enanismo y amarilleo de plantas francas de limonero, pomelo o naranjo amargo ("seedling yellows", SY). El tipo e intensidad de los daños provocados por la tristeza en el campo depende de las especies infectadas, del patrón sobre el que están injertadas, del aislado de CTV y de las condiciones ambientales (Grant & Costa., 1951; Roistacher & Moreno., 1991; Roistacher et al., 2010).

Uno de los problemas más grandes en cuanto a la dispersión de CTV consiste en el hecho de que es transmitido por el áfido negro de los cítricos (ANC), *Toxoptera citricida* Kirkaldy, el que actualmente se sabe está ampliamente distribuido a nivel global y afecta la mayoría de los países productores de cítricos (Rocha-Peña et al 1998). Se cree que el origen del ANC es el sureste de Asia (Rocha-Peña et al., 1995). Otros áfidos, del género *Aphis*, también son capaces de transmitir CTV de una planta a otra, sin embargo, de acuerdo a un estudio realizado por Yokomi y Dansteeg en 1991, la eficiencia de estos últimos es entre un 83 y 96% menor que la de *T. citricida* en transmitir la enfermedad (Yokomi & Dansteeg, 1991). Entonces, el ANC no solo daña los cítricos en forma directa al alimentarse sino, lo que es más importante, transmite eficientemente las razas más severas del CTV (Rocha-Peña et al., 1995).

Otro virus de gran impacto en la industria cítrica es el virus de la psorosis de los cítricos (Citrus Psorosis Virus, CPsV), especie tipo del género *Ophiovirus* (Milne et al., 2000). Es el agente causal de la Psorosis, una enfermedad transmisible por injerto extremadamente perjudicial para los cítricos (Martín et al., 2004). Los viriones de CPsV son filamentos de 3-4 nm de diámetro que mediante centrifugación en gradiente de densidad se han separado partículas de dos tamaños, cortas (300-500 nm) y largas (1500-2500 nm) (García et al., 1994). El genoma viral está compuesto por tres moléculas de ARN simple hebra de polaridad negativa cubierto por la proteína de cápside (García et al., 1991; Navas-Castillo, 1995). El ARN viral 1 tiene un tamaño de 8184 nucleótidos y su hebra complementaria (vcRNA) contiene dos ORF que codifican para una proteína de 24 kDa de función desconocida y para la ARN polimerasa ARN dependiente (Naum-Onganía et al., 2003). El ARN 2, de 1644 nucleótidos, codifica en su vcRNA una proteína de 54 kDa con ninguna similitud a otras proteínas conocidas (Sanchez de la Torre et al., 2002). Por último, la molécula de ARN viral 3 con una longitud de 1454 nucleótidos, codifica para la proteína de cápside (CP) de 48.6 kDa (Barthe et al., 1998; Sánchez de la Torre et al., 1998).

La presencia de descamaciones en la corteza del tronco y ramas de los árboles afectados es el síntoma más característico de la enfermedad. Los síntomas se inician generalmente cuando el árbol tiene 10-15 años, con pequeñas lesiones en la corteza, que se agrandan paulatinamente hasta cubrir parcial o totalmente el tronco y ramas. Estas lesiones se levantan, se secan y finalmente se van desprendiendo dando lugar a descamaciones (Roistacher, 1991; 1993).

Como se mencionó previamente, la psorosis es una enfermedad que se transmite por injerto. Una vez hecho el injerto con una yema infectada por CPsV, la planta puede permanecer con la enfermedad latente durante muchos años y las yemas que se extraigan de una planta con enfermedad latente originarán plantas enfermas.

Otros agentes que producen importantes pérdidas económicas en los cítricos de todo el mundo son los viroides. Los viroides son los agentes infecciosos más pequeños del mundo, descritos hasta ahora, y difieren de los virus en su estructura molecular y en que no presentan cubierta proteica. Son ARNs pequeños (246-401 nucleótidos) simple hebra, covalentemente cerrados, que se replican en sus huéspedes vegetales provocando enfermedades. Presentan replicación autónoma y dependen de interacciones con factores del huésped para completar su ciclo infectivo (Flores et al., 2005a). Como son de pequeño tamaño, el genoma completo puede ser amplificado en una única reacción de RT-PCR. Esta aproximación ha sido extremadamente útil para la clonación y secuenciación de viroides, y al momento, un gran número de secuencias están disponibles en las bases de datos. Se clasifican de acuerdo a sus propiedades biológicas y moleculares en dos familias: Pospiviroidae que incluye cinco géneros (Pospiviroid, Hostuviroid, Cocadviroid, Apscaviroid y Coleviroid) y

INIA Dirección Nacional	Andes 1365 P. 12, Montevideo	Tel: 598 2902 0550	Fax: 598 2902 3633	<a href="mailto:iniadn@dn.inia.org.uy">iniadn@dn.inia.org.uy</a>
INIA La Estanzuela	Ruta 50 Km. 11, Colonia	Tel: 598 4574 8000	Fax: 598 4574 8012	<a href="mailto:iniale@e.inia.org.uy">iniale@e.inia.org.uy</a>
INIA Las Brujas	Ruta 48 Km. 10, Canelones	Tel: 598 2367 7641	Fax: 598 2367 7609	<a href="mailto:inia_lb@lb.inia.org.uy">inia_lb@lb.inia.org.uy</a>
INIA Salto Grande	Camino a l Terrible, Salto	Tel: 598 4733 5156	Fax: 598 4732 9624	<a href="mailto:inia_sg@sg.inia.org.uy">inia_sg@sg.inia.org.uy</a>
INIA Tacuarembó	Ruta 5 Km. 386, Tacuarembó	Tel: 598 4632 2407	Fax: 598 4632 3969	<a href="mailto:iniatbo@tb.inia.org.uy">iniatbo@tb.inia.org.uy</a>
INIA Treinta y Tres	Ruta 8 Km. 281, Treinta y Tres	Tel: 598 4452 2023	Fax: 598 4452 5701	<a href="mailto:iniatt@tyt.inia.org.uy">iniatt@tyt.inia.org.uy</a>

## FONDO DE PROMOCIÓN DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA (FPTA)

Avsunviroidae con los géneros Avsunviroid y Pelamoviroid (Flores et al., 2005b). Los miembros de la familia Pospiviroidae presentan algunas características como estructura en forma de varilla con cinco dominios estructurales (terminal izquierdo, patogénico, central, variable y terminal derecho) y una región central conservada (CCR) con el dominio central (C); carecen de actividad ribozima y la replicación ocurre en el núcleo mediante un mecanismo de círculo rodante asimétrico. Por otro lado, los miembros de la familia Avsunviroidae carecen de un CCR, son capaces de autoclirse en ambas hebras a través de ribozimas "cabeza de martillo" y se replican en los cloroplastos por el mecanismo de círculo rodante simétrico (Flores et al., 2005a).

Los cítricos son huéspedes naturales de cinco especies de viroides, incluyendo al "Citrus Exocortis Viroid" (CEVd) que es el agente causal de la enfermedad Exocortis (Semancik et al., 1972; 1988). Dentro de esta especie de viroide se han documentado variantes con motivos específicos de secuencia responsables de diferencias en la patogenicidad (Reanwarakorn & Semancik, 1998). CEVd pertenece al género Pospiviroid y presenta una longitud de 371 nucleótidos (Flores et al., 2005b).

La Exocortis se manifiesta como la aparición de escamas y grietas verticales en la corteza, manchas amarillas en los brotes tiernos y enanismo, en especies sensibles. Existen aislados suaves, moderados y severos de la enfermedad. Los aislados severos inducen clorosis en las hojas y retardo en el crecimiento, pudiendo llegar a causar la muerte del árbol.

Las plantaciones cítricas comerciales en Uruguay, hasta la década de los 40, se encontraban injertadas sobre un patrón de naranjo amargo (*Citrus aurantium* L.), variedad cítrica tolerante a viroides. Sin embargo, la aparición de razas severas de CTV generó una pandemia a nivel mundial afectando variedades cítricas injertadas sobre este portainjerto (catalogado como susceptible a este virus), provocando la muerte de millones de plantas y obligando a la sustitución de naranjo amargo por variedades alternativas que se comportaran de manera tolerante a CTV (Bar-Joseph et al., 1989b). De esta manera, aproximadamente el 90% de las plantas cítricas nacionales, se establecieron con el patrón *Poncirus trifoliata* L. Raf y sus híbridos Citrumelo y Citrange Carrizo y Troyer, los cuales son variedades tolerantes a CTV pero altamente susceptibles a las infecciones por viroides. Fue así que, la propagación de material infectado con viroides que logró escapar al Programa de Saneamiento de la época, la replicación clonal no autorizada que practican algunos productores y la contaminación entre plantas por herramientas de poda en montes de producción determinó una importante diseminación de los viroides en el área cítrica del Uruguay.

Se estima que las pérdidas económicas en el sector cítrico nacional causada por los mencionados agentes son muy importantes, llegando a un 30 % (Bertalmío et al. 2012). Los métodos de detección utilizados actualmente para el diagnóstico y caracterización son el "testaje biológico", el cual es costoso, consume mucho tiempo, pero es eficiente. A su vez, no existen datos respecto a la distribución y prevalencia de dichas enfermedades en el país, lo cual consideramos de gran importancia para establecer planes de manejo adecuados en las distintas zonas cítricas del país.

Por lo previamente expresado y fundamentado, se justifica generar acciones que permitan realizar aportes trascendentes al sector cítrico nacional. En el presente proyecto proponemos la detección del Virus de la Tristeza de los Cítricos mediante la utilización de herramientas moleculares (RT-PCR) previamente optimizadas en nuestro laboratorio y el posterior estudio de su organización poblacional mediante clonación, con el fin de establecer su epidemiología. A su vez se propone el diagnóstico mediante RT-PCR del virus causante de la Psorosis y del viroide responsable de la Exocortis. Estas metodologías serán de gran utilidad para el sector cítrico del Uruguay, y factibles de ser incorporadas como una poderosa herramienta diagnóstica en el Programa Nacional de Saneamiento de Citrus.

A su vez, diversos países realizaron en la última década estudios moleculares masivos de campo que permitieron caracterizar el grado de afectación de los cultivos cítricos por los mencionados patógenos y éstos han ayudado a disminuir la incidencia, mejorar el manejo y los niveles de producción (Zanek et al., 2008; Ghazal et al., 2008). Por lo previamente expuesto se justifica la necesidad de realizar estudios similares en Uruguay y proponemos utilizar metodologías moleculares de última generación a fin de detectar, caracterizar y regionalizar todos éstos patógenos.

En nuestro país y en la región CTV es endémico y está presente el vector transmisor *Toxoptera citricida* (Bentancourt, Carlos M, Com. 1999). Debido a ello entendemos que realizar estudios moleculares en profundidad de aislados de CTV provenientes de razas asociadas a distintos grados de severidad y a distintas variedades cítricas de todo el país, es de suma importancia. Hasta el momento, no hay trabajos que utilicen técnicas de biología molecular y el estudio de análisis de secuencias para el estudio de CTV en el país. Es de destacar que los resultados de este proyecto serán de gran utilidad para los productores y entidades de vigilancia sanitaria, ya que ofrecerán las bases para el desarrollo de planes de control específicos, rápidos y precisos. A su vez, se generarán datos de gran importancia que serán utilizados en la implementación de un Programa de Protección Cruzada, a fin de controlar la Tristeza en los cítricos del Uruguay.

INIA Dirección Nacional  
INIA La Estanzuela  
INIA Las Brujas  
INIA Salto Grande  
INIA Tacuarembó  
INIA Treinta y Tres

Andes 1365 P. 12, Montevideo  
Ruta 50 Km. 11, Colonia  
Ruta 48 Km. 10, Canelones  
Camino a l Terrible, Salto  
Ruta 5 Km. 386, Tacuarembó  
Ruta 8 Km. 281, Treinta y Tres

Tel: 598 2902 0550  
Tel: 598 4574 8000  
Tel: 598 2367 7641  
Tel: 598 4733 5156  
Tel: 598 4632 2407  
Tel: 598 4452 2023

Fax: 598 2902 3633  
Fax: 598 4574 8012  
Fax: 598 2367 7609  
Fax: 598 4732 9624  
Fax: 598 4632 3969  
Fax: 598 4452 5701

[iniadn@dn.inia.org.uy](mailto:iniadn@dn.inia.org.uy)  
[iniale@e.inia.org.uy](mailto:iniale@e.inia.org.uy)  
[inia\\_lb@lb.inia.org.uy](mailto:inia_lb@lb.inia.org.uy)  
[inia\\_sg@sg.inia.org.uy](mailto:inia_sg@sg.inia.org.uy)  
[iniatbo@tb.inia.org.uy](mailto:iniatbo@tb.inia.org.uy)  
[iniatt@tyt.inia.org.uy](mailto:iniatt@tyt.inia.org.uy)

## FONDO DE PROMOCIÓN DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA (FPTA)

### Estrategia del Proyecto

Se plantea que el período de duración del proyecto sea 3 años, comenzando en abril de 2014. La estrategia involucra el trabajo colaborativo directo entre el Sector Productivo y el laboratorio proponente. El Sector Productivo, aportará la logística de colección de muestras en las zonas citricolas más relevantes del país, realizará asesoramiento técnico a nivel de campo y aportará datos para encuesta. Se propone que el período de colecta sea durante los primeros 30 meses de duración del proyecto. Se definirán 5 zonas para el relevamiento, las cuales comprenden los departamentos de: Salto; Paysandú-Río Negro; San José; Rivera y Canelones-Montevideo. Hemos incluido en el equipo de trabajo a un colega que es Dr. en matemática y su especialidad es la estadística, y ha sido quien en base a datos reales existentes en la publicación N° 299 "Encuesta Citrícola-2011, del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, ha realizado un estudio exhaustivo y ha determinado el número de muestras a estudiar, teniendo en cuenta las áreas geográficas y variedades. Para que el muestreo sea estadísticamente significativo y se pueda proyectar al resto del país al finalizar el estudio, se utilizará un intervalo de confianza del 95% y una tolerancia de error del 3%. Basados en estos cálculos el tamaño muestral (N) asciende a un total de 1068 plantas, el cual se repartirá de manera proporcional según región y tipo de planta y en cada quinta seleccionada se realizará un muestreo simple. Se tomarán en cuenta plantas sanas como plantas con síntomas de enfermedades. Se colectarán muestras de naranja del grupo Valencia y Navel, mandarinas del grupo de las Clementinas y también de limón. Para el procesamiento estadístico de los datos se contratará de manera transitoria un asesor técnico estadista y un asesor del proyecto. El muestreo irá acompañado de una "encuesta de situación" que incluirá datos: variedad, edad, densidad, zona geográfica, producción, estado general de la planta y predio, clima, manejo, etc. Se analizarán todas las muestras, se obtendrán resultados y conclusiones de cada región a fin de establecer el grado de afectación. Se trazarán nuevas perspectivas y acciones.

En paralelo se realizarán reuniones de avance, trimestrales o semestrales, con las empresas involucradas en el proyecto para actualización y coordinación de siguientes acciones.

Luego por todo el período se contratarán dos técnicos para los estudios de laboratorio, con cargos correspondientes a un grado 1 con 40 horas semanales y otro cargo grado 1 de 20 horas semanales. En cuanto a la metodología a utilizar en el laboratorio se procederá de la siguiente manera: La extracción del ARN se realizará a partir de hojas colectadas mediante la utilización de kits comerciales. Luego de obtenido el ARN se realizará la síntesis de ADN copia (RT) mediante la utilización de primers randómicos para el posterior análisis de los diferentes patógenos. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se realizará para distintos genes de los distintos virus. Para el caso de CTV se analizarán los genes p20, p23 y p25, ampliamente utilizados en la literatura para el diagnóstico y caracterización. Para CPsV se amplificará un fragmento de 411 pb de la proteína de cápside y para la detección del viroide de la Exocortis se amplificará el genoma completo dado su pequeño tamaño. Es importante destacar que debido a la elevada estructuración secundaria que presenta este organismo, se debe utilizar una transcriptasa reversa que funciona a una temperatura mayor que la utilizada regularmente. Luego los amplicones obtenidos serán visualizados en geles de agarosa teñidos con el agente intercalante GoodView®, purificados mediante la utilización de kits comerciales y el producto será secuenciado utilizando la plataforma del Instituto Pasteur de Montevideo. A partir de las secuencias se realizarán reconstrucciones filogenéticas utilizando programas bioinformáticos: MEGA 5 (<http://www.megasoftware.net/mega.php>). Para el caso de CTV, un análisis posterior consiste en la clonación de los fragmentos obtenidos. Se analizarán entre 10-20 clones por muestra para encontrar las cepas suaves de interés.

También se realizará un viaje al Instituto Valenciano de Investigación Agraria (I.V.I.A) ubicado en España para actualización de procedimientos e información ya que es un grupo de vanguardia en las temáticas planteadas en el presente Proyecto. Por último se realizará la difusión de los resultados obtenidos en congresos nacionales e internacionales, así como la publicación de los mismos en revistas científicas arbitradas.

Se solicitará la compra de un freezer de -80°C para conservación de muestras y la compra de reactivos de laboratorio para realizar los estudios. El monto total estimado solicitado es de 140.000 dólares americanos.

Para lograr el éxito en el presente proyecto y de acuerdo a los objetivos trazados, contamos con el apoyo logístico en las colectas de muestras de un grupo muy significativo (en cuanto a áreas plantadas y volúmenes de producción) de productores y técnicos; cuyo apoyo a éste proyecto ha quedado plasmado a través de la carta anexada de la Cámara de Exportadores Cítricos del Uruguay, en la cual se expresa dicha voluntad.

Por otro lado y como aporte fundamental para lograr las metas planteadas, destacamos que nuestro grupo de investigación ha logrado desarrollar exitosamente las técnicas de RT-PCR para la amplificación de tres genes altamente informativos de CTV (Iglesias et al., 2008), y también poseemos experiencia importante en realizar los respectivos estudios filogenéticos para establecer la severidad de las estirpes. De la misma manera, hemos desarrollado la técnica de RT-PCR para la detección de CPsV (Roy et al., 2005) y CEVd (Bernard et al., 2006).

Se desarrollarán en el marco del presente proyecto las respectivas metodologías moleculares para la detección del virus Satsuma Dwarf y los siguientes viroides: Cachexia "Hop Stunt Viroid" (HSVd), "Citrus bent leaf viroid" (CBLVd), Citrus viroid III (CVD-III) y Citrus viroid IV (CVD-IV).

El proyecto se centrará en el estudio de CTV y su caracterización genética para establecer severidad y en la detección de CPsV y el viroide CEVd. Pero se tendrá al final del proyecto las metodologías desarrolladas para la detección de todos los patógenos previamente mencionados. A su vez, es importante destacar que nuestro recientemente creado laboratorio, cuenta con toda la tecnología necesaria para llevar adelante dicho proyecto. También contamos con un equipo multidisciplinario robusto conformado por bioquímicos, biólogos, ingenieros agrónomos, estadista y especialistas en producción cítrica.

INIA Dirección Nacional  
INIA La Estanzuela  
INIA Las Brujas  
INIA Salto Grande  
INIA Tacuarembó  
INIA Treinta y Tres

Andes 1365 P. 12, Montevideo  
Ruta 50 Km. 11, Colonia  
Ruta 48 Km. 10, Canelones  
Camino a l Terrible, Salto  
Ruta 5 Km. 386, Tacuarembó  
Ruta 8 Km. 281, Treinta y Tres

Tel: 598 2902 0550  
Tel: 598 4574 8000  
Tel: 598 2367 7641  
Tel: 598 4733 5156  
Tel: 598 4632 2407  
Tel: 598 4452 2023

Fax: 598 2902 3633  
Fax: 598 4574 8012  
Fax: 598 2367 7609  
Fax: 598 4732 9624  
Fax: 598 4632 3969  
Fax: 598 4452 5701

[iniadn@dn.inia.org.uy](mailto:iniadn@dn.inia.org.uy)  
[iniate@te.inia.org.uy](mailto:iniate@te.inia.org.uy)  
[inia\\_lb@lb.inia.org.uy](mailto:inia_lb@lb.inia.org.uy)  
[inia\\_sq@sq.inia.org.uy](mailto:inia_sq@sq.inia.org.uy)  
[iniatbo@tb.inia.org.uy](mailto:iniatbo@tb.inia.org.uy)  
[iniatt@tyt.inia.org.uy](mailto:iniatt@tyt.inia.org.uy)

# FONDO DE PROMOCIÓN DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA (FPTA)

## Materiales y Métodos

El laboratorio de Virología Molecular, fundado en 2010 y funcionando desde marzo de 2011, ubicado en la sede Regional Norte de la Universidad de la República en el departamento de Salto, posee todo el equipamiento y la infraestructura necesaria para desarrollar el presente proyecto, posee un área física total de 40 metros cuadrados. Cuenta con 2 áreas principales físicamente separadas: en el área número 1 o "zona limpia" hay tres sub-áreas definidas a) cámara aséptica (con UV) donde se preparan los mixes para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), b) una segunda cámara aséptica (con UV) donde se preparan los mixes para la transcripción reversa (RT) y c) una cámara de bioseguridad Clase II Tipo B2, que permite trabajar de acuerdo a las normas de bioseguridad nivel II, destinada exclusivamente para la extracción de ácidos nucleicos procedentes de muestras potencialmente infectadas. En ésta "zona limpia" también hay un termociclador que se utiliza específicamente para realizar las RT, hay 3 heladeras con freezer, 1 baño seco, 1 baño húmedo con agitación, 6 juegos de micropipetas, microcentrifuga refrigerada y utilitarios menores. Luego en el área número 2 o "zona sucia" hay 4 equipos de PCR de tiempo final, dos de ellos son de gradiente y hay un equipo de PCR en tiempo real, también aquí hay una cámara aséptica (con UV) para purificar productos de PCR, todo el equipamiento para las electroforesis en agarosa y acrilamida (2 de c/u), 1 procesador de imágenes, 1 baño seco, 2 heladeras con freezer, 5 juegos de micropipetas, 1 microcentrifuga y utilitarios menores.

Se cuenta a su vez con una sala anexa para realizar la clonación de ADN y la cual cuenta con 1 cámara de bioseguridad Clase II Tipo B2, una estufa de 37°C, 1 baño húmedo, micropipetas, mecheros, y utilitarios menores. Se cuenta con otra zona en la que hay 4 escritorios, 4 computadoras, 1 impresora.

En cuanto al muestreo se realizará de la siguiente manera: según datos del MGAP del año 2010 en el Uruguay había 7.446.000 árboles de cítricos, sin contar pomelos. De éstos, 3.485.000 corresponden a naranjas, 3.173.000 a mandarinas y 788.000 a limones. Para realizar un muestreo sobre el total de árboles consideramos ciertos estratos, según tipo de planta y región del país:

- Naranja en Salto, Paysandú y Río Negro, San José, Canelones y Montevideo, y Rivera.
- Mandarina en Salto, Paysandú y Río Negro, San José, Canelones y Montevideo, y Rivera.
- Limón en Salto, Paysandú y Río Negro, San José, Canelones y Montevideo, y Rivera.

No se cuenta con información previa sobre la presencia y distribución del virus en cada estrato, por lo cual no se tiene en cuenta para el tamaño global de la muestra pero se espera que esta división disminuya el error de muestreo. La muestra será de 1068 árboles, que estarán repartidos proporcionalmente en los estratos de la siguiente manera:

- 190 plantas en el sur (43 de naranjas, 61 de mandarinas y 86 de limones)
- 878 en el norte (457 de naranjas, 394 de mandarinas y 27 de limones)

Dentro de cada estrato se hará un muestreo aleatorio simple. Este tamaño muestral asegura que al 95% de confianza, el porcentaje estimado de árboles infectados diferirá del real en menos de 3 unidades porcentuales.

El procedimiento a realizar en el laboratorio durante el proyecto será como sigue:

- 1) Colecta de muestras durante 30 meses en las zonas detalladas previamente. Se tomarán partes de distintas hojas de un mismo árbol, mediante un sacabocado, para abarcar la mayor distribución del virus en la planta. La mezcla de trozos de hoja será considerada como una única muestra.
- 2) Extracción de ácidos nucleicos con el Plant RNA mini kit de Qiagen siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada 5 muestras se colocará un control negativo de extracción (planta sana) para validar todo el proceso.
- 3) El cDNA se realizará con primers randómicos para CTV y CPV y se utilizará la enzima retrotranscriptasa SuperScript II (Invitrogen) según especificaciones del fabricante. Para el caso de CEVd se realizará el cDNA con el primer específico CEVd-RT 5'-CTTCTCCAGGTTTCCCCGGGATCCC-3' y la enzima que se utilizará será la ThermoScript (Invitrogen) ya que funciona a 60°C, según condiciones descritas por Bernad y colaboradores (Bernad et al., 2006).
- 4) Análisis de las muestras por PCR de acuerdo a protocolos de Roy et al., 2005 para CPV; Rubio et al., 2001 e Iglesias et al., 2008 para CTV y Bernad et al., 2006 para CEVd. Se adjunta archivo con una tabla donde se describen los primers a utilizar para cada región junto con sus respectivas secuencias, así como la referencia donde fueron citados.
- 5) Secuenciación automática bidireccional de las muestras positivas en la plataforma del Instituto Pasteur de Montevideo. Editado de secuencias utilizando programas bioinformáticos como el TaqMan del paquete DNASTAR.
- 6) Estudios filogenéticos de las muestras utilizando cepas de referencia obtenidas del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) para comparar con las secuencias obtenidas, utilizando el programa Mega 5 (Tamura K. 2011; <http://www.megasoftware.net/mega.php>).
- 7) Determinación de grados de severidad de CTV de acuerdo a resultados de los estudios filogenéticos.
- 8) Clonación de los fragmentos de los genes de interés de CTV. Se analizarán entre 10 a 20 clones de las muestras potenciales de presentar variantes suaves. Se utilizarán células competentes E. coli DH5α (Invitrogen) y el kit de clonación CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific) según las indicaciones de los fabricantes.
- 9) Secuenciación y análisis filogenéticos de los clones obtenidos. Mediante análisis de secuencias, comparando con cepas de referencia de la región y el mundo, se intentará discernir la severidad de los clones.
- 10) Construcción de tablas de datos por región con toda la información obtenida. Análisis estadísticos de los datos y su correspondiente interpretación.
- 11) Construcción de mapa geográfico nacional con regionalización de patógenos en cítricos.
- 12) Conclusiones y perspectivas.
- 13) Difusión de resultados en congresos nacionales e internacionales y publicación de los mismos en revistas científicas arbitradas. Escritura de informe de difusión con los resultados obtenidos y su utilidad para los productores con el fin de informar las herramientas disponibles para el sector.

## Gestión del Conocimiento

Los resultados del presente proyecto serán presentados en forma escrita a fin de ser publicados en revistas nacionales e internacionales. Se realizará la presentación en eventos, jornadas, congresos o simposios.

La estrategia más importante a implementar tiene que ver con el mecanismo de difusión a utilizar a fin de llegar al Sector Productivo en su totalidad. La participación del Sector en éste proyecto es de central importancia por tanto el acceso a los datos también. Una de las estrategias es preparar un informe didáctico y conciso, el cual sería enviado por email a todos aquellos que lo deseen leer. También se realizarán al menos dos jornadas de difusión e intercambio de conocimientos y experiencias con técnicos y productores.

## Beneficiarios Potenciales

## Impactos Esperados

INIA Dirección Nacional	Andes 1365 P. 12, Montevideo	Tel: 598 2902 0550	Fax: 598 2902 3633	<a href="mailto:iniadn@dn.inia.org.uy">iniadn@dn.inia.org.uy</a>
INIA La Estanzuela	Ruta 50 Km. 11, Colonia	Tel: 598 4574 8000	Fax: 598 4574 8012	<a href="mailto:iniale@e.inia.org.uy">iniale@e.inia.org.uy</a>
INIA Las Brujas	Ruta 48 Km. 10, Canelones	Tel: 598 2367 7641	Fax: 598 2367 7609	<a href="mailto:inia_lb@lb.inia.org.uy">inia_lb@lb.inia.org.uy</a>
INIA Salto Grande	Camino a l Terrible, Salto	Tel: 598 4733 5156	Fax: 598 4732 9624	<a href="mailto:inia_sg@sg.inia.org.uy">inia_sg@sg.inia.org.uy</a>
INIA Tacuarembó	Ruta 5 Km. 386, Tacuarembó	Tel: 598 4632 2407	Fax: 598 4632 3969	<a href="mailto:iniatbo@t.inia.org.uy">iniatbo@t.inia.org.uy</a>
INIA Treinta y Tres	Ruta 8 Km. 281, Treinta y Tres	Tel: 598 4452 2023	Fax: 598 4452 5701	<a href="mailto:iniatt@tyt.inia.org.uy">iniatt@tyt.inia.org.uy</a>

## FONDO DE PROMOCIÓN DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA (FPTA)

Impactos Económicos				
<b>Variable Afectada:</b>	Productividad	<b>Comentarios:</b>	Los resultados de presente proyecto generarán conocimiento que le permitirá a los productores disminuir las pérdidas y la incidencia de éstas enfermedades, a través del mejoramiento en el manejo. Las pérdidas económicas para el sector a nivel nacional son actualmente del 30 %, se plantea que éste proyecto puede disminuir las mismas inicialmente en un 10%. Se contribuirá de manera sustantiva al sector citrícola así como directamente a INIA, en que se podrá contar a nivel nacional con metodologías modernas altamente confiables en términos técnicos, que permiten no solo la detección sino que también la caracterización molecular de una importante gama de patógenos. Dichas metodologías contribuirán fortaleciendo al actual Programa de Saneamiento de Cítricos que ha desarrollado INIA. Estas metodologías podrán ser transferidas a INIA y/o puestas al servicio de los productores que así deseen acceder a ellas y también al Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca.	<b>Impacto:</b> 1
<b>Variable Afectada:</b>	Calidad de Producto	<b>Comentarios:</b>	Los datos generados en el presente proyecto permitirán mejoras en el manejo a nivel de campo por parte de los productores. Estos cambios se verán reflejados en el aumento de la calidad y cantidad de fruta colectada a lo largo de las regiones cítricas del país. En el mediano plazo, los datos del presente proyecto podrán ser utilizados para un futuro programa de protección cruzada, cuyo éxito permitirá mejoras sustantivas en la calidad y cantidad de frutos.	<b>Impacto:</b> 1
<b>Variable Afectada:</b>	Nuevos Mercados	<b>Comentarios:</b>	Los resultados del presente proyecto colaborarán directamente en mejorar la calidad de la fruta y los volúmenes de producción. Hoy en día se ha abierto la posibilidad de exportar a mercados muy competitivos y demandantes como lo es Estados Unidos, por lo cual lograr mejoras importantes a nivel calidad/cantidad es esencial.	<b>Impacto:</b> 1
<b>Variable Afectada:</b>	Ingresos	<b>Comentarios:</b>	El presente proyecto aportará información que servirá directamente en mejorar la calidad y cantidad de fruta, ello directamente mejorará en el mediano y largo plazo los ingresos a nivel económicos del sector y por tanto también tendrá un impacto altamente positivo para el país.	<b>Impacto:</b> 1

Impactos Sociales				
<b>Variable Afectada:</b>	Capacitación Técnica	<b>Comentarios:</b>	Se formarán recursos humanos entrenados en la detección de virus y viroides en cítricos utilizando métodos de biología molecular. Se extenderá dicha formación a técnico de INIA. Se contará al final del proyecto con recursos humanos formados y con gran experiencia en el tema.	<b>Impacto:</b> 2

Impactos Ambientales				

INIA Dirección Nacional	Andes 1365 P. 12, Montevideo	Tel: 598 2902 0550	Fax: 598 2902 3633	<a href="mailto:iniadn@dn.inia.org.uy">iniadn@dn.inia.org.uy</a>
INIA La Estanzuela	Ruta 50 Km. 11, Colonia	Tel: 598 4574 8000	Fax: 598 4574 8012	<a href="mailto:iniate@te.inia.org.uy">iniate@te.inia.org.uy</a>
INIA Las Brujas	Ruta 48 Km. 10, Canelones	Tel: 598 2367 7641	Fax: 598 2367 7609	<a href="mailto:inia_lb@lb.inia.org.uy">inia_lb@lb.inia.org.uy</a>
INIA Salto Grande	Camino a l Terrible, Salto	Tel: 598 4733 5156	Fax: 598 4732 9624	<a href="mailto:inia_sg@sq.inia.org.uy">inia_sg@sq.inia.org.uy</a>
INIA Tacuarembó	Ruta 5 Km. 386, Tacuarembó	Tel: 598 4632 2407	Fax: 598 4632 3969	<a href="mailto:iniatbo@tb.inia.org.uy">iniatbo@tb.inia.org.uy</a>
INIA Treinta y Tres	Ruta 8 Km. 281, Treinta y Tres	Tel: 598 4452 2023	Fax: 598 4452 5701	<a href="mailto:iniatt@tyt.inia.org.uy">iniatt@tyt.inia.org.uy</a>

**FONDO DE PROMOCIÓN DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA (FPTA)**

**Matriz de Marco Lógico**

	<b>Narrativa</b>	<b>Indicadores</b>	<b>Medio de Verificación</b>	<b>Supuestos</b>
<b>Fin</b>	<p>El presente proyecto contribuirá a solucionar en el mediano y largo plazo problemas productivos causados por virus y viroides que generan actualmente importantes pérdidas en el Sector Productivo Citrícola del Uruguay. Éstos problemas han sido resueltos en otros países del mundo utilizando estrategias como la presentada en éste proyecto y por ello entendemos que éste proyecto generará contribuciones sin precedentes en el país. Se contribuirá al desarrollo tanto productivo como biotecnológico. En el caso particular de CTV se generarán datos de gran importancia sobre la severidad de las estirpes a nivel nacional y regional. Estos datos serán de gran utilidad en el mediano y largo plazo, para trabajar en establecer un futuro programa de protección cruzada. El proyecto contribuirá al control de enfermedades en un sistema vegetal intensivo como lo es el cultivo de cítricos mediante el desarrollo y utilización de metodologías moleculares. Mediante la difusión de resultados se contribuirá al manejo de información actualizada por parte de los técnicos y productores, lo cual también contribuirá al fin mencionado. En el largo plazo los resultados del presente proyecto contribuirán a mejorar la producción citrícola nacional.</p>	<p>Los indicadores serán la obtención de todos los resultados esperados en el presente proyecto. El principal indicador se verá reflejado en el aumento de la producción citrícola en el mediano y largo plazo. Por tanto los datos que se obtengan en el presente proyecto podrán tener un impacto en aumentar al menos un 10% la producción actual. Otro indicador muy ambicioso pero posible de realizar será la concreción de un programa de protección cruzada a nivel nacional, a lograrse en el mediano y largo plazo. Esto tendrá un impacto directo en el aumento de la producción cítrica nacional. Otro indicador será que dichas tecnologías podrán ser transferidas e incorporadas por el actual Plan de Saneamiento Citrícola de INIA. De la misma manera en el mediano plazo el MGAP también podrá contar con dichas herramientas.</p>	<p>Se verificará la presencia/ausencia de los patógenos mencionados en la presente propuesta mediante la utilización de la metodología molecular RT-PCR. Para el caso de CTV se realizarán a su vez estudios filogenéticos mediante la utilización de programas bioinformáticos, utilizando secuencias de ADN de las cepas circulantes en el país, con el fin de identificar la severidad de las mismas.</p>	<p>Se trabajará para la concreción de los objetivos planteados.</p>

INIA Dirección Nacional  
 INIA La Estanzuela  
 INIA Las Brujas  
 INIA Salto Grande  
 INIA Tacuarembó  
 INIA Treinta y Tres

Andes 1365 P. 12, Montevideo  
 Ruta 50 Km. 11, Colonia  
 Ruta 48 Km. 10, Canelones  
 Camino a l Terrible, Salto  
 Ruta 5 Km. 386, Tacuarembó  
 Ruta 8 Km. 281, Treinta y Tres

Tel: 598 2902 0550  
 Tel: 598 4574 8000  
 Tel: 598 2367 7641  
 Tel: 598 4733 5156  
 Tel: 598 4632 2407  
 Tel: 598 4452 2023

Fax: 598 2902 3633  
 Fax: 598 4574 8012  
 Fax: 598 2367 7609  
 Fax: 598 4732 9624  
 Fax: 598 4632 3969  
 Fax: 598 4452 5701

[iniadn@dn.inia.org.uy](mailto:iniadn@dn.inia.org.uy)  
[iniale@te.inia.org.uy](mailto:iniale@te.inia.org.uy)  
[inia\\_lb@lb.inia.org.uy](mailto:inia_lb@lb.inia.org.uy)  
[inia\\_sg@sg.inia.org.uy](mailto:inia_sg@sg.inia.org.uy)  
[iniatbo@b.inia.org.uy](mailto:iniatbo@b.inia.org.uy)  
[iniatt@tyt.inia.org.uy](mailto:iniatt@tyt.inia.org.uy)

## FONDO DE PROMOCIÓN DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA (FPTA)

<b>Propósito</b>	El propósito del proyecto será lograr conocer en profundidad el grado de afectación que los patógenos de origen viral y viroidal producen en las distintas regiones cítricas del Uruguay. Éstos conocimientos producirán en el Sector Productivo cambios de comportamiento en el manejo a nivel de campo de los cultivos cítricos, y en el ingreso seguro de nuevas plantas a los predios, a fin de evitar la diseminación de las mencionadas enfermedades. También generará un cambio en cuanto al acceso a nuevas tecnologías para testear sus cultivos. Otro de los propósitos será el desarrollo de metodologías moleculares altamente sensibles y específicas, las cuales conformarán un componente y producto fundamental que éste proyecto generará. Estas metodologías podrán ser utilizadas en el futuro por el Sector Productivo para el control de sus enfermedades, ya que actualmente no existen en el país metodologías de éste tipo para ese propósito. De la misma manera éstos desarrollos metodológicos podrán ser utilizados, transferidos o incluidos en el Programa Nacional de Saneamiento de Cítricos, así como por otros potenciales usuarios. Ello permitirá la continuidad del monitoreo de nuevas plantas o nuevos predios. Otro de los propósitos es difundir los resultados obtenidos mediante de la manera mas amplia posible: publicaciones, presentaciones, jornadas, informe técnico; ésto permitirá contribuir directamente al fin.	Los indicadores serán la obtención de todos los resultados esperados en el presente proyecto. El principal indicador será lograr estudiar el número establecido de muestras en el tiempo establecido, y lograr su caracterización molecular de manera precisa. De la misma manera será un indicador la concreción de jornadas con el sector productivo en la que se informará sobre los avances y resultados obtenidos. También un indicador serán la o las publicaciones a realizarse.	Los medios de verificación del Propósito se realizarán mediante la entrega de informes, publicaciones, presentación en congresos y jornadas de difusión de datos con el sector productivo e INIA.	Se trabajará para la concreción de los objetivos planteados.
<b>Componente</b>	Otro producto a obtener es la publicación y difusión de resultados obtenidos. También la presentación en congresos, escritura de un informe para el Sector Productivo y jornadas de presentación de resultados.	Se publicarán los resultados obtenidos en revistas arbitradas nacionales e internacionales, así como también se realizará la difusión de los resultados en congresos. Se informará al sector productivo de los resultados para que puedan ser implementados en programas de manejo y mejorar de esta manera la producción cítrica nacional.	Se verificará el componente a través de las publicaciones, jornadas y congresos, previamente descritas.	Se espera cumplir con lo establecido en el componente, a fin de lograr la respectiva concreción del proyecto.
<b>Componente</b>	Desarrollo de técnicas de biología molecular para la detección de los siguientes viroides: Hop Stunt Viroid (HSVd), Citrus bent leaf viroid (CBLVd), Citrus viroid III (CVd-III) y Citrus viroid IV (CVd-IV). La metodología de detección para Citrus Exocortis Viroid (CEVd) ya se ha desarrollado en nuestro laboratorio.	Amplificación de los genomas completos de los viroides mencionados previamente.	Los productos amplificados se visualizarán en geles de agarosa.	Dada la experiencia previa en la implementación de metodologías de detección de viroides se espera no tener inconvenientes en la puesta a punto de las metodologías propuestas en el presente proyecto.

**INIA Dirección Nacional**  
**INIA La Estanzuela**  
**INIA Las Brujas**  
**INIA Salto Grande**  
**INIA Tacuarembó**  
**INIA Treinta y Tres**

**Andes 1365 P. 12, Montevideo**  
**Ruta 50 Km. 11, Colonia**  
**Ruta 48 Km. 10, Canelones**  
**Camino a l Terrible, Salto**  
**Ruta 5 Km. 386, Tacuarembó**  
**Ruta 8 Km. 281, Treinta y Tres**

**Tel: 598 2902 0550**  
**Tel: 598 4574 8000**  
**Tel: 598 2367 7641**  
**Tel: 598 4733 5156**  
**Tel: 598 4632 2407**  
**Tel: 598 4452 2023**

**Fax: 598 2902 3633**  
**Fax: 598 4574 8012**  
**Fax: 598 2367 7609**  
**Fax: 598 4732 9624**  
**Fax: 598 4632 3969**  
**Fax: 598 4452 5701**

[iniadn@dn.inia.org.uy](mailto:iniadn@dn.inia.org.uy)  
[iniate@le.inia.org.uy](mailto:iniate@le.inia.org.uy)  
[inia\\_lb@lb.inia.org.uy](mailto:inia_lb@lb.inia.org.uy)  
[inia\\_sg@sg.inia.org.uy](mailto:inia_sg@sg.inia.org.uy)  
[iniatho@tb.inia.org.uy](mailto:iniatho@tb.inia.org.uy)  
[iniatt@tyt.inia.org.uy](mailto:iniatt@tyt.inia.org.uy)

**FONDO DE PROMOCIÓN DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA (FPTA)**

15/04

<b>Componente</b>	Desarrollo de técnicas de biología molecular para la detección y caracterización de los siguientes virus: CPsV y Satsuma Dwarf. CTV ya se ha desarrollado en nuestro laboratorio.	Se espera obtener mediante RT-PCR, la amplificación de los productos con el tamaño esperado. Se utilizarán los correspondientes controles positivos y negativos para validación de la metodología.	Se visualizarán los amplicones mediante la utilización de geles de agarosa.	Se espera establecer las metodologías planteadas para lograr así la concreción de los objetivos del proyecto. Cabe destacar que no se espera que ocurran dificultades en la estandarización de la técnica dada la previa experiencia en la detección de CTV mediante RT-PCR.
<b>Componente</b>	Estudio de la severidad de las cepas virales para CTV en las distintas muestras obtenidas, mediante amplificación y secuenciación de 3 genes: p23, p25, p20.	Obtención de los productos de PCR del tamaño esperado correspondientes a cada uno de los genes, para su posterior secuenciación y estudio filogenético.	La amplificación de los productos se visualizará en geles de agarosa teñidos con el agente intercalante GoodView. La calidad de las secuencias se verificará a través de cromatogramas y los análisis filogenéticos se obtendrán mediante programas bioinformáticos.	Se espera obtener productos de PCR y secuencias de los mismos de buena calidad para poder realizar los estudios planteados en el proyecto.
<b>Componente</b>	Evaluación de la incidencia a nivel regional de los distintos patógenos estudiados de acuerdo a la especie de planta analizada.	Se evaluará la presencia/ausencia de cada patógeno en cada especie de planta y se establecerá la distribución de los mismos a nivel país y por especie cítrica.	El estado de la planta se verificará mediante la utilización de las metodologías moleculares previamente descritas para establecer la presencia/ausencia de los patógenos. Los datos se analizarán usando herramientas estadísticas.	Se espera poder determinar el estado de cada patógeno en cada planta analizada con el fin de obtener información proveniente de todo el país y así poder realizar un informe completo de la situación nacional.
<b>Componente</b>	Muestreo y estudio durante el período de dos años, de 1068 plantas procedentes de Rivera, Salto, Paysandú, Rio Negro, Florida, Canelones, Maldonado, Colonia y Montevideo.	Obtención de las muestras para procesar durante el transcurso del proyecto.	Se verificará mediante la obtención de la materia prima para la posterior realización de la extracción del ARN y los procedimientos sucesivos. Como producto final del proceso se obtendrán las secuencias correspondientes a los distintos patógenos a estudiar en la presente propuesta.	Se realizará el muestreo con la colaboración de la Cámara de Exportadores de Citrus del Uruguay, por lo que no se esperan inconvenientes en la recolección de las 1068 muestras a analizar.
<b>Componente</b>	Obtención de resultados y conclusiones con soporte estadístico a fin de que puedan ser utilizados por el MGAP y por el Programa Nacional de Saneamiento de Citrus.	Se analizarán los datos y se obtendrán conclusiones al respecto para que puedan ser utilizadas en planes de manejo de los cultivares. A su vez se propondrán perspectivas para seguir mejorando la citricultura del país.	Se verificará el componente mediante la redacción de informes.	Se espera que la redacción de los informes sean de utilidad para el sector productivo cítrico nacional.
<b>Componente</b>	Se utilizarán las metodologías desarrolladas a fin de realizar el estudio y análisis de los patógenos mencionados en las distintas zonas cítricas del Uruguay, con el apoyo del Sector Productivo. El proyecto entregará un estudio detallado y actualizado del nivel de afectación existente en las distintas zonas cítricas del Uruguay.	Lograr la detección y caracterización de las muestras de campo colectadas de los virus y viroides implicados en la presente propuesta, utilizando la metodología molecular de RT-PCR, y en el caso de CTV su caracterización filogenética a fin de establecer la severidad de las estirpes.	Se verificará mediante la correcta amplificación mediante RT-PCR de las muestras colectadas, validando la metodología con la utilización de los correspondientes controles positivos y negativos. La visualización de los resultados se realizará en geles de agarosa teñidos con el agente intercalante GoodView.	Se trabajará para lograr cumplir con los objetivos establecidos.

**Detalle de las Actividades**

**Componente:** Obtención de resultados y conclusiones con soporte estadístico a fin de que puedan ser utilizados p

**Actividad:** Análisis de datos

**Descripción**

Análisis estadísticos de los datos con el fin de desarrollar conclusiones respecto al proyecto desarrollado.

**Duración**

**Fecha inicio:** 01/07/2015

**Fecha Fin:** 28/02/2017

**Equipo Técnico Participante**

Rol	Nombre
Responsable	Federico Dalmao Artigas

INIA Dirección Nacional  
 INIA La Estanzuela  
 INIA Las Brujas  
 INIA Salto Grande  
 INIA Tacuarembó  
 INIA Treinta y Tres

Andes 1365 P. 12, Montevideo  
 Ruta 50 Km. 11, Colonia  
 Ruta 48 Km. 10, Canelones  
 Camino a l Terrible, Salto  
 Ruta 5 Km. 386, Tacuarembó  
 Ruta 8 Km. 281, Treinta y Tres

Tel: 598 2902 0550  
 Tel: 598 4574 8000  
 Tel: 598 2367 7641  
 Tel: 598 4733 5156  
 Tel: 598 4632 2407  
 Tel: 598 4452 2023

Fax: 598 2902 3633  
 Fax: 598 4574 8012  
 Fax: 598 2367 7609  
 Fax: 598 4732 9624  
 Fax: 598 4632 3969  
 Fax: 598 4452 5701

[iniadn@dn.inia.org.uy](mailto:iniadn@dn.inia.org.uy)  
[iniale@le.inia.org.uy](mailto:iniale@le.inia.org.uy)  
[inia\\_lb@lb.inia.org.uy](mailto:inia_lb@lb.inia.org.uy)  
[inia\\_sg@sg.inia.org.uy](mailto:inia_sg@sg.inia.org.uy)  
[iniatbo@tb.inia.org.uy](mailto:iniatbo@tb.inia.org.uy)  
[iniatt@tyt.inia.org.uy](mailto:iniatt@tyt.inia.org.uy)

## FONDO DE PROMOCIÓN DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA (FPTA)

Instituciones Participantes	
Universidad de la República (UdelaR)/ Regional Norte	
Universidad de la República (UdelaR)/ Facultad de Ciencias	
Resultados Esperados (Producto / Proceso Tecnológico)	
Descripción:	Se analizarán los resultados agrupando por especie cítrica y por región del país, la distribución de los distintos patógenos analizados. Se entregará un informe con los mismos.
Tipo:	3-Desarrollo de tecnologías, productos y procesos
Categoría:	3.14-Generación de conocimiento
Indicador:	3.14.3-Estudios sobre organismos perjudiciales en plantas y animales
Fecha de Planificación:	30/05/2013
Detalle de las Actividades	
<b>Componente:</b> Evaluación de la incidencia a nivel regional de los distintos patógenos estudiados de acuerdo a la	
<b>Actividad:</b> Análisis de las muestras	
Descripción	
Extracción de ARN, amplificación del genoma por RT-PCR, purificación y secuenciación de cada muestra analizada para todos los virus y viroides planteados en el presente proyecto	
Duración	
Fecha Inicio: 01/05/2014	Fecha Fin: 30/09/2016
Equipo Técnico Participante	
Rol	Nombre
Responsable	Humberto Rodney Colina Muñoz
Participante	María José Benitez Galeano
Participante	Luciana Burutaran
Instituciones Participantes	
Universidad de la República (UdelaR)/ Facultad de Ciencias	
Resultados Esperados (Producto / Proceso Tecnológico)	
Descripción:	El entregable será un archivo con el procesamiento total de las muestras para todos los patógenos implicados en el presente proyecto.
Tipo:	3-Desarrollo de tecnologías, productos y procesos
Categoría:	3.13-Sistemas de Información
Indicador:	3.13.9-Algoritmos
Fecha de Planificación:	30/05/2013
Detalle de las Actividades	
<b>Componente:</b> Desarrollo de técnicas de biología molecular para la detección y caracterización de los siguientes	
<b>Actividad:</b> Análisis de las muestras colectadas	
Descripción	
Se realizará la búsqueda de CPsV y SDV en las muestras colectadas durante toda la duración del proyecto.	
Duración	
Fecha Inicio: 01/06/2014	Fecha Fin: 30/09/2016
Equipo Técnico Participante	
Rol	Nombre
Responsable	Humberto Rodney Colina Muñoz
Participante	María José Benitez Galeano
Participante	Luciana Burutaran
Instituciones Participantes	
Universidad de la República (UdelaR)/ Facultad de Ciencias	
Resultados Esperados (Producto / Proceso Tecnológico)	
Descripción:	El entregable será obtener un archivo con la positividad y negatividad de las muestras estudiadas por región cítrica para Psorosis y en aquellas plantas con síntomas para Satsuma Dwarf.
Tipo:	3-Desarrollo de tecnologías, productos y procesos
Categoría:	3.14-Generación de conocimiento
Indicador:	3.14.3-Estudios sobre organismos perjudiciales en plantas y animales
Fecha de Planificación:	30/05/2013

INIA Dirección Nacional  
 INIA La Estanzuela  
 INIA Las Brujas  
 INIA Salto Grande  
 INIA Tacuarembó  
 INIA Treinta y Tres

Andes 1365 P. 12, Montevideo  
 Ruta 50 Km. 11, Colonia  
 Ruta 48 Km. 10, Canelones  
 Camino a l Terrible, Salto  
 Ruta 5 Km. 386, Tacuarembó  
 Ruta 8 Km. 281, Treinta y Tres

Tel: 598 2902 0550  
 Tel: 598 4574 8000  
 Tel: 598 2367 7641  
 Tel: 598 4733 5156  
 Tel: 598 4632 2407  
 Tel: 598 4452 2023

Fax: 598 2902 3633  
 Fax: 598 4574 8012  
 Fax: 598 2367 7609  
 Fax: 598 4732 9624  
 Fax: 598 4632 3969  
 Fax: 598 4452 5701

[iniadn@dn.inia.org.uy](mailto:iniadn@dn.inia.org.uy)  
[iniiale@le.inia.org.uy](mailto:iniiale@le.inia.org.uy)  
[inia\\_lb@lb.inia.org.uy](mailto:inia_lb@lb.inia.org.uy)  
[inia\\_sg@sg.inia.org.uy](mailto:inia_sg@sg.inia.org.uy)  
[iniatbo@b.inia.org.uy](mailto:iniatbo@b.inia.org.uy)  
[iniatt@tyt.inia.org.uy](mailto:iniatt@tyt.inia.org.uy)

**FONDO DE PROMOCIÓN DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA (FPTA)**

16/11/13  
AM

<b>Equipo Técnico Participante</b>	
Rol	Nombre
Responsable	Humberto Rodney Colina Muñoz
Participante	María José Benítez Galeano
Participante	Luciana Burutaran

<b>Instituciones Participantes</b>
Universidad de la República (UdelaR)/ Facultad de Ciencias

<b>Resultados Esperados (Producto / Proceso Tecnológico)</b>	
<b>Descripción:</b>	El entregable será obtener una carpeta final que contenga los datos de positividad y negatividad por región para los viroides en estudio, haciendo especial énfasis en Exocortis. Para los demás viroides se realizará el estudio si la planta presenta los respectivos síntomas.
<b>Tipo:</b>	3-Desarrollo de tecnologías, productos y procesos
<b>Categoría:</b>	3.14-Generación de conocimiento
<b>Indicador:</b>	3.14.3-Estudios sobre organismos perjudiciales en plantas y animales
<b>Fecha de Planificación:</b>	30/05/2013

**Detalle de las Actividades**

**Componente:** Estudio de la severidad de las cepas virales para CTV en las distintas muestras obtenidas, mediante

**Actividad:** Análisis de las muestras para CTV

**Descripción**

Se realizará la extracción del ARN, el ADNc y la PCR para cada uno de los genes a analizar de CTV, para todas las muestras colectadas durante el proyecto.

**Duración**

**Fecha Inicio:** 01/06/2014      **Fecha Fin:** 30/09/2016

<b>Equipo Técnico Participante</b>	
Rol	Nombre
Responsable	Humberto Rodney Colina Muñoz
Participante	María José Benítez Galeano
Participante	Luciana Burutaran

<b>Instituciones Participantes</b>
Universidad de la República (UdelaR)/ Facultad de Ciencias

<b>Resultados Esperados (Producto / Proceso Tecnológico)</b>	
<b>Descripción:</b>	El entregable será obtener un archivo con el procesamiento de todas las muestras estudiadas para los 3 genes de CTV por región citrícola.
<b>Tipo:</b>	3-Desarrollo de tecnologías, productos y procesos
<b>Categoría:</b>	3.12-Productos Biotecnológicos
<b>Indicador:</b>	3.12.1-Mapas de ligamento
<b>Fecha de Planificación:</b>	30/05/2013

**Detalle de las Actividades**

**Componente:** Se utilizarán las metodologías desarrolladas a fin de realizar el estudio y análisis de los patógen

**Actividad:** Análisis de las muestras procesadas

**Descripción**

Se realizará la extracción, el ADNc y la PCR de cada muestra para cada uno de los patógenos a analizar en la presente propuesta.

**Duración**

**Fecha Inicio:** 01/05/2014      **Fecha Fin:** 01/09/2016

<b>Equipo Técnico Participante</b>	
Rol	Nombre
Responsable	Humberto Rodney Colina Muñoz
Participante	María José Benítez Galeano
Participante	Luciana Burutaran

<b>Instituciones Participantes</b>
Universidad de la República (UdelaR)/ Facultad de Ciencias

INIA Dirección Nacional  
INIA La Estanzuela  
INIA Las Brujas  
INIA Salto Grande  
INIA Tacuarembó  
INIA Treinta y Tres

Andes 1365 P. 12, Montevideo  
Ruta 50 Km. 11, Colonia  
Ruta 48 Km. 10, Canelones  
Camino a l Terrible, Salto  
Ruta 5 Km. 386, Tacuarembó  
Ruta 8 Km. 281, Treinta y Tres

Tel: 598 2902 0550  
Tel: 598 4574 8000  
Tel: 598 2367 7641  
Tel: 598 4733 5156  
Tel: 598 4632 2407  
Tel: 598 4452 2023

Fax: 598 2902 3633  
Fax: 598 4574 8012  
Fax: 598 2367 7609  
Fax: 598 4732 9624  
Fax: 598 4632 3969  
Fax: 598 4452 5701

[iniadn@dn.inia.org.uy](mailto:iniadn@dn.inia.org.uy)  
[iniale@le.inia.org.uy](mailto:iniale@le.inia.org.uy)  
[inia\\_lb@lb.inia.org.uy](mailto:inia_lb@lb.inia.org.uy)  
[inia\\_sg@sg.inia.org.uy](mailto:inia_sg@sg.inia.org.uy)  
[iniatbo@b.inia.org.uy](mailto:iniatbo@b.inia.org.uy)  
[iniatt@tyt.inia.org.uy](mailto:iniatt@tyt.inia.org.uy)

## FONDO DE PROMOCIÓN DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA (FPTA)

Resultados Esperados (Producto / Proceso Tecnológico)	
<b>Descripción:</b>	El entregable será obtener una planilla que indique que se han logrado analizar exitosamente todas las muestras colectadas para cada patógeno.
<b>Tipo:</b>	3-Desarrollo de tecnologías, productos y procesos
<b>Categoría:</b>	3.14-Generación de conocimiento
<b>Indicador:</b>	3.14.3-Estudios sobre organismos perjudiciales en plantas y animales
<b>Fecha de Planificación:</b>	30/05/2013

### Detalle de las Actividades

**Componente:** Evaluación de la incidencia a nivel regional de los distintos patógenos estudiados de acuerdo a la

**Actividad:** Análisis estadístico

#### Descripción

Se evaluarán los resultados mediante metodologías estadísticas para poder así obtener conclusiones.

#### Duración

**Fecha Inicio:** 01/07/2015

**Fecha Fin:** 28/02/2017

### Equipo Técnico Participante

Rol	Nombre
Responsable	Federico Dalmao Artigas

### Instituciones Participantes

Universidad de la República (UdelaR)/ Facultad de Ciencias

Resultados Esperados (Producto / Proceso Tecnológico)	
<b>Descripción:</b>	Los resultados obtenidos serán procesados por un especialista en estadística para darles robustez a los mismos. El producto entregable será un informe sobre lo antedicho.
<b>Tipo:</b>	3-Desarrollo de tecnologías, productos y procesos
<b>Categoría:</b>	3.14-Generación de conocimiento
<b>Indicador:</b>	3.14.3-Estudios sobre organismos perjudiciales en plantas y animales
<b>Fecha de Planificación:</b>	30/05/2013

### Detalle de las Actividades

**Componente:** Estudio de la severidad de las cepas virales para CTV en las distintas muestras obtenidas, mediante

**Actividad:** Análisis filogenéticos

#### Descripción

Utilizando las secuencias obtenidas se realizarán estudios filogenéticos de las cepas circulantes en el país y se compararán con cepas de referencia del mundo, con el fin de establecer el grado de severidad de las mismas.

#### Duración

**Fecha Inicio:** 01/11/2016

**Fecha Fin:** 28/02/2017

### Equipo Técnico Participante

Rol	Nombre
Responsable	Humberto Rodney Colina Muñoz
Participante	María José Benitez Galeano
Participante	Luciana Burutaran

### Instituciones Participantes

Universidad de la República (UdelaR)/ Facultad de Ciencias

Resultados Esperados (Producto / Proceso Tecnológico)	
<b>Descripción:</b>	Los entregables serán un archivo con los respectivos árboles filogenéticos realizados para los tres genes estudiados de CTV y una planilla ordenada por región y variedad con los datos de severidad.
<b>Tipo:</b>	3-Desarrollo de tecnologías, productos y procesos
<b>Categoría:</b>	3.14-Generación de conocimiento
<b>Indicador:</b>	3.14.3-Estudios sobre organismos perjudiciales en plantas y animales
<b>Fecha de Planificación:</b>	30/05/2013

### Detalle de las Actividades

**Componente:** Otro producto a obtener es la publicación y difusión de resultados obtenidos. También la presentac

**Actividad:** Divulgación de resultados

#### Descripción

Se presentarán los resultados en revistas nacionales e internacionales arbitradas así como en congresos.

INIA Dirección Nacional  
INIA La Estanzuela  
INIA Las Brujas  
INIA Salto Grande  
INIA Tacuarembó  
INIA Treinta y Tres

Andes 1365 P. 12, Montevideo  
Ruta 50 Km. 11, Colonia  
Ruta 48 Km. 10, Canelones  
Camino a l Terrible, Salto  
Ruta 5 Km. 386, Tacuarembó  
Ruta 8 Km. 281, Treinta y Tres

Tel: 598 2902 0550  
Tel: 598 4574 8000  
Tel: 598 2367 7641  
Tel: 598 4733 5156  
Tel: 598 4632 2407  
Tel: 598 4452 2023

Fax: 598 2902 3633  
Fax: 598 4574 8012  
Fax: 598 2367 7609  
Fax: 598 4732 9624  
Fax: 598 4632 3969  
Fax: 598 4452 5701

[iniadn@dn.inia.org.uy](mailto:iniadn@dn.inia.org.uy)  
[iniate@te.inia.org.uy](mailto:iniate@te.inia.org.uy)  
[inia\\_lb@lb.inia.org.uy](mailto:inia_lb@lb.inia.org.uy)  
[inia\\_sq@sq.inia.org.uy](mailto:inia_sq@sq.inia.org.uy)  
[iniatbo@b.inia.org.uy](mailto:iniatbo@b.inia.org.uy)  
[iniatt@tyt.inia.org.uy](mailto:iniatt@tyt.inia.org.uy)

**FONDO DE PROMOCIÓN DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA (FPTA)**

**Duración**

**Fecha Inicio:** 15/12/2016

**Fecha Fin:** 31/03/2017

**Equipo Técnico Participante**

Rol	Nombre
Responsable	Humberto Rodney Colina Muñoz
Participante	María José Benitez Galeano
Participante	Federico Dalmao Artigas
Participante	Luciana Burutaran

**Instituciones Participantes**

Universidad de la República (UdelAR)/ Facultad de Ciencias

**Resultados Esperados (Producto / Proceso Tecnológico)**

<b>Descripción:</b>	El producto entregable será la publicación de los resultados obtenidos en revistas indexadas nacionales e internacionales.
<b>Tipo:</b>	3-Desarrollo de tecnologías, productos y procesos
<b>Categoría:</b>	3.14-Generación de conocimiento
<b>Indicador:</b>	3.14.3-Estudios sobre organismos perjudiciales en plantas y animales
<b>Fecha de Planificación:</b>	30/05/2013

**Detalle de las Actividades**

**Componente:** Desarrollo de técnicas de biología molecular para la detección de los siguientes viroides: Hop Stun

**Actividad:** Estandarización de RT-PCR para viroides

**Descripción**

Se pondrá a punto la metodología para la detección de los viroides HSVd, CBLVd, CVd-III y CVd-IV.

**Duración**

**Fecha Inicio:** 01/05/2014

**Fecha Fin:** 01/06/2014

**Equipo Técnico Participante**

Rol	Nombre
Responsable	Humberto Rodney Colina Muñoz
Participante	María José Benitez Galeano
Participante	Luciana Burutaran

**Instituciones Participantes**

Universidad de la República (UdelAR)/ Facultad de Ciencias

**Resultados Esperados (Producto / Proceso Tecnológico)**

<b>Descripción:</b>	El producto entregable de la actividad será un informe detallado que demuestre la optimización de dichas metodologías
<b>Tipo:</b>	3-Desarrollo de tecnologías, productos y procesos
<b>Categoría:</b>	3.9-Metodología Científica
<b>Indicador:</b>	3.9.1-Protocolos desarrollados
<b>Fecha de Planificación:</b>	30/05/2013

**Detalle de las Actividades**

**Componente:** Obtención de resultados y conclusiones con soporte estadístico a fin de que puedan ser utilizados p

**Actividad:** Informe de resultados

**Descripción**

Se escribirán informes con los resultados obtenidos para presentar al sector productivo, así como también al MGAP, INIA o la entidad que lo solicite.

**Duración**

**Fecha Inicio:** 15/12/2016

**Fecha Fin:** 31/03/2017

**Equipo Técnico Participante**

Rol	Nombre
Responsable	Humberto Rodney Colina Muñoz
Participante	María José Benitez Galeano
Participante	Federico Dalmao Artigas

**Instituciones Participantes**

Universidad de la República (UdelAR)/ Facultad de Ciencias

INIA Dirección Nacional  
 INIA La Estanzuela  
 INIA Las Brujas  
 INIA Salto Grande  
 INIA Tacuarembó  
 INIA Treinta y Tres

Andes 1365 P. 12, Montevideo  
 Ruta 50 Km. 11, Colonia  
 Ruta 48 Km. 10, Canelones  
 Camino a l Terrible, Salto  
 Ruta 5 Km. 386, Tacuarembó  
 Ruta 8 Km. 281, Treinta y Tres

Tel: 598 2902 0550  
 Tel: 598 4574 8000  
 Tel: 598 2367 7641  
 Tel: 598 4733 5156  
 Tel: 598 4632 2407  
 Tel: 598 4452 2023

Fax: 598 2902 3633  
 Fax: 598 4574 8012  
 Fax: 598 2367 7609  
 Fax: 598 4732 9624  
 Fax: 598 4632 3969  
 Fax: 598 4452 5701

[iniadn@dn.inia.org.uy](mailto:iniadn@dn.inia.org.uy)  
[iniate@le.inia.org.uy](mailto:iniate@le.inia.org.uy)  
[inia\\_lb@lb.inia.org.uy](mailto:inia_lb@lb.inia.org.uy)  
[inia\\_sg@sg.inia.org.uy](mailto:inia_sg@sg.inia.org.uy)  
[iniatbo@tb.inia.org.uy](mailto:iniatbo@tb.inia.org.uy)  
[iniatt@tyt.inia.org.uy](mailto:iniatt@tyt.inia.org.uy)

## FONDO DE PROMOCIÓN DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA (FPTA)

Resultados Esperados (Producto / Proceso Tecnológico)	
<b>Descripción:</b>	Se realizará un informe final con los resultados obtenidos durante todo el proyecto. Se entregará documentación detallando el grado de afectación detectada y caracterizada para Tristeza Virus, así como para los virus Psorosis y Satsuma Dwarf, de la misma manera para los viroides especialmente para Exocortis. Se entregará también el informe con el respectivo estudio discriminado para cada zona citrícola del país, con el respectivo estudio estadístico y con datos moleculares y filogenéticos robustos. El entregable también será presentado a la Cámara de Exportadores, productores, técnicos e INIA en forma oral y escrita a fin de discutir resultados y establecer futuras acciones.
<b>Tipo:</b>	3-Desarrollo de tecnologías, productos y procesos
<b>Categoría:</b>	3.14-Generación de conocimiento
<b>Indicador:</b>	3.14.3-Estudios sobre organismos perjudiciales en plantas y animales
<b>Fecha de Planificación:</b>	30/05/2013

### Detalle de las Actividades

**Componente:** Muestreo y estudio durante el período de dos años, de 1068 plantas procedentes de Rivera, Salto, P

**Actividad:** Muestreo a nivel país

#### Descripción

Obtención de muestras provenientes de los departamentos de Rivera, Salto, Paysandú, Rio Negro, Florida, Canelones, Maldonado, Colonia y Montevideo y de las especies de plantas descritas previamente en las proporciones detalladas.

#### Duración

**Fecha Inicio:** 01/04/2014

**Fecha Fin:** 31/03/2016

#### Equipo Técnico Participante

Rol	Nombre
Responsable	Humberto Rodney Colina Muñoz
Participante	María José Benitez Galeano
Participante	Luciana Burutaran
Participante	Mariana Espino

#### Instituciones Participantes

Cámara de Exportadores de Citrus del Uruguay

Universidad de la República (UdelaR)/ Facultad de Ciencias

#### Resultados Esperados (Producto / Proceso Tecnológico)

<b>Descripción:</b>	El entregable será un archivo con la colección de muestras establecidas en las distintas regiones citricolas del país.
<b>Tipo:</b>	3-Desarrollo de tecnologías, productos y procesos
<b>Categoría:</b>	3.14-Generación de conocimiento
<b>Indicador:</b>	3.14.4-Estudios sobre recursos naturales
<b>Fecha de Planificación:</b>	30/05/2013

### Detalle de las Actividades

**Componente:** Desarrollo de técnicas de biología molecular para la detección y caracterización de los siguientes

**Actividad:** Puesta a punto de RT-PCR para virus

#### Descripción

Estandarizar la metodología de RT-PCR para la detección de Citrus Psorosis Virus y Satsuma Dwarf Virus.

#### Duración

**Fecha Inicio:** 01/05/2014

**Fecha Fin:** 31/05/2014

#### Equipo Técnico Participante

Rol	Nombre
Responsable	Humberto Rodney Colina Muñoz
Participante	María José Benitez Galeano
Participante	Luciana Burutaran

#### Instituciones Participantes

Universidad de la República (UdelaR)/ Facultad de Ciencias

INIA Dirección Nacional  
INIA La Estanzuela  
INIA Las Brujas  
INIA Salto Grande  
INIA Tacuarembó  
INIA Treinta y Tres

Andes 1365 P. 12, Montevideo  
Ruta 50 Km. 11, Colonia  
Ruta 48 Km. 10, Canelones  
Camino a l Terrible, Salto  
Ruta 5 Km. 386, Tacuarembó  
Ruta 8 Km. 281, Treinta y Tres

Tel: 598 2902 0550  
Tel: 598 4574 8000  
Tel: 598 2367 7641  
Tel: 598 4733 5156  
Tel: 598 4632 2407  
Tel: 598 4452 2023

Fax: 598 2902 3633  
Fax: 598 4574 8012  
Fax: 598 2367 7609  
Fax: 598 4732 9624  
Fax: 598 4632 3969  
Fax: 598 4452 5701

[iniadn@dn.inia.org.uy](mailto:iniadn@dn.inia.org.uy)  
[iniale@le.inia.org.uy](mailto:iniale@le.inia.org.uy)  
[inia\\_lb@lb.inia.org.uy](mailto:inia_lb@lb.inia.org.uy)  
[inia\\_sg@sg.inia.org.uy](mailto:inia_sg@sg.inia.org.uy)  
[iniatbo@b.inia.org.uy](mailto:iniatbo@b.inia.org.uy)  
[iniatt@tyt.inia.org.uy](mailto:iniatt@tyt.inia.org.uy)

**FONDO DE PROMOCIÓN DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA (FPTA)**

18/1

<b>Resultados Esperados (Producto / Proceso Tecnológico)</b>	
<b>Descripción:</b>	El producto entregable de la actividad será un informe detallado que demuestre la optimización de dichas metodologías.
<b>Tipo:</b>	3-Desarrollo de tecnologías, productos y procesos
<b>Categoría:</b>	3.9-Metodología Científica
<b>Indicador:</b>	3.9.1-Protocolos desarrollados
<b>Fecha de Planificación:</b>	30/05/2013

**Detalle de las Actividades**

**Componente:** Estudio de la severidad de las cepas virales para CTV en las distintas muestras obtenidas, mediante

**Actividad:** Purificación y Secuenciación

**Descripción**

Se purificarán los productos de PCR obtenidos y se enviarán a secuenciar al Instituto Pasteur de Montevideo.

**Duración**

**Fecha Inicio:** 01/07/2014

**Fecha Fin:** 31/10/2016

**Equipo Técnico Participante**

Rol	Nombre
Responsable	Humberto Rodney Colina Muñoz
Participante	María José Benitez Galeano
Participante	Luciana Burutaran

**Instituciones Participantes**

Universidad de la República (UdeAR)/ Facultad de Ciencias

**Resultados Esperados (Producto / Proceso Tecnológico)**

<b>Descripción:</b>	El entregable será un archivo con todas la secuencias obtenidas para los tres genes propuestos para CTV, de las muestras positivas en cada región citrícola.
<b>Tipo:</b>	3-Desarrollo de tecnologías, productos y procesos
<b>Categoría:</b>	3.12-Productos Biotecnológicos
<b>Indicador:</b>	3.12.3-Marcadores moleculares para identificación genética
<b>Fecha de Planificación:</b>	30/05/2013

INIA Dirección Nacional  
 INIA La Estanzuela  
 INIA Las Brujas  
 INIA Salto Grande  
 INIA Tacuarembó  
 INIA Treinta y Tres

Andes 1365 P. 12, Montevideo  
 Ruta 50 Km. 11, Colonia  
 Ruta 48 Km. 10, Canelones  
 Camino a l Terrible, Salto  
 Ruta 5 Km. 386, Tacuarembó  
 Ruta 8 Km. 281, Treinta y Tres

Tel: 598 2902 0550  
 Tel: 598 4574 8000  
 Tel: 598 2367 7641  
 Tel: 598 4733 5156  
 Tel: 598 4632 2407  
 Tel: 598 4452 2023

Fax: 598 2902 3633  
 Fax: 598 4574 8012  
 Fax: 598 2367 7609  
 Fax: 598 4732 9624  
 Fax: 598 4632 3969  
 Fax: 598 4452 5701

[iniadn@dn.inia.org.uy](mailto:iniadn@dn.inia.org.uy)  
[iniiale@le.inia.org.uy](mailto:iniiale@le.inia.org.uy)  
[inia\\_lb@lb.inia.org.uy](mailto:inia_lb@lb.inia.org.uy)  
[inia\\_sq@sq.inia.org.uy](mailto:inia_sq@sq.inia.org.uy)  
[iniatbo@tb.inia.org.uy](mailto:iniatbo@tb.inia.org.uy)  
[iniatt@tyt.inia.org.uy](mailto:iniatt@tyt.inia.org.uy)

## FONDO DE PROMOCIÓN DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA (FPTA)

### Presupuesto

#### Fuente de Financiamiento: FPTA

Rubro	Concepto	Cantidad	Unidad	Costo/unidad	Monto Año 1	Monto Año 2	Monto Año 3	Monto Año 4
Equipos de Laboratorio	Freezer - 20°C	1,00		10.000,00	10.000,00	0,00	0,00	0,00
Mensuales	1 técnico Grado 1 40 horas semanales: para realizar los estudios de las muestras	1,00	unidad	54.342,00	16.421,00	18.052,00	19.869,00	0,00
Mensuales	1 técnico Grado 1 30 horas semanales: para realizar los estudios de las muestras	1,00	unidad	21.552,00	10.263,00	11.289,00	0,00	0,00
Insumos y suministros	Reactivos de laboratorio: enzimas 20 Taq polimerasa, 20 Transcriptasa reversa, 12 oligos, 4 sondas, 10 sistemas de extracción ac. nucleicos,	30,00	Lts	700,00	7.000,00	7.000,00	7.000,00	0,00
Giras y reuniones al exterior	Viaje a IVIA España	1,00		3.500,00	0,00	3.500,00	0,00	0,00
Servicios de laboratorio	Cupones para secuenciación de ácidos nucleicos	8,00	Lts	700,00	2.000,00	2.500,00	1.100,00	0,00
Consultores	Asesoramiento continuo al proyecto: estadística	1,00	Lts	1.000,00	0,00	0,00	1.000,00	0,00
Otros Egresos	Gastos administrativos	1,00	unidad	10.000,00	3.000,00	3.000,00	4.000,00	0,00
Serie técnica FPTA	Difusión FPTA	1,00	unidad	2.000,00	0,00	0,00	2.000,00	0,00
Mensuales	10 horas semanales por tiempo destinado a la ejecución y concreción del proyecto, redacción de informes, análisis de datos, publicaciones, jornadas, etc.	1,00	unidad	6.000,00	2.000,00	2.000,00	2.000,00	0,00
Gastos por viajes locales	Logística de muestreo	500,00	Lts	2,00	400,00	400,00	200,00	0,00

#### Fuente de Financiamiento: Udelar/Regional Norte

Rubro	Concepto	Cantidad	Unidad	Costo/unidad	Monto Año 1	Monto Año 2	Monto Año 3	Monto Año 4

**INIA Dirección Nacional**  
**INIA La Estanzuela**  
**INIA Las Brujas**  
**INIA Salto Grande**  
**INIA Tacuarembó**  
**INIA Treinta y Tres**

**Andes 1365 P. 12, Montevideo**  
**Ruta 50 Km. 11, Colonia**  
**Ruta 48 Km. 10, Canelones**  
**Camino a l Terrible, Salto**  
**Ruta 5 Km. 386, Tacuarembó**  
**Ruta 8 Km. 281, Treinta y Tres**

**Tel: 598 2902 0550**  
**Tel: 598 4574 8000**  
**Tel: 598 2367 7641**  
**Tel: 598 4733 5156**  
**Tel: 598 4632 2407**  
**Tel: 598 4452 2023**

**Fax: 598 2902 3633**  
**Fax: 598 4574 8012**  
**Fax: 598 2367 7609**  
**Fax: 598 4732 9624**  
**Fax: 598 4632 3969**  
**Fax: 598 4452 5701**

[iniadn@dn.inia.org.uy](mailto:iniadn@dn.inia.org.uy)  
[iniate@te.inia.org.uy](mailto:iniate@te.inia.org.uy)  
[inialb@lb.inia.org.uy](mailto:inialb@lb.inia.org.uy)  
[iniasg@sg.inia.org.uy](mailto:iniasg@sg.inia.org.uy)  
[iniatbo@tb.inia.org.uy](mailto:iniatbo@tb.inia.org.uy)  
[iniatt@tyt.inia.org.uy](mailto:iniatt@tyt.inia.org.uy)

**FONDO DE PROMOCIÓN DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA (FPTA)**

**Referencias Bibliográficas**

<b>Autor principal</b>	<b>Cita</b>
Agranovsky AA	Agranovsky AA. (1996). Principles of molecular organization, expression and evolution of closterovirus: over the barriers. <i>Adv Virus Res</i> 17:119-158.
Aubert B	Aubert B, Etienne J, Cottin R, Leclant F, Cao Van P, Vuillaume C, Jaramillo C, & Garbeau G. (1992). Citrus tristeza disease, a new threat for the Caribbean basin. Report of a survey to Colombia, Dominican Republic, Guadeloupe, Martinique and Trinidad. <i>Fruits</i> 47: 393-404.
Ayllon MA	Ayllon MA, Rubio L, Sentandreu V, Moya A, Guerri, J& Moreno P. (2006). Variations in two gene sequences of Citrus tristeza virus after host passage. <i>Virus Genes</i> 32:119-128.
Bar-Joseph M	Bar-Joseph M, Garnsey SM, Gonsalves D, Moscovitz M, Purcifull DE, Clark MF & Loebenstein G. (1979). The use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of citrus tristeza virus. <i>Phytopathology</i> 69:190-194.
Bar-Joseph M	Bar-Joseph M, Marcus R & Lee RF. (1989b). The continuous challenge of citrus tristeza virus control. <i>Annu Rev Phytopathol</i> 27:291-316.
Barthe GA	Barthe GA, Ceccardi TL, Keremane L, Manjunath L & Derrick KS. (1998). Citrus psorosis virus: nucleotide sequencing of the coat protein gene and detection by hybridization and RT-PCR. <i>J Gen Virol</i> 79: 1531-1537.
Bernad L & Durán-Vila N	Bernad L & Durán-Vila N. (2006). A novel RT-PCR approach for detection and characterization of citrus viroids. <i>Molecular and Cellular Probes</i> 20: 105-113.
Bertalmío A	Bertalmío A, Maeso D, Sanguinetti G, Fontán G, De los Santos M, Borde J, Montes F, Colina R & Rivas F. (2012). Saneamiento y Certificación de Cítricos. <i>Revista INIA</i> . (31): 49-53.
Biswas KK	Biswas KK, Tarafdar A & Sharma SK. (2012). Complete genome sequence of mandarine decline Citrus tristeza virus of the northeastern Himalaya hill region if India: comparative analyses determine recombinant. <i>Arch. Virol.</i> 157: 579-583.
Fawcett HS	Fawcett HS. (1933). New symptoms of psorosis indicating a virus disease of citrus. <i>Phytopathol.</i> , 23: 930.
Febres VJ	Febres VJ, Ashoulin L, Mawassi M, Frank A, Bar-Joseph M, Manjunath KL, Lee R F & Niblett CL. (1996). The p27 protein is present at one end of citrus tristeza virus particles. <i>Phytopathology</i> 86:1331-1335.
Flores R	Flores R, Hernandez C, Martinez de Alba A, Darós J & Di Serio F. (2005a). Viroids and viroid-host interactions. <i>Annual Review of Phytopathology</i> 43:117-139.
Flores R	Flores R, Randles J, Owens R, Bar-Joseph M & Diener T. (2005b). Viroidae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U & Ball AL (Eds.) <i>Virus Taxonomy, Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses</i> . London. Elsevier Academic Press. pp. 1145-1159.
Folimonova SY	Folimonova SY, Robertson CJ, Shilts T, Folimonov AS, Hilf ME, Garnsey SM, et al. (2010). Infection with strains of Citrus Tristeza Virus not exclude superinfection by other strains of the virus. <i>J. Virol.</i> 84, 1314-1325.
Folimonova SY	Folimonova SY. (2013). Developing an understanding of cross-protection by Citrus Tristeza Virus. <i>Front. Microb.</i> 4(76): 1-9.
García ML	García ML, Grau O & Sarachu AN. (1991). Citrus psorosis is probably caused by a Bipartite ssRNA virus. <i>Res Virol</i> 142: 303-311
García ML	García ML, Dal Bo E, Grau O & Milne R. (1994). The closely related citrus ringspot and citrus psorosis viruses have particles of novel filamentous morphology. <i>J Gen Virol</i> 75: 3585-3590.
Ghazal SA	Ghazal SA, El-Douqdouq KhA, Mousa AA, Fahmy H & Sofy AR. Isolation and identification of citrus psorosis virus Egyptian isolate (CPsV-EG). <i>Commun Agric Appl Biol Sci.</i> 73(2): 285-95.
Grant TJ & Costa AS	Grant TJ & Costa AS. (1951). A mild strain of the tristeza virus of citrus. <i>Phytopathology</i> 41:114-122.
Iglesias NG	Iglesias NG, Gago-Zachert SP, Robledo G, Costa N, Plata MI, Vera O, Grau O & Semorile LC. (2008). Population structure of Citrus tristeza virus from field Argentinean isolates. <i>Virus Genes</i> 36:199-207.
Lopez C	Lopez C, Ayllon MA, Navas-Castillo J, Guerri J, Moreno P, Flores R. (1998). Sequence polymorphism in the 5' and 3' terminal regions of citrus tristeza virus RNA. <i>Phytopathology</i> 88:685-691.
Martelli GP	Martelli GP & D'Onghia MA (eds). (1998). <i>Proceedings of the Mediterranean Network on Certification of Citrus 1995-1997</i> .
Martin S	Martín S, Alioto D, Milne RG, Garnsey SM, García ML, Grau O, Guerri J & Moreno P. (2004). Detection of Citrus psorosis virus by ELISA, molecular hybridization, RT-PCR and immunosorbent electron microscopy and its association with citrus psorosis disease. <i>Eur J Plant Pathol.</i>
Matos LA	Matos LA, Hilf ME, Cayetano XA, Feliz AO, Harper SJ & Folimonova SY. (2013). Dramatic change in Citrus Tristeza Virus populations in the Dominican Republic. <i>Plant. Dis.</i> 97:339-345.
MGAP	MGAP (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca) (1981). <i>Enfermedades en plantas hongos superiores y saprofitas en Uruguay</i> . Montevideo: MGAP. Informe técnico No9.140p.
MGAP	MGAP (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca)- DIEA. (2011). <i>Encuesta Citricola Primavera 2010</i> . Enc. N° 299.
MGAP	Comisión Honoraria Nacional del Plan Citricola. (1996). <i>Censo Nacional Citricola</i> . Montevideo: MGAP. 100p.
Milne RG	Milne RG, García ML & Grau O. (2000). Genus Ophiovirus. Type species Citrus psorosis virus (CPsV). In: van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB (eds) <i>Virus Taxonomy, 7th Report International Committee on Taxonomy on Viruses</i> . Academic Press, San Diego CA USA, pp 627-631.
Moreno P	Moreno P, Ambros S, Albiach-Marti MR, Guerri J, Pena L. (2008). Plant diseases that changed the world - Citrus tristeza virus: a pathogen that changed the course of the citrus industry. <i>Mol Plant Pathol</i> 9:251-268.

INIA Dirección Nacional  
INIA La Estanzuela  
INIA Las Brujas  
INIA Salto Grande  
INIA Tacuarembó  
INIA Treinta y Tres

Andes 1365 P. 12, Montevideo  
Ruta 50 Km. 11, Colonia  
Ruta 48 Km. 10, Canelones  
Camino a l Terrible, Salto  
Ruta 5 Km. 386, Tacuarembó  
Ruta 8 Km. 281, Treinta y Tres

Tel: 598 2902 0550  
Tel: 598 4574 8000  
Tel: 598 2367 7641  
Tel: 598 4733 5156  
Tel: 598 4632 2407  
Tel: 598 4452 2023

Fax: 598 2902 3633  
Fax: 598 4574 8012  
Fax: 598 2367 7609  
Fax: 598 4732 9624  
Fax: 598 4632 3969  
Fax: 598 4452 5701

[iniadn@dn.inia.org.uy](mailto:iniadn@dn.inia.org.uy)  
[iniale@e.inia.org.uy](mailto:iniale@e.inia.org.uy)  
[inia\\_lb@lb.inia.org.uy](mailto:inia_lb@lb.inia.org.uy)  
[inia\\_sg@sg.inia.org.uy](mailto:inia_sg@sg.inia.org.uy)  
[iniatbo@b.inia.org.uy](mailto:iniatbo@b.inia.org.uy)  
[iniatt@tyt.inia.org.uy](mailto:iniatt@tyt.inia.org.uy)

## FONDO DE PROMOCIÓN DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA (FPTA)

Naum-Onganía G	Naum-Onganía G, Gago-Zachert S, Peña E, Grau O & García ML. (2003). Citrus Psorosis virus RNA1 is of negative polarity and potentially encodes in its complementary strand a 24K protein of unknown function and 280K putative RNA dependent RNA polymerase. <i>Virus Res</i> 96: 49-61.
Navarro L	Navarro L. (1993). Citrus sanitation, quarantine and certification programs. En: Proceedings of the 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (Moreno P, da Graça JV, Timmer LW, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 383-391.
Navas-Castillo J & Moreno P	Navas-Castillo J & Moreno P. (1995). Filamentous flexuous particles and serologically related proteins of variable size associated with citrus psorosis and ringspot diseases. <i>Eur J Plant Pathol</i> 101: 343-384.
Pagliano G	Pagliano G, Orlando L & Gravina A. (1998). Detección y caracterización del complejo de viroides de los cítricos en Uruguay. <i>Agrociencia</i> . 1(2): 74-83.
Pagliano G	Pagliano G, Peyrou M, Del Campo R, Orlando L, Gravina A, Wettstein R & Francis M. (2000). Detection and characterization of citrus viroids in Uruguay. In: Yokomi RK, da Graça JV & Lee RF (eds.). Proc. 14th Conf. Int. Org. Citrus Virol. Riverside, California. pp: 282-288.
Reanwarakorn K & Semancik JS	Reanwarakorn K & Semancik JS. (1998). Regulation of pathogenicity in hop stunt viroid related group II citrus viroids. <i>J Gen Virol</i> 79:3163-71
Rocha-Peña M	Rocha-Peña M, Ochoa-Corona FM, Matinez Soriano JP, Roistacher CN & Lee RF. (1998). Citrus Tristeza Virus: Events that occur before, during and after the disease epidemics. <i>Subtropical Plant Science</i> , 50: 26-36.
Rocha-Peña MA	Rocha-Peña MA, Lee RF, Lastra R, Niblett CL, Ochoa-Corona FM, Garnsey SM & Yokomi RK. (1995). Citrus tristeza virus and its aphid vector <i>Toxoptera citricida</i> : Threats to citrus production in the Caribbean and Central and North America. <i>Plant. Dis.</i> 79: 437-443.
Roistacher CN	Roistacher CN. (1993). Psorosis: A Review. En: 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Riverside, CA, USA: IOCV pp. 139-154.
Roistacher CN	Roistacher CN, da Graça JV & Müller GW. (2010). Cross Protection Against Citrus Tristeza Virus- a Review. En: Proceedings of the 17th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (Briansky RH, Lee RF, Timmer LW, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV pp. 1-27.
Roistacher CN & Moreno P	Roistacher CN & Moreno P. (1991). The worldwide threat from destructive isolates of Citrus tristeza virus. En: Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (Briansky RH, Lee RF, Timmer LW, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV pp. 7-19.
Roy A	Roy A, Fayad A, Barthe G & Briansky RH. (2005). A multiplex polymerase chain reaction method for reliable, sensitive and simultaneous detection of multiple viruses in citrus trees. <i>J Virol Met</i> 129: 47-55.
Rubio L	Rubio L, Ayllon MA, Kong P, Fernandez A, Polek ML, Guerri J, Moreno P & Falk BW. (2001). Genetic variation of Citrus tristeza virus isolates from California and Spain: evidence for mixed infections and recombination. <i>J Virol</i> 75: 8054-8062.
Sánchez de la Torre E	Sánchez de la Torre E, Riva O, Zandomeni R, Grau O & García ML. (1998). The top component of citrus ringspot virus contains two ssRNAs, the smaller encodes the coat protein. <i>Mol Plant Pathol On-line</i> <a href="http://194.247.68.33/mppl/1998/1019sanchez/">http://194.247.68.33/mppl/1998/1019sanchez/</a>
Sánchez de la Torre E	Sánchez de la Torre E, López C, Grau O & García ML. (2002). RNA2 of Citrus psorosis virus is of negative polarity and has a single open reading frame in its Complementary strand. <i>J Gen Virol</i> 83: 1777-1781
Semancik JS	Semancik JS, Roistacher CN, Rivera-Bustamante R & Duran-Vila N. (1988). Citrus cachexia viroid, a new viroid of citrus: relationship to viroids of the exocortis disease complex. <i>J Gen Virol</i> 69:3059-68.
Semancik JS & Weathers LG	Semancik JS & Weathers LG. (1972). Exocortis virus: an infectious free-nucleic acid plant virus with unusual properties. <i>Virology</i> 46:456-66.
Yokomi RK & Damsteegt VD	Yokomi RK & Damsteegt VD. (1991). Comparison of Citrus Tristeza Virus transmission efficiency between <i>Toxoptera citricida</i> and <i>Aphis gossypii</i> . In: Proceedings, Aphid-Plant Interactions: Populations to Molecules, DC Peters, JA Webster & CS Chouber (eds.), p 316. OSU, Stillwater, OK.
Zanek Mc	Zanek MC, Reyes CA, Cervera M, Peña EJ, Velázquez K, Costa N, Plata MI, Grau O, Peña L & García ML. (2008). Genetic transformation of sweet orange with the coat protein gene of Citrus psorosis virus and evaluation of resistance against the virus. <i>Plant Cell Rep.</i> 27(1): 57-66.

INIA Dirección Nacional  
INIA La Estanzuela  
INIA Las Brujas  
INIA Salto Grande  
INIA Tacuarembó  
INIA Treinta y Tres

Andes 1365 P. 12, Montevideo  
Ruta 50 Km. 11, Colonia  
Ruta 48 Km. 10, Canelones  
Camino a l Terrible, Salto  
Ruta 5 Km. 386, Tacuarembó  
Ruta 8 Km. 281, Treinta y Tres

Tel: 598 2902 0550  
Tel: 598 4574 8000  
Tel: 598 2367 7641  
Tel: 598 4733 5156  
Tel: 598 4632 2407  
Tel: 598 4452 2023

Fax: 598 2902 3633  
Fax: 598 4574 8012  
Fax: 598 2367 7609  
Fax: 598 4732 9624  
Fax: 598 4632 3969  
Fax: 598 4452 5701

[iniadn@dn.inia.org.uy](mailto:iniadn@dn.inia.org.uy)  
[iniale@le.inia.org.uy](mailto:iniale@le.inia.org.uy)  
[inia\\_lb@lb.inia.org.uy](mailto:inia_lb@lb.inia.org.uy)  
[inia\\_sg@sg.inia.org.uy](mailto:inia_sg@sg.inia.org.uy)  
[iniatbo@tb.inia.org.uy](mailto:iniatbo@tb.inia.org.uy)  
[iniatt@tyt.inia.org.uy](mailto:iniatt@tyt.inia.org.uy)

20/01/2011

## ANEXO 2.

### TÉRMINOS DE REFERENCIA DEL LIDER DEL PROYECTO

El Líder del Proyecto deberá cumplir con los siguientes términos, mientras dure el plazo de este Convenio.

- a) **Responsabilizarse** por la ejecución técnica de la investigación de acuerdo a lo descrito en el Documento Proyecto presentado al Llamado.
- b) **Controlar** el cumplimiento en tiempo y forma de la propuesta técnica del Proyecto. Para ello utilizará como guía el documento del proyecto presentado a INIA y el Cronograma de Actividades que este Convenio incorpora.
- c) **Realizar** informes de avance semestrales, un informe Final y un resumen ejecutivo de los resultados del Proyecto, de acuerdo a las cláusulas de este Convenio. Estos informes deben ser enviados o entregados a la Unidad Coordinadora de Ejecución de INIA.
- e) **Aportar** toda la información que le sea requerida por INIA para un correcto seguimiento y posterior evaluación del Proyecto.