



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**RESPUESTA FISIOLÓGICA DE NOVILLOS CONSUMIENDO**  
***Festuca arundinacea* INFECTADA CON EL HONGO ENDÓFITO**  
**AR584 Y SU EFECTO EN EL CONTROL DE LA MOSCA DE LOS**  
**CUERNOS**

**Maria Gimena Brito Garro**

**TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL**

**URUGUAY**

**2017**





**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**RESPUESTA FISIOLÓGICA DE NOVILLOS CONSUMIENDO**  
***Festuca arundinacea* INFECTADA CON EL HONGO ENDÓFITO**  
**AR584 Y SU EFECTO EN EL CONTROL DE LA MOSCA DE LOS**  
**CUERNOS.**

**Maria Gimena Brito Garro**

---

Ana Meikle

**Directora de Tesis**

---

Martin Breijo

**Co-director**

---

Walter Ayala

**Co-director**

**2017**

**INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL  
DE DEFENSA DE TESIS**

M<sup>a</sup> de Lourdes Adrien; DMV, MSc, PhD  
Patología y Clínica de Rumiantes y Suinos  
Facultad de Veterinaria  
Universidad de la República-Uruguay

Fernando Dutra; DMV, MSc  
DILAVE Miguel C. Rubino  
MGAP-Uruguay

José Manuel Venzal; DMV, PhD  
Laboratorio de Vectores y Enfermedades Transmitidas  
Universidad de la República-Uruguay



## ACTA DE EXAMEN

**CURSO:** Defensa de Tesis de Maestría

**LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA:** Montevideo, 30 de marzo de 2017

**TRIBUNAL:** Dres. Lourdes Adrién (Presidente), Fernando Dutra, José M. Venzal

CI ESTUDIANTE	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
4.300.742-3	BRITO GARRO, María Gimena	B.B.B	6

PRESENTADOS	NO PRESENTADOS	APROBADOS	APLAZADOS	INSCRIPTOS
1	0	1	0	1

### TRIBUNAL

Dra. Lourdes Adrién (Presidente)

Dr. Fernando Dutra

Dr. José M. Venzal

### FIRMA

**NOTA:** La calificación mínima para aprobar el examen es B.B.B (6)



**FACULTAD DE VETERINARIA  
Programa de Posgrados**

**ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS  
DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL**

“Respuesta fisiológica de novillos consumiendo *Festuca arundinacea* infectada con el hongo endófito AR584 y su efecto en el control de la mosca de los cuernos”

**Por: Dra. Maria Gimena Brito Garro**

**Directora de Tesis: Dra. Ana Meikle**

**Codirectores de Tesis: Dr. Martín Breijo  
Dr. Walter Ayala**

**Tribunal**

**Presidente: Dra. Lourdes Adrién**

**Segundo Miembro: Dr. Fernando Dutra**

**Tercer Miembro: Dr. José M. Venzal**

**Fallo del Tribunal: APROBADA**

**Salón de Posgrados  
Jueves 30 de marzo de 2017**



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA  
Posgrados Académicos y Especializaciones

El tribunal considera que la maestranda Dra. María Gimena Brito Garro ha realizado un trabajo de tesis adecuado para la obtención del título, con una buena revisión bibliográfica para sustentar la justificación e hipótesis del trabajo, además de los objetivos planteados.

Los resultados del trabajo son muy interesantes y relevantes para los sistemas de producción ganadera y salud animal de Uruguay.

La redacción de la tesis es correcta con mínimas observaciones editoriales y la presentación oral fue clara y cumplió con lo esperado.

Respecto a la presentación oral, la Dra. mostró una solidez, consistencia y conocimiento de su trabajo a la hora de presentar sus resultados. La defensa de la tesis fue muy buena, remarcando una vez más que la estudiante conocía muy bien de su trabajo y que tenía las bases teóricas para responder a las preguntas del tribunal.

Si bien para la aprobación de tesis no es requisito la presentación de una comunicación corta o un trabajo arbitrado, este tribunal considera que hubiese sido valioso para su formación y para la difusión de los resultados.

Por todo lo anterior, el Tribunal por unanimidad califica el trabajo de Tesis de la Dra. María Gimena Brito Garro "Respuesta fisiológica de novillos consumiendo *Festuca arundinacea* infectada con el hongo endófito AR584 y su efecto en el control de la mosca de los cuernos", como APROBADA.

  
Dra. Lourdes Adrien  
Presidente del Tribunal  
30 de marzo de 2017

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por financiar esta tesis con una beca de maestría (POS\_NAC\_2014\_1\_102470) y al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) que solventó todos los gastos del trabajo realizado, además de poner a disposición personal para llevar adelante este ensayo.

Agradezco a los miembros del Tribunal por la gentileza y buena disposición de leer esta tesis.

Gracias a mi tutora Ana, por el apoyo incondicional y dedicación, por su generosidad, por brindarme todas las oportunidades que han estado a su alcance y por permitirme crecer académica y personalmente.

Gracias a mi co-tutor Martin, por su paciencia y buena voluntad, porque supo darme ánimos y empujones cuando quise derrapar; porque al final del camino terminé siendo mi amigo.

Gracias a mi otro co-tutor, Walter, que me apoyo cuando tuve que tomar decisiones difíciles; él fue muy importante para lograr realizar mi maestría.

Agradezco a todos los que colaboraron directamente e indirectamente con este trabajo.

Gracias a Fernando, que me ayudo a pensar y a resolver las cosas de manera más sencilla. Por tomarse el tiempo de leer y darme su opinión y perspectiva del tema.

Gracias al personal de apoyo del programa de pasturas de INIA Treinta y Tres: Caco, John, Darío, Andrés y Fernando, sin ellos este trabajo no se hubiera hecho. Gracias por ayudarme, sugerirme, reemplazarme y hacer que todo sea más fácil.

Gracias a las chicas del Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal: Pau, Gretel, Vicky, Andy, Isa y Claudia, por ayudarme con las corridas de las muestras de suero y orina, sacarme dudas, escucharme en cada ensayo de las presentaciones, además de los almuerzos compartidos.

Gracias al equipo de Martin: Mariela, Marcelo, Sergio y Ximena, que me hicieron sentir parte del equipo de la Unidad de Reactivos de Biomodelos de Experimentación y darme una gran mano con el trabajo de la mosca de los cuernos y los ELISA de ergo-alcaloides en orina.

Gracias a todos los funcionarios de INIA Treinta y Tres que siempre estuvieron dispuestos a colaborar en lo que necesite.

Agradezco a todos los que me hicieron apoyo moral.

Gracias a Amparillo, Sarita, Joaquín y Gerónimo, grandes compañeros de trabajo, que fueron mis primeros amigos en Treinta y Tres, que me hicieron sentir como en casa.

Gracias a Olguita, Elo y Vero por hacerme reír en los pasillos de INIA, ser mis cómplices y darme el honor de ser su “asesora”. A Belky por sus rápidas y eficientes búsquedas bibliográficas.

Gracias a Maca y a su familia, que me abrieron las puertas de su casa y por hacer que mi estadía en Treinta y Tres fuera más llevadera.

Gracias a Feli, por escucharme cuando necesite hacer catarsis.

## INDICE DE CONTENIDOS

1. RESUMEN .....	viii
2. SUMMARY.....	ix
3. INTRODUCCIÓN .....	1
4. ANTECEDENTES.....	3
4.1 Relación <i>Festuca arundinacea var schreb</i> y el hongo endófito <i>Epichl�e coenophiala</i> .....	4
4.2 Efectos de los alcaloides producidos por <i>Epichl�e coenophiala</i> en los bovinos .....	7
4.2.1 Absorción y biodisponibilidad en el rumiante.....	9
4.2.2 Etiopatogenia de la intoxicación .....	11
4.2.3 Presentaciones clínicas en bovinos.....	12
4.2.3.1 Síndrome del otoño-invierno, pie de festuca o gangrena seca.....	13
4.2.3.2 Síndrome de necrosis grasa del bovino.....	13
4.2.3.3 Síndrome de primavera-verano, hipertérmico o festucosis.....	14
4.3 Festucosis en Uruguay y la región.....	15
4.4 Desarrollo de una nueva tecnología: “Endófitos Amigables” .....	16
4.5 Efecto de los alcaloides en el control biológico de la mosca de los cuernos.....	19
5. CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA.....	21
6. HIPOTESIS.....	23
7. OBJETIVOS	
7.1 Objetivo general.....	23
7.2 Objetivos específicos.....	23
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
8.1 Diseño experimental	
8.1.1 Pasturas.....	25
8.1.2 Animales.....	25

8.1.3 Mosca de los cuernos .....	27
8.2 Determinación del forraje disponible, remanente y su composición química .....	28
8.3 Evaluación de parámetros fisiológicos y ganancia de peso vivo de los novillos consumiendo las diferentes variedades de festuca .....	28
8.4 Evaluación de las cargas adultas de la mosca de los cuernos y efectos en el desarrollo larvario de la mosca de los cuernos en heces de novillos alimentados con festuca .....	29
8.5 Análisis estadístico .....	29
<b>9. RESULTADOS</b>	
9.1 Pasturas	
9.1.1 Presencia y porcentaje de infección del endófito .....	31
9.1.2 Presencia y concentración de alcaloides en planta .....	31
9.1.3 Forraje disponible, remanente y composición química .....	33
9.2 Animales	
9.2.1 Concentración de ergo-alcaloides en orina.....	33
9.2.2 Concentraciones de Prolactina Sérica.....	34
9.2.3 Bioquímica sérica .....	35
9.2.3.1 Colesterol.....	36
9.2.3.2 Urea y Creatinina.....	37
9.2.3.3 Enzimas hepáticas.....	38
9.2.4 Temperatura corporal	
9.2.4.1 Temperatura rectal .....	39
9.2.4.2 Temperatura Subcutánea .....	40
9.2.5 Frecuencia respiratoria .....	41
9.2.6 Evolución de peso vivo .....	42
9.3 Mosca de los cuernos	
9.3.1 Carga de moscas de los cuernos adultas .....	44
9.3.2 Número de pupas obtenidas en la materia fecal de los novillos de	

K31, Fo+ y Fo- .....	44
10. DISCUSIÓN .....	46
11. CONCLUSIONES .....	54
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

## LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida del endófito .....	5
Figura 2. Prueba de anticuerpos monoclonales para el endófito <i>E. coenophiala</i> en secciones transversales de macollos de festuca .....	7
Figura 3. Esquema general de la biosíntesis de ergo-alcaloides de la simbiosis festuca- <i>Epichl�e coenophiala</i> .....	8
Figura 4. Modelo propuesto para explicar el metabolismo, absorción y excreción de los ergo-alcaloides .....	10
Figura 5. Semejanzas estructurales entre ergo-alcaloides y neurotransmisores .....	11
Figura 6. Precipitaciones e histórico de precipitaciones (A), Temperatura Ambiente y Humedad Relativa del periodo de estudio (B).....	24
Figura 7. Plano del ensayo instalado .....	25
Figura 8. Esquema del diseño experimental en los animales .....	27
Cuadro I. Porcentaje de infección del endófito en festuca con endófito salvaje toxico (K31), con endófito AR584 (Fo+) y sin endófito (Fo-) en verano y otoño .....	31
Figura 9. Concentración de alcaloides en planta en muestras de K31 (festuca cv Kentucky 31 con endófito salvaje toxico) y Fo+ (festuca cv Fortuna con endófito AR584). A: Peramina; B: Lolina Total y C: Ergovalina .....	32
Cuadro II. Forraje disponible y remanente de festuca con endófito salvaje tóxico (K31), con endófito AR584 (Fo+) y sin endófito (Fo-) a lo largo del año de ensayo .....	33
Cuadro III. Composición química de festuca con endófito salvaje tóxico (K31), con endófito AR584 (Fo+) y sin endófito (Fo-) .....	33

Figura 10. Concentración urinaria de ergo-alcaloides a largo del período de estudio, de K31 (festuca cv Kentucky 31 endófito salvaje tóxico) Fo+ (festuca cv Fortuna con endófito AR584) y Fo- (festuca cv Fortuna sin endófito) .....	34
Figura 11. Concentración sérica de prolactina durante el año de ensayo de K31 (festuca cv Kentucky 31, endófito salvaje tóxico), Fo+ (festuca cv Fortuna con endófito AR584) y Fo- (festuca cv Fortuna sin endófito) .....	35
Cuadro IV. Concentración sérica de colesterol, metabolitos renales y enzimas hepáticas de novillos consumiendo festuca con endófitos .....	36
Figura 12. Concentración sérica de colesterol durante el año de ensayo de K31 (festuca cv Kentucky 31, endófito salvaje tóxico) Fo+ (festuca cv Fortuna con endófito AR584) y Fo- (festuca cv Fortuna sin endófito).....	37
Figura 13. Concentración de urea (mmol/L) (A) y de creatinina (ng/dL) (B) a largo del período de estudio de K31 (festuca cv Kentucky 31, endófito salvaje tóxico), Fo+ (festuca cv Fortuna con endófito AR584) y Fo- (festuca cv Fortuna sin endófito) .....	38
Figura 14. Concentración sérica de enzimas hepáticas de novillos consumiendo festuca con endófito salvaje tóxico (K31) con endófito AR584 (Fo+) y sin endófito (Fo-). A) FAS, B) GGT, C) ALT y D) AST .....	39
Figura 15. Temperatura rectal a largo del periodo de estudio de K31 (festuca cv Kentucky 31, endófito salvaje tóxico) Fo+ (festuca cv Fortuna con endófito AR584) y Fo- (festuca cv Fortuna sin endófito).....	40

Figura 16. Temperatura subcutánea de novillos consumiendo festuca con endófitos en verano, en función de las horas del día (K31: festuca cv Kentucky 31, endófito salvaje tóxico; Fo+: Festuca cv Fortuna, con endófito AR584, no productor de ergo-alcaloides; Fo-:Festuca cv sin endófito .....	40
Figura 17. A: Frecuencia respiratoria a largo del periodo de estudio de K31 (festuca cv Kentucky 31, endófito salvaje tóxico) Fo+ (festuca cv Fortuna con endófito AR584) y Fo- (festuca cv Fortuna sin endófito). B: Índice de Temperatura y Humedad (ITH) .....	41
Figura 18. Evolución del peso vivo a largo del ensayo en K31 (festuca cv Kentucky 31 endófito salvaje tóxico), Fo+ (festuca cv Fortuna con endófito AR584) y Fo- (festuca cv Fortuna sin endófito) .....	42
Figura 19. Imagen de los alrededores de los bebederos y las “lagunas” artificiales de las parcelas de K31 (festuca cv Kentucky 31, endófito salvaje tóxico).....	43
Figura 20. Evolución de la carga de moscas adultas por individuo, a largo del ensayo de K31 (festuca cv Kentucky 31, endófito salvaje tóxico), Fo+ (festuca cv Fortuna con endófito AR584) y Fo- (festuca cv Fortuna sin endófito .....	44
Figura 21. Número de pupas obtenidas del cultivo de materia fecal de novillos pastoreando K31 (festuca cv Kentucky 31, endófito salvaje tóxico), Fo+ (festuca cv Fortuna con endófito AR584) y Fo- (festuca cv Fortuna sin endófito).....	45

## 1. RESUMEN

El objetivo de este proyecto fue contribuir al conocimiento del efecto del endófito novel AR584 asociado a la festuca Fortuna, su impacto en la ganancia de peso vivo y parámetros fisiológicos de novillos y su asociación con el desarrollo de la mosca de los cuernos. Se utilizaron novillos Angus (n=21), entre 12-18 meses de edad que fueron bloqueados por edad y peso vivo y asignados a tres tratamientos de pastoreo: festuca Fortuna con endófito AR584 (Fo+, n=7), festuca Fortuna sin endófito (Fo-, n=7) y Kentucky 31 con endófito salvaje (K31, n=7) durante un año. En las pasturas se determinó el forraje disponible y remanente. La presencia del endófito en el forraje se evaluó a través del blotting test. En los animales se registró el peso vivo (PV), la frecuencia respiratoria (FR), la temperatura rectal (TR) y subcutánea (TSC), así como la concentración de enzimas hepáticas, urea, creatinina, colesterol, prolactina (PRL) en suero y ergo-alcaloides en orina. El efecto de los alcaloides sobre la carga de moscas de los cuernos adultas se monitoreó a través de registros fotográficos y el desarrollo larvario se evaluó a través de la determinación de sobrevivencia de éstos, en heces frescas de bovinos de los tres tratamientos. No se encontraron diferencias entre los tratamientos en el forraje disponible, ni en el forraje remanente. El porcentaje de infección del endófito fue de 97, 96 y 0 % para K31, Fo+ y Fo- respectivamente. Los novillos de Fo+ y Fo- presentaron similar ganancia de peso vivo, concentración de Fosfatasa Alcalina Sérica, colesterol y PRL, pero fueron mayores ( $P < 0,05$ ) que los observados en los novillos consumiendo K31. La TR, TSC, FR, la concentración de urea y ergo-alcaloides en orina, fueron mayores ( $P < 0,05$ ) en novillos que consumían K31 que en novillos que consumían Fo+ y Fo-, no encontrándose diferencias entre estos. En el primer pico de moscas (fines de primavera) los animales de K31 presentaron mayor ( $P < 0,05$ ) carga de moscas que Fo+ y Fo-, no encontrándose diferencias entre estos. El número de pupas obtenidos no fue diferente entre los tratamientos. Estos datos nos permiten aseverar que el uso del control positivo (K31) evidenció la toxicidad de los alcaloides consumidos. Concluimos que el consumo de Fo+ no afecta los parámetros fisiológicos de los animales que la consumen bajo condiciones edafoclimáticas de la región este de Uruguay. Además, el consumo de la misma no tiene un efecto en la carga de la mosca de los cuernos ni en el desarrollo larvario.

## 2. SUMMARY

The objective of this project was to enhance the knowledge on the effects of novel endophytes associated with Fortuna tall fescue on live-weight gain and physiology of steers and the relation of the endophytes with horn fly (*Haematobia irritans irritans*). A total of 21 Angus steers of 12-18 months were blocked based on their age and weight. The treatments consisted on three different pastures where the steers were assigned to graze during one year: Fortuna fescue with AR584 endophyte (Fo+, n=7), Fortuna fescue without endophytes (Fo-, n=7) and Kentucky 31 fescue with wild endophytes (K31, n=7). Available and remaining forage was determined in the pastures. The presence of endophytes was determined using blotting test. Measurements on the steers included: live weight (LW), respiration rate (RR), rectal temperature (RT), subcutaneous temperature (SCT) as well as liver enzymes concentration, urea, creatinine, cholesterol, prolactin in serum, and ergo-alkaloids in urine. The effect of alkaloids on adult horn fly load (*Haematobia irritans irritans*) was monitored using photographic records, while larval development was evaluated through determination of their survival in fresh feces. No significant differences were observed in the remaining forage between the treatments. The percentage of endophyte infection was of 97, 96 and 0 % for K31, Fo+ and Fo- treatments, respectively. The steers of Fo+ and Fo- showed similar gaining in live weight, alkaline phosphatase, cholesterol and prolactin concentration, and were higher than ( $P<0.05$ ) the observed values in steers consuming K31. The RT, SCT, RR, urea and ergo- alkaloids concentration in urine were higher ( $P<0.05$ ) in steers consuming K31 than steers consuming Fo+ and Fo-, without significant differences among these two. In the first peak of horn fly (late spring) steers in K31 had higher ( $P<0.05$ ) load of horn flies than Fo+ and Fo-, without significant differences among them. The number of pupae obtained was not different in the three treatments ( $P=0.637$ ). These results enable us to state that the consumption of Fo+ does not affect the physiological parameters of steers consuming it under the edapho-climatic conditions in the East region of Uruguay. Furthermore, its consumption does not influence the control of horn fly development, neither in adult nor larval stages.

### 3. INTRODUCCIÓN

En los últimos años una de las temáticas más relevantes a nivel mundial, ha sido la referente al “calentamiento global” y su efecto en el cambio del clima en diversas regiones del mundo. En Uruguay, existe una creciente preocupación en relación a los posibles impactos negativos sobre la producción agropecuaria. Estudios realizados a nivel de la región han demostrado que en los últimos 60 a 70 años se ha incrementado el promedio anual de lluvias (en primavera y verano), las temperaturas mínimas a lo largo del año, así como los eventos extremos (exceso hídrico, sequías y olas de calor), lo que estaría promoviendo entre otros aspectos un aumento de la incidencia de enfermedades, plagas y parásitos tanto en la producción vegetal como en la producción animal (Bidegaín, 2008; Travasso, 2008; Oyhançabal, 2009). Esto determina la necesidad de desarrollar estrategias de adaptación que involucren mejoras en la capacidad de producción forrajera en particular pasturas tolerantes al ataque de plagas, así como a las adversidades climáticas.

Ha sido largamente demostrado que las asociaciones simbióticas entre gramíneas y endófitos permiten incrementar la tolerancia de las plantas infectadas a la escasez de agua y al ataque de parásitos y/o predadores (Popay & Rowan, 1994; Schardl et al. 2004). Uno de los ejemplos es la *Festuca arundinacea* asociada al hongo endófito *Epichloe coenophiala* (Leuchtmann et al. 2014). La festuca es una gramínea forrajera perenne, utilizada en forma pura o en mezclas con leguminas para la alimentación del ganado en sistemas intensivos asociados a la producción lechera e invernada. Cuando está asociada simbióticamente al hongo endófito *Epichloe coenophiala*, adquiere mayor capacidad productiva y resistencia a factores bióticos como insectos y parásitos (Schardl et al. 2004) y abióticos como el estrés hídrico (Glenn et al. 1996). Sin embargo, los endófitos producen ergo-alcaloides que impactan negativamente en la salud de los bovinos que la consumen. La toxicidad de la festuca depende de las condiciones edafoclimáticas como el contenido de nitrógeno y fósforo del suelo, así como de la humedad relativa y temperatura ambiente. Se ha demostrado que, a mayor humedad relativa y temperatura ambiente, mayor toxicidad (Rottinghaus et al. 1991; Arechavaleta et al. 1992; Malinowski et al. 1998). Además, varía la susceptibilidad de las especies afectadas, siendo los bovinos uno de los más susceptibles. En los mismos causa los trastornos conocidos como “Pie de Festuca” en invierno, Necrosis Grasa y el “Síndrome Distérmico” en verano (Strickland et al. 2011).

En la búsqueda de nuevas asociaciones simbióticas menos perjudiciales para el ganado, se han identificado y patentado nuevos hongos endófitos capaces de producir solamente los alcaloides que poseen efectos benéficos sobre las plantas (Roynance et al. 1994; Scharld & Panaccione, 2005), quedando demostrado que estas asociaciones mejoran la productividad, reducen el ataque de fitoparásitos (Bouton et al. 1993) y no afectan la salud de los animales que la consumen (Parish et al. 2003b). Al presente se cuenta con un reporte (Johnson et al. 2012) donde se testeó la inocuidad del hongo endófito AR584 en bovinos. Estos autores encontraron que la

ganancia de peso vivo fue similar entre novillos que consumían festuca con AR584 y los que consumían festuca libre de endófito (E-), pero fueron mayores que para los novillos que consumían festuca con el endófito tóxico (E+). Además, la temperatura rectal fue mayor para los animales que consumían E+ que para AR584 y E-, no encontrando diferencias entre éstos. Dado que las condiciones edafoclimáticas afectan la toxicidad de estas asociaciones y teniendo en cuenta la importancia de contar con esta tecnología en nuestro país, se plantea estudiar una nueva asociación: *Festuca arundinacea* cv Fortuna con el endófito AR584 con bovinos machos de sobreño pastoreando esta festuca con y sin el hongo asociado en la región este de Uruguay.

Por otro lado, los mismos alcaloides producidos y circulando en el animal podrían controlar parásitos. Se ha sugerido que el consumo de festuca Kentucky 31 reduce la presencia de ectoparásitos como la mosca de los cuernos, demostrando una reducción en la carga de moscas adultas (Brown et al. 1993) y el desarrollo larvario de las moscas cultivadas en heces de bovinos (Parra et al. 2013). No hemos encontrado otros reportes al respecto. Esta información nos alienta a conocer si el consumo de festuca asociada a nuevos endófitos conserva esta propiedad de regulación parasitaria a través del consumo de alimentos.

En suma, el presente proyecto plantea el estudio de la respuesta fisiológica de los bovinos al consumir esta nueva asociación de festuca-endófito cuando es cultivada bajo condiciones ambientales de Uruguay. Paralelamente se analizarán los posibles efectos benéficos en el control de la mosca de los cuernos.

## 4. ANTECEDENTES

Uruguay ha sido definido como un país ganadero por excelencia. La ganadería como rubro exclusivo ocupa 12,4 millones de hectáreas, de las cuales el 89% es de pasturas naturales (campo natural) y 11% son pasturas mejoradas (mejoramientos, praderas o verdeos), ocupando en su totalidad el 76% de la superficie total del país. La producción pecuaria representa el 28% del PIB agropecuario, el 3,2% del PIB nacional y el 16,1% de las exportaciones agropecuarias (DIEA, 2016). La producción de carne en Uruguay está basada en pasturas naturales e introducidas. La productividad de las mismas, se relaciona directamente con las cantidades y la distribución estacional de las precipitaciones y en segundo lugar es afectada por otras variables climáticas (Yahdjian & Sala, 2008). Los establecimientos tradicionales se basan históricamente, en un sistema extensivo de producción, donde la vegetación natural es la base de producción de alimentos. Por lo que ante esta situación el modelo de producción se basa en acompañar las demandas de los animales con el ciclo de las pasturas.

Este sistema se encuentra presionado para lograr aumentar su productividad y rentabilidad debido a “factores de cambio” internos y externos, tales como el precio la tierra, competencia por el recurso suelo con otros rubros, el precio del producto, el tipo de cambio, cumplimiento de exigencias de mercados y la propia regulación ambiental local. En los últimos años, ha habido una tendencia a modificar las pasturas naturales, mediante la introducción de nuevas especies, pasturas implantadas, el uso de fertilizantes y en algunos casos el riego. El paso de pasturas naturales a pasturas implantadas, puede brindar el potencial necesario para aumentar la productividad, pero también plantea interrogantes de tipo ambiental. Existe el riesgo de que esta transición hacia un sistema de pasturas modificadas tenga una menor resistencia a factores tales como el cambio climático.

Durante las últimas décadas ha crecido la conciencia mundial acerca de la tendencia del calentamiento global y en consecuencia el cambio del clima. Ante la situación de incremento en la variabilidad climática y de una mayor frecuencia de eventos extremos que se espera para nuestro país, será necesaria la aplicación de medidas de respuesta al cambio climático a partir de las medidas de mitigación y de adaptación (Informe final MGAP, 2011). Si bien es importante corregir las causas que dieron origen al cambio climático utilizando medidas de mitigación, se vuelve imprescindible la necesidad de adoptar medidas de adaptación, especialmente por parte de los sectores de la agricultura, debido a su conocida dependencia con el clima.

Una alternativa a la adaptación es la utilización de forrajes que sean más resistentes a los eventos climáticos extremos (sequías o excesos hídricos). Una de las gramíneas de las que hay abundante información debido a su versatilidad de adaptación a diferentes tipos de suelo y climas, es la *Festuca arundinacea*. Estas propiedades se ven incrementadas cuando se encuentra infectada con un hongo endófito, el *Epichlōe coenophiala*. Por sus fuertes implicancias en la ganadería mundial, han sido estudiados con gran interés, las asociaciones entre hongos endófitos y gramíneas, especialmente en

raigrás y festuca. Numerosas investigaciones han sido desarrolladas, no solo desde la perspectiva de la respuesta animal y de los aspectos toxicológicos involucrados, sino que también desde el punto de vista de la planta, del hongo y de cómo explorar los beneficios que ofrecen estas asociaciones endófito-pasto.

#### **4.1 Relación *Festuca arundinacea* var Schreb y el hongo endófito *Epichlōe coenophiala***

La *Festuca arundinacea* es una especie originaria de las regiones templadas de Europa, Asia y Norte de África (Maddaloni & Ferrari, 2001). Si bien hubo investigaciones tempranas en pequeñas parcelas, su popularidad comenzó en 1943 con la liberación comercial del cultivar “Kentucky 31” que fue ampliamente aceptada por los agricultores entre las décadas de 1940 y 1950 (Hoveland, 1993).

Debido a la alta adaptabilidad a un amplio rango de condiciones ambientales, alta persistencia bajo diferentes sistemas de manejo, buen rendimiento forrajero, larga temporada de cultivo, así como excelente producción de semillas y resistencia a plagas (Bacon & Siegel, 1988; Schmidt & Osborn, 1993; Lacefield et al. 2004), la festuca es una de las gramíneas perennes templadas más utilizada alrededor del mundo (Hannaway et al. 2009). En Uruguay es la principal gramínea templada perenne cultivada tanto en pasturas puras como en mezclas con leguminosas, ocupando el 49% del total del área de pasturas artificiales del país (DIEA, 2015). Se utiliza principalmente en sistemas intensivos asociados a la producción lechera e invernada.

Sus características de adaptabilidad se han atribuido a la naturaleza de una simbiosis mutualista de la festuca con un hongo endófito, *Epichlōe coenophiala* (Bush et al. 1997; Panaccione et al. 2001). Éste pertenece a la familia *Clavicipitaceae*, originalmente identificado como *Epichlōe typhina* (Bacon et al. 1977), luego como *Acremonium coenophialum* (Morgan-Jones; Gams, 1982) y posteriormente como *Neotyphodium coenophialum* (Glenn et al. 1996). En el 18º Congreso Internacional de Botánica realizado en Melbourne, Australia, se realizaron cambios en las reglas de nomenclatura Internacional para algas, hongos y plantas, y *Neotyphodium coenophialum* fue reclasificado en el género *Epichlōe* (Leuchtmann et al. 2014).

Los endófitos (endo: dentro; phito: planta), son hongos de origen natural cuyo ciclo de vida completo se produce dentro de la planta. Viven en los espacios intercelulares de diferentes órganos de la misma (excepto en la raíz) sin dañar sus células y se transmiten de forma asexual de una a otra generación de plantas por medio de las semillas (Waller, 2009). Tienen un ciclo de vida directo (figura 1), que se caracteriza por crecer dentro de la planta por medio de hifas. En este sentido no producen estromas, por tanto, no pueden ser transmitidos a otras gramíneas, excepto a través de sus semillas; tampoco producen conidios o ascosporas, por lo tanto, no forman estructuras reproductivas visibles (Bacon & De Battista, 1991).

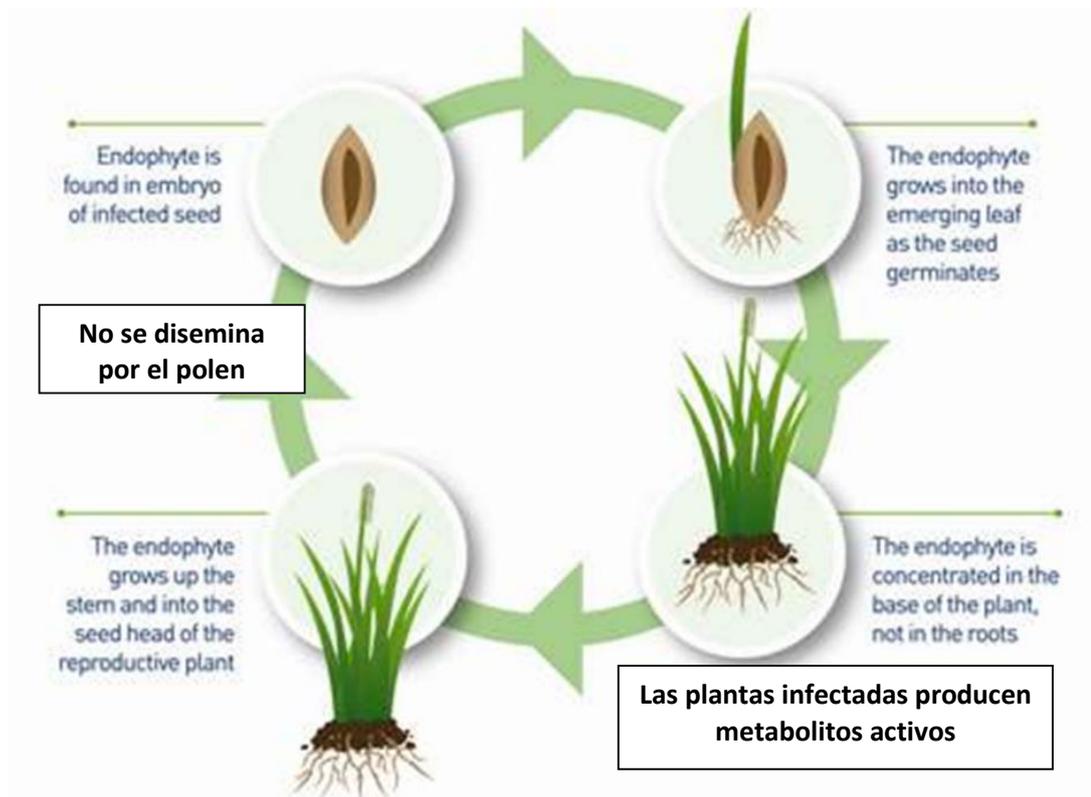


Figura 1. Ciclo de vida del endófito. El hongo se disemina solamente por la semilla. Cuando esta germina, el hongo coloniza principalmente vainas y hojas inferiores en la base la planta. Cuando la planta florece, el hongo coloniza las semillas.<sup>1</sup>

Los cambios estacionales influyen en la distribución de *E. coenophiala* dentro de la planta. Siegel et al. (1985) observaron que el recuento de micelios se correlaciona positivamente con aumentos en la temperatura y durante los períodos de inactividad de la planta los micelios se confinan en la región del meristema apical. Cuando se reactiva el crecimiento de la planta, las hifas del hongo comienzan a crecer en los espacios intercelulares.

La asociación de la festuca y su endófito es una simbiosis mutualista donde el hongo recibe de la planta: nutrientes, protección y una vía para diseminarse (Hill et al. 1991). La planta se beneficia porque los alcaloides que produce el hongo le confieren ciertas ventajas adaptativas, especialmente bajo ambientes de estrés. Se ha demostrado que estos alcaloides protegen a la planta huésped contra el estrés biótico (insectos, nematodos, hongos u otros patógenos) y abiótico (sequía, deficiencia mineral y bajo pH del suelo) (Thompson et al. 2001). Todo esto se traduce en mayor producción de biomasa y de semillas en relación a las plantas no infectadas (Hill et al. 1991; West et al. 1993). Además, la presencia del endófito no altera las características agronómicas de la festuca, ni los parámetros de calidad tales como la proteína cruda (PC), fibra detergente

<sup>1</sup>Grasslanz Technology, (2011). <http://www.grasslanz.com/UnderstandingtheScience/Novelendophytetechnologies.aspx>. Fecha de consulta: 10/3/16.

neutro (FDN), fibra detergente ácida (FDA) y la digestibilidad in-vitro de la materia seca (DIVMS) (Bush & Burrus, 1988).

El *E. coenophiala*, sintetiza cuatro clases de alcaloides: pirrolizidinas (ej.: lolina), pirrolopirazinas (ej.: peramina), indol diterpenoides y ergo-alcaloides (ej.: ergovalina) (Siegel et al. 1990). Las lolinas y las peraminas son los principales alcaloides encargados de la disuasión de los insectos y resistencia al estrés hídrico, respectivamente (Clay et al. 1985; Riedell et al. 1991; Porter, 1995).

En un ensayo Popay et al. (1999), evaluaron el efecto del endófito sobre las larvas del gorgojo argentino del tallo. Con la presencia del endófito tóxico (E+), solo el 10% de los tallos estaba infectado por larvas, en tanto que la pastura sin endófito (E-) el 60% de los tallos estaba infectado con larvas.

Las plantas de festuca infectadas con endófito (E+) son usualmente más persistentes bajo déficit de agua que aquellas no infectadas (E-) (Bacon et al. 1993; West et al. 1993). Assuero et al. (2000) reportaron que la festuca E+ tenían menos peso en seco y menor número de macollos, pero una tasa de crecimiento neta más alta durante el déficit de agua que las plantas E-. Ante moderado déficit de agua las plantas E+ reducen el crecimiento y la senescencia mientras acumulan osmoprotectores (azúcares) dentro de la base del tallo, siendo éstos mecanismos menos intensos en las plantas E- (Assuero et al. 2006), por lo que en severos déficits hídricos las plantas E+ sobreviven debido a la baja exposición del área foliar y la alta concentración de osmoprotectores en sus meristemas mientras que las E- mueren por la baja tolerancia a la deshidratación.

La infección endófitica generalmente se mide por la presencia (+) o ausencia (-) de hifas fúngicas dentro de los tallos o semillas de festuca y se indica el porcentaje del total de tallos o semillas infectadas en la población. Se pueden emplear algunas técnicas para la determinación del endófito, las más comúnmente utilizadas son la microscopía y la utilización de anticuerpos monoclonales. Para la observación macroscópica se pueden utilizar la tinción con azul de anilina (Bacon et al. 1977) o rosa de bengala (Hiatt et al. 1999). La técnica basada en anticuerpos monoclonales (inmunoblott o Blotting test) es tan confiable como la microscopía, pero es más rápida y menos subjetiva, siendo capaz de identificar la presencia del endófito desde tres semanas después de la germinación de la planta, mientras que la microscopía lo hace a partir de la sexta semana pos germinación (Hiatt et al. 1999; Hill et al. 2002) (figura 2).

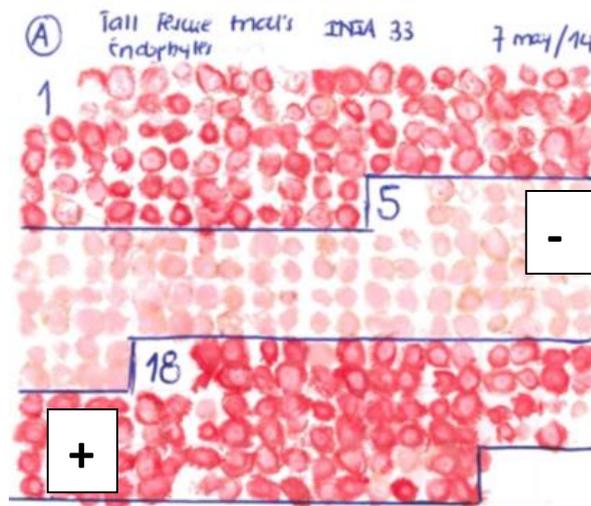


Figura 2. Prueba de anticuerpos monoclonales para el endófito *E. coenophiala* en secciones transversales de macollos de festuca. La mancha indica la presencia del endófito (+), la ausencia de ella indica libre de endófito (-). La variación en la intensidad de la mancha (color rojo) refleja la variación en la distribución del endófito entre y dentro de los tallos. Los números 1, 5 y 18 indican la parcela donde fueron extraídos los macollos (Festuca con endófito AR584, festuca sin endófito, y festuca con endófito tóxico respectivamente).

Más importante que la identificación del endófito en la pastura o semilla, es la identificación de la presencia y cantidad de alcaloides tóxicos que son producidos por el mismo. Estos pueden ser medidos de forma cuantitativa por medio de HPLC (Rottinghaus et al. 1991; Hill et al. 1993; Spiering et al. 2002; Kallenbach et al. 2003). Otro método para medir alcaloides tóxicos en la festuca es el ELISA (Reddick, 1988; Gwinn et al. 1991). Éste tiene una ventaja sobre HPLC ya que además de la ergovalina, puede detectar a los demás ergo-alcaloides.

#### 4.2 Efectos de los alcaloides producidos por *Epilichlōe coenophiala* en los bovinos

Los principales alcaloides generados por la interacción de la planta y el endófito son los ergo-alcaloides, indol-diterpenoides, lolinas (aminopirrolizidinas saturadas) y peraminas (pirrolopirazinas) (Porter, 1995; Young et al. 2013). Aunque estos compuestos pueden ser benéficos porque protegen a la planta de la predación por insectos, nematodos y otros patógenos (Thompson et al. 2001), es bien conocido el efecto negativo de los ergo-alcaloides y los indol-diterpenoides que resulta en pérdidas en la producción de ganado en pastoreo (Bacon et al. 1977).

La festucosis es una condición que se produce a partir del pastoreo de festuca E+, tiene un impacto perjudicial en el rendimiento animal y es de gran importancia económica para la industria de la carne. Se ha llevado a cabo mucha investigación para comprender mejor el papel y el impacto de la ingestión de ergo-alcaloides en la alteración de la fisiología animal, así como el desarrollo de enfoques de manejo para aliviar los problemas de desempeño asociados.

Los ergo-alcaloides se pueden agrupar en tres grandes clases dependiendo de la unión de los grupos funcionales al resto del anillo del ácido lisérgico común a sus estructuras (Rutschmann & Stadler, 1978): 1) el ácido lisérgico es una clase propia y tiene un grupo funcional que consiste en un ácido carboxílico, 2) las amidas simples de ácido lisérgico y 3) los alcaloides ergopeptídicos o ergo-péptidos (figura 3). Estos últimos están formados por la unión del ácido lisérgico más tres aminoácidos; la variación de estos aminoácidos determina los diferentes ergo-péptidos (Scharld & Panaccione, 2005). Todas las clases de ergo-alcaloides son potencialmente tóxicas que, con la exposición crónica, pueden causar festucosis.

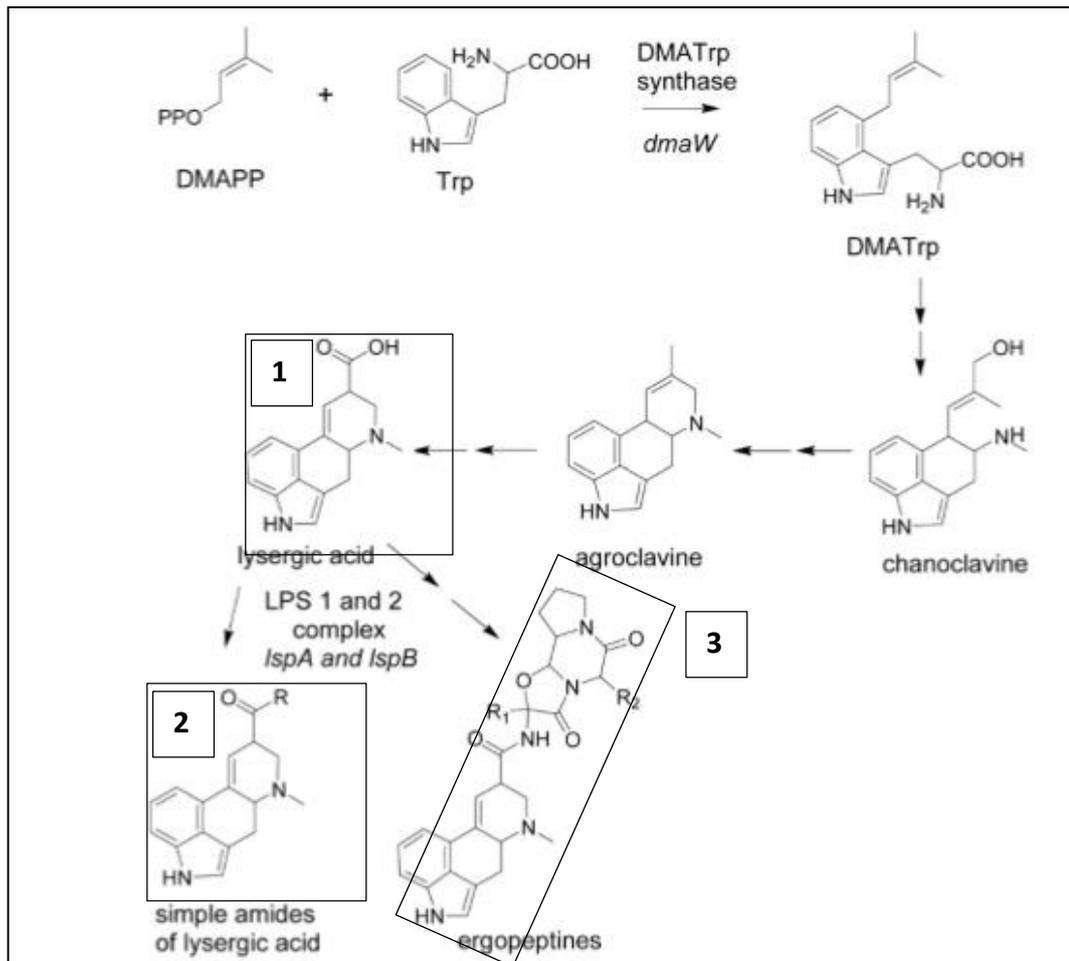


Figura 3. Esquema general de la biosíntesis de ergo-alcaloides de la simbiosis *Festuca-Epichlöe coenophiala*. DMAPP: difosfato de dimetililo; Trp: triptófano; DMATrp, dimetilol-triptófano; *DraW*: gen que codifica para DMATrp sintasa; LPS1 y LPS2, dos subunidades de D-lisergil péptido sintetasa; Y *LpsA* y *LpsB*, codifican para las enzimas LPS. 1: ácido lisérgico; 2: amidas simples del ácido lisérgico y 3: ergo-péptidos. <sup>2</sup>

De todas formas, clásicamente se ha atribuido la etiología de la intoxicación por consumo de festuca, al grupo de los ergo-péptidos; dentro de este grupo la ergovalina es la que se encuentra en mayor concentración (84 a 97 % de

<sup>2</sup> Bush, LP., Fannin, FF. (2009). Alkaloids. In: Fribourg, HA., Hannaway, DB., West, CP. Tall fescue for the Twenty-first Century. Ed. Lisa Al-Amoodi, Agronomy Monograph 53, ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI, Cap. 13, pp.229-249.

la fracción total; Porter, 1995; Strickland et al. 2011). Las concentraciones mínimas de 50 a 500 ppb de ergovalina pueden causar problemas clínicos en el ganado (Evans et al. 2004), y en tallos y hojas puede encontrarse en concentraciones entre los 200 y 600 ppb, mientras que en las semillas puede estar entre las 2000 a 4000 ppb.

#### *4.2.1 Absorción y biodisponibilidad en el rumiante*

No hay datos que describan la biodisponibilidad de las diferentes clases de ergo-alcaloides en los bovinos que consumen festuca E+. Esto hace que se pueda especular, pero no saber certeramente, que ergo-alcaloide produce la intoxicación.

De todos los alcaloides ergo-péptidos, la ergovalina es la que está presente en mayor concentración (Lyons et al. 1986) y se cree que es la responsable de la festucosis (Joost, 1995). Hill et al. (2001) reportaron que el ácido lisérgico (el anillo central de los ergo-péptidos) atraviesa el epitelio ruminal en una tasa mayor que cualquier otro alcaloide que haya sido testeado y sugieren que puede ser éste y no la ergovalina, el responsable de la festucosis. Sin embargo, estos autores no testearon todos los alcaloides presentes en la festuca infectada con endófitos e incluso no evaluaron la absorción ruminal de ésta. En acuerdo con éstos, Westendorf et al. (1993) y Strickland et al. (2011) sugirieron que el primer sitio de degradación y absorción de los alcaloides es en el rumen.

Algunos autores han sugerido que los alcaloides que se encuentran en las pasturas, una vez liberados por los microorganismos ruminales, son rápidamente absorbidos en rumen como ácido lisérgico y amidas del ácido lisérgico y biotransformados en el hígado por la enzima citocromo P450 3A, la cual hace al ergo-péptido más hidrófilo para ser posteriormente excretado (Moubarak & Rosenkrans, 2000; Settivari et al. 2008; Strickland et al. 2011). Se ha descrito que, en función de su peso molecular, será la ruta de excreción que tome (Eckert et al. 1978). Con excepción de la dietilamida del ácido lisérgico (que se excreta en bilis), los ergo-alcaloides con un peso molecular de menos de 350 Da fueron excretados en los túbulos renales con la orina, los que tenían pesos moleculares entre 350 y 450 Da a menudo fueron excretados en orina y bilis y aquellos con pesos moleculares por encima de 450 Da se excretaron en la bilis.

En un ensayo realizado por De Lorme et al. (2007), encontraron que la concentración de ácido lisérgico en orina de ovejas, fue 1,4 veces mayor de la que determinaron en el forraje y que no se detectó la presencia de ergovalina. Debido al peso molecular de la ergovalina y a su polaridad, se esperaba que se excretara en bilis y apareciera en heces, como se demostró en trabajos previos donde utilizaron ergo-alcaloides radiomarcados (Eckert et al. 1978). A su vez, encontraron que la concentración de ácido lisérgico en las heces era mayor que en la dieta, lo que indica que fue producido por los microbios ruminales a partir de la degradación de los ergo-alcaloides presentes en el forraje y que, aunque la ergovalina puede representar hasta el 80% de los alcaloides producidos en la festuca (Lyons et al. 1986),

muchos otros ergo-alcaloides, como la ergocriptina, la ergotamina y la ergonovina, pueden encontrarse en la festuca E+. Todos éstos contienen la estructura del anillo del ácido lisérgico y varían sólo en la composición de la cadena lateral. Por lo tanto, teóricamente se pueden degradar a ácido lisérgico y pueden explicar la cantidad adicional de éste que se excreta (De Lorme et al. 2007). Estos autores propusieron un modelo de degradación y absorción de ergo-alcaloides en el tracto digestivo de los rumiantes (figura 4).

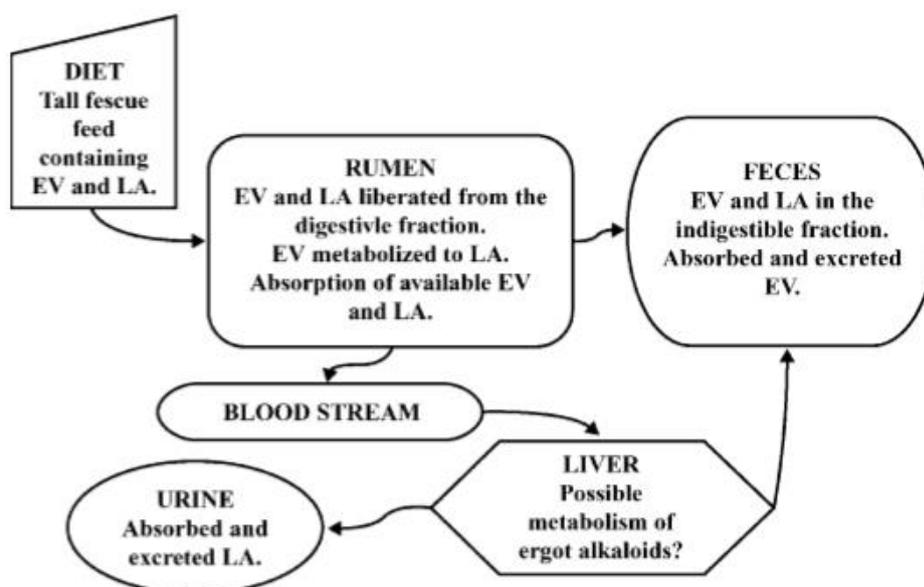


Figura 4. Modelo propuesto para explicar el metabolismo, absorción y excreción de los ergo-alcaloides. El forraje que contiene ergo-alcaloides entra en el rumen, donde se produce la digestión microbiana del material vegetal y los alcaloides son liberados al líquido ruminal. Los ergo-péptidos son degradados por los microorganismos ruminales en alcaloides de ergolina simples o a ácido lisérgico. La ergolina y el ácido lisérgico, son absorbidos a través del rumen en grandes cantidades. Los ergo-péptidos que quedaron sin degradarse, son absorbidos en pequeñas cantidades. Una vez absorbidas, se transportan a través del torrente sanguíneo hasta el hígado, donde pueden metabolizarse para poder ser excretados. Desde este, los ergo-alcaloides de gran peso molecular se excretan a través de la bilis, y los de bajo peso molecular a través de la orina. EV= ergo-péptidos, LA= ácido lisérgico.<sup>3</sup>

Stuedemann et al. (1998), demostraron que aproximadamente el 96% de los ergo-alcaloides se excretan por la orina y muy pocas cantidades de éstos por la bilis. Además, observaron que dentro de las 12 h después de cambiar los novillos de festuca E- a E+, los niveles de alcaloides urinarios aumentaron hasta aproximadamente el 33% de aquellos encontrados en novillos que pastorean continuamente E+.

La medición en suero de varios ergo-péptidos inyectados vía intravenosa en unos terneros mostró una distribución que duró aproximadamente una hora en el organismo, la cual se dividió en tres fases: una de equilibrio de la distribución del volumen, otra de equilibrio entre sangre y tejido, y la última

<sup>3</sup> De Lorme, MJM., Lodge-Ivey, SL., Craig, AM. (2007). Physiological and digestive effects of *Neotyphodium coenophialum*-infected tall fescue fed to lambs. *J Anim Sci* 85:1199-1206.

de eliminación por el hígado (Moubarak et al. 1996). Además, existe evidencia que los ergo-péptidos se acumulan en el tejido adiposo, aunque los resultados obtenidos en diferentes experimentos no han sido consistentes (Strickland et al. 2011).

Debido a que la vida media serológica de los ergo-alcaloides es de sólo minutos, la medición en sangre es difícil (Moubarak et al. 1996). Es por esto que, Stuedemann et al. (1998), sostienen que los patrones de excreción urinaria son el mejor indicador del pasaje en la circulación de los ergo-alcaloides en rumiantes.

#### 4.2.2 Etiopatogenia de la intoxicación

Los ergo-alcaloides se componen de un anillo de ergolina que los hace muy similar en estructura a ciertos neurotransmisores: epinefrina, dopamina, norepinefrina y serotonina (Larson et al. 1995) (figura 5). Estos cuatro compuestos son neurotransmisores normalmente encontrados en el cuerpo que regulan una cantidad importante de conductas fisiológicas como el apetito, la función cardiovascular, la actividad endocrina, la motilidad gastrointestinal, la contracción muscular y la regulación de la temperatura. Los ergo-alcaloides tienen propiedades farmacológicas diversas, ya que son capaces de interactuar con los receptores dopaminérgicos,  $\alpha$ -2 adrenérgicos y serotoninérgicos en el cuerpo (Berde & Strumer, 1978; Muller-Schweinitzer & Weidmann, 1978; Pertz & Eich, 1999). Algunos rasgos fisiológicos regulados por los neurotransmisores se alteran tras el pastoreo de festuca infectada con endófito debido a las actividades farmacológicas de los ergo-alcaloides consumidos (Oliver, 1997).

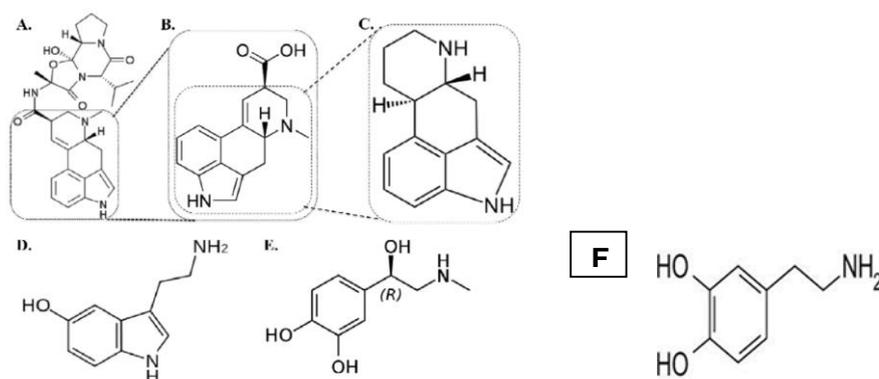


Figura 5. Semejanzas estructurales entre ergo-alcaloides y neurotransmisores. Ergovalina (A) contiene ácido lisérgico (B) que incluye ergolina (C). La ergolina es muy similar en estructura a varios neurotransmisores, incluyendo serotonina (D), epinefrina (E) y dopamina (F)<sup>4</sup>.

Dado que la activación de los receptores de dopamina D1 estimula la vasodilatación, el antagonismo de estos receptores con el consumo de ergo-alcaloides se asocia con vasoconstricción (Cross et al. 1995). Por otro lado,

<sup>4</sup> Esquema modificado de Burns, MG. (2012). Timing of exposure to toxic tall fescue: Effects on beef cattle reproduction. Thesis Doctor of Philosophy on Animal and Veterinary Sciences. Clemson University. Carolina del Sur, Estados Unidos. 69 p.

los alcaloides de la festuca actúan como agonistas de los receptores de dopamina D2. La dopamina actuando a través de sus receptores D2 hipofisarios inhibe la secreción de prolactina (Strickland et al. 1992; Cross et al. 1995). Por lo tanto, el accionar agonista de los ergo-alcaloides sobre los receptores D2 produce una reducción de los niveles de prolactina, que es uno de los parámetros bioquímicos más frecuentemente encontrados en los animales expuestos a la festucosis, razón por la cual se considera su utilización como biomarcador de la exposición (Strickland et al. 1992; Emile et al. 2000; Oliver et al. 2000; Browning et al. 2001).

Una de las funciones de la dopamina y/o la prolactina es el control termorregulatorio en el centro del hipotálamo; la disminución de la prolactina y/o la perturbación de los receptores de dopamina pueden causar hipertermia o hipotermia, dependiendo de si la temperatura ambiental esta por fuera del rango termoneutral del animal (Spiers et al. 2005). Es así como se diferencian dos síndromes en animales consumiendo festuca E+: el “pie de festuca” que es propenso a aparecer a temperaturas menores de 8°C y el “síndrome distérmico” que se hace evidente cuando la temperatura supera los 31°C (Schmidt & Osborn, 1993; Tor-Agbidye et al. 2001). Además, la prolactina cumple un papel importante en la lipogénesis a través del control del metabolismo del colesterol y los triglicéridos en el hígado. En un seguimiento realizado por Oliver et al. (2000) durante tres años, encontraron cómo hallazgo consistente y significativa la disminución de la concentración sérica de colesterol en animales pastoreando festuca E+.

Otros receptores que se ven estimulados por el consumo de ergo-alcaloides son los receptores adrenérgicos alfa-2 y serotonina-2. A través de los primeros hay una mayor agregación plaquetaria en sangre que lleva a coagulación y necrosis tisular. La inducción de los receptores serotonina-2 genera mitogénesis del musculo liso vascular y estimulación del centro termorregulador y de la saciedad en el hipotálamo que lleva a un aumento de la temperatura corporal y depresión del apetito respectivamente (Oliver, 1997).

#### 4.2.3 Presentaciones clínicas en bovinos

En el año 1948 una enfermedad del ganado semejante al ergotismo, conocida como “pie de festuca” fue descrita por primera vez en Nueva Zelanda, mientras que, en Estados Unidos, la misma enfermedad fue descrita dos años más tarde (Bacon, 1995). En estos reportes no se halló presencia de semillas ni esclerótidos asociados a hongos productores de ergo-alcaloides, por lo tanto, se descartó a especies de *Claviceps* como los posibles agentes etiológicos. Sin embargo, en estudios posteriores, fueron aislados compuestos alcaloides a partir de festuca (Trethewie et al. 1953). Cuarenta años más tarde Schmidt & Osborn (1993) observaron que bovinos pastando festuca “Kentucky 31” tenían una menor ganancia de peso en comparación con otros bovinos que estaban en una pastura adyacente sin festuca. Esta observación dio lugar a una investigación que reveló que un hongo endófito crecía dentro de la planta (Bacon et al. 1977). La festucosis ocurre cuando la festuca (*Festuca arudinacea* Scherb) es infectada con el

hongo endófito *Neotyphodium coenophialum* (Mayland & Cheeke, 1995; Waller, 2009).

En los bovinos se han identificado tres tipos de síndromes relacionados con el consumo de festuca E+: pie de festuca (Jacobson et al. 1969), necrosis grasa (Stuedemann et al. 1985) y síndrome distérmico, siendo este último el más costoso y al que comúnmente se le conoce como “festucosis” (Schmidt & Osborn, 1993).

#### 4.2.3.1 Síndrome del otoño-invierno, pie de festuca o gangrena seca

El pie de festuca se da en el ganado pastoreando festuca E+ durante el invierno. Jacobson et al. (1969) reportaron gangrena 25 días después de empezar el pastoreo de festuca E+, observándose durante los primeros estadios de la enfermedad un color rojo en la banda coronaria de la pezuña. Si el ganado permanece en la festuca E+, a la gangrena le sigue una necrosis y desprendimiento de la pezuña, pudiendo en ocasiones perder otras extremidades tales como la punta de las orejas y la cola. Todo esto como resultado de la vasoconstricción asociada al consumo de festuca E+ (Yates et al. 1979).

Además de la afección de las extremidades, también se ve reducido el desempeño del animal (Jacobson et al. 1969). Read & Camp (1986) observaron menores ganancias de peso en novillos y vaquillonas pastoreando festuca altamente infestada con endófitos en comparación con aquellos pastoreando festuca con baja infestación y observaron a finales del invierno que algunos animales desarrollaron signos de “pie de festuca”.

La observación microscópica en disecciones de los miembros afectados que muestran trombosis de las arterias, conjuntamente con las temperaturas ambientales bajas y el consumo de ergo-alcaloides de la festuca E+, permiten hipotetizar que la vasoconstricción y el bajo flujo de sangre que llega a las extremidades son la causa de las gangrenas observadas en este síndrome (Schmidt & Osborn, 1993). A pesar que muchos científicos han especulado que existe una relación entre la presencia de *N. coenophialum* y el pie de festuca, existe evidencia que no siempre éste es el caso. Hoveland et al. (1983) no observaron ninguna evidencia de pie de festuca en un estudio que realizó durante 4 años sobre pasturas “Kentucky 31” altamente infestadas con el endófito, mientras que Pedersen et al. (1986) obtuvieron hallazgos similares en un estudio que se realizó durante tres años.

#### 4.2.3.2 Síndrome de necrosis grasa del bovino

En exámenes post mortem se ha diagnosticado que bovinos pastoreando festuca E+ padecen una patología conocida como lipomatosis, más comúnmente denominada necrosis grasa bovina (Stuedemann et al. 1985). La necrosis grasa se caracteriza por la presencia de masas duras de grasa necrótica, principalmente en la cavidad abdominal, lo cual genera un inadecuado espacio físico dentro de la cavidad y regiones del tracto

reproductivo que en consecuencia generan signos como problemas digestivos y distocia (Schmidt & Osborn, 1993).

La ocurrencia de necrosis grasa se ha asociado a bovinos comiendo pasturas de festuca E+ que han recibido altos niveles de fertilización con nitrógeno y además se ha observado que estos animales tienen bajas concentraciones de colesterol en plasma (Stuedemann et al. 1985).

El síndrome de necrosis grasa del bovino por consumo de festuca E+ no ha sido reportado en Argentina (Maddaloni & Ferrari, 2001), ni en Uruguay.

#### 4.2.3.3 *Síndrome de primavera-verano, hipertérmico o festucosis*

Este síndrome es el más comúnmente observado en el ganado. Se caracteriza clínicamente por la aparición de animales sedientos, excesiva salivación, intolerancia al calor, temperatura corporal y frecuencia respiratoria aumentada, con bajo desempeño como pobre ganancia de peso, baja producción de leche y baja tasa de concepción. Es más dramático durante el verano cuando la temperatura alcanza los 31°C, aunque también se ha observado durante otras épocas del año, sin descartar la posibilidad de la exposición simultánea a ergo-alcaloides en estos casos (Schmidt & Osborn, 1993, Tor- Agbidye et al. 2001). A nivel sérico, las concentraciones de enzimas hepáticas, colesterol y prolactina se encuentran disminuidas (Thompson et al. 2001).

Los animales se observan con pelo áspero, sin pelechar desde el invierno, por lo cual el sol decolora el pelo durante el verano. En consecuencia, la temperatura corporal se eleva, se observa salivación excesiva y el ganado pasa más tiempo en la sombra o dentro del agua durante el día y menos tiempo consumiendo forraje (Hemken et al. 1979; Schmidt et al. 1982). Los estudios han indicado que estos animales mantendrán los abrigos de pelo ásperos en los períodos de primavera y verano (Hemken et al. 1984; Stuedemann & Hoveland, 1988; Schmidt & Osborn, 1993). Aunque la causa se desconoce, la especulación indica que la retención de una capa de pelo áspera puede estar dirigida a la deficiencia de nutrientes debido a la vasoconstricción y la isquemia periférica, o a los niveles hormonales alterados en los folículos pilosos (Oliver, 2005). Los resultados de McClanahan et al. (2008) indicaron que los novillos que se alimentan de festuca tóxica no sólo conservan sus abrigos de pelo ásperos, sino que exhiben un crecimiento continuo del cabello a finales de los meses de verano.

Las observaciones de cambios fisiológicos en el animal por consumo de festuca infestada con *E. coenophiala* han sido también ampliamente descritas. Jacobson et al. (1969) reportaron frecuencia respiratoria aumentada en novillos pastoreando festuca E+ comparado con novillos pastoreando festuca E-, que se acentuaba más cuando los animales eran llevados a un corral. Schmidt et al. (1982) reportaron altas temperaturas rectales para novillos alimentados con semillas de festuca E+ en comparación con novillos alimentados con heno de festuca E+. Esta

respuesta probablemente se explica por la mayor concentración de ergoalcaloides en la semilla que en el heno (Jackson et al. 1984; Siegel et al. 1984; Rottinghaus et al. 1991). Se demostró un menor flujo de sangre – determinado por microesferas radiomarcadas- hacia diferentes tejidos en novillos con dietas con alta concentración de ergovalina (Rhodes et al. 1991). Esto se asoció con la vasoconstricción periférica que sufrieron los animales consumiendo dietas altas en ergovalina, la cual generó hipertermia.

El ganado que pastorea festuca E+ exhibe cambios de comportamiento que incluyen pasar más tiempo en la sombra o alrededor del agua para aliviar el estrés térmico asociado con la termorregulación disfuncional. Se ha observado que novillos alimentados con festuca E+ tienden a cambiar su tiempo de pastoreo haciéndolo en los momentos más fríos del día y pastoreando con mayor frecuencia por la noche y la mañana temprana que el resto del día (Bond et al. 1984). Novillos asignados a potreros de festuca E+ estuvieron mayor tiempo inactivos y tuvieron pocos movimientos masticatorios que novillos asignados a potreros de festuca E- (Howard et al. 1992). Schmidt et al. (1982) reportaron que novillos alimentados con semillas de festuca E+ o heno E+ estaban más nerviosos y excitados que novillos consumiendo heno o semillas E-. Las amidas de ácido lisérgico e isolisérgico que han sido aisladas de festuca E+ se consideran las sustancias causantes de la depresión y apatía que se observa a veces en los animales alimentados con esta pastura (Cheeke, 1995).

La mayoría de datos de investigación de los efectos de *E. coenophiala* en el ganado han sido obtenidos a partir de ensayos y seguimientos en novillos de carne (Schmidt et al. 1982; Jackson et al. 1984; Paterson et al. 1995), probablemente asociado a que están en crecimiento y por lo tanto son más susceptibles a cambios en la calidad nutricional. La ganancia diaria en novillos pastoreando festuca E+ ha sido usada como uno de los indicadores de la severidad de la festucosis. Schmidt et al. (1982) suministraron semillas o heno de festuca E+ o E- a novillos durante 53 días y los novillos alimentados con semillas o heno E+ ganaron 0,76 kg/día y 0,38 kg/día menos que aquellos alimentados con semillas E-. En una revisión bibliográfica acerca del efecto de la festucosis en la productividad del ganado de carne donde se resumen 12 ensayos realizados en 10 localidades diferentes de Estados Unidos, las ganancias de peso diario de novillos consumiendo festuca E+ fueron 30 a 100% más bajas que en novillos consumiendo festuca E- (Paterson et al. 1995).

### **4.3 Festucosis en Uruguay y la región**

En América del Sur, la gran mayoría de los establecimientos de producción ganadera, utilizan pasturas naturales o cultivadas, en sistemas extensivos o semiextensivos, que promueven el mayor acceso de los animales a plantas tóxicas como la *Festuca arundinacea* infectada con el hongo endófito *Epichlōe coenophiala*. Esto explica que hayan sido reportados algunos brotes de intoxicación por el consumo de la misma, tanto en Uruguay, Argentina como el Sur de Brasil (Riet-Correa, 1993).

En Argentina, los antecedentes de toxicidad de la festuca se remontan al año 1972, cuando el grupo de Patología del INTA EAA Balcarce efectuó el primer diagnóstico de pie de festuca (Odriozola, 2002). En nuestro país, hasta 1991 no se habían presentado casos con síntomas clínicos de festucosis, pero probablemente podría haber pérdidas subclínicas por bajas ganancias de peso o producción de leche (Altier, 1991).

La morbilidad de la intoxicación varía en función de los diferentes cuadros clínicos, siendo del 25 al 70% en el caso del síndrome hipertérmico y del 6 al 80% en el pie de festuca, y por lo general, en ninguna de las dos presentaciones ocurren muertes espontáneas.

En los últimos años, la presentación de esta intoxicación se ha vuelto rara tanto en Uruguay como en Argentina, probablemente debido al uso de festuca mezclada con otras pasturas como trébol o raigrás, así como la comercialización de semillas libres de endófito con tasas de infección menores al 5%, que han sido tratadas con fungicidas o almacenadas durante 12 a 15 meses (Riet-Correa et al. 2013).

#### **4.4 Desarrollo de una nueva tecnología: “Endófitos Amigables”**

Debido a que la eliminación del endófito generó que la festuca redujera su persistencia, comenzó la búsqueda de nuevas cepas de *E. coenophiala* que produjeran pequeñas o nulas cantidades de ergo-alcaloides, pero sí alcaloides que incrementaran la tolerancia de la planta a plagas y a otros factores de estrés (Roberts & Andrae, 2004).

Por medio de análisis micológicos tradicionales, cromatografía de gas y HPLC se observó la amplia y variable diversidad de producción de alcaloides de pasturas infectadas con endófitos, siendo de gran interés algunas asociaciones donde no se detectó producción de ergo-alcaloides ni de lolitrem B (TePaske et al. 1993; Young et al. 2013). Sin embargo, en estudios posteriores se determinó que estas asociaciones previamente seleccionadas por sus características benéficas (como es la resistencia a insectos otorgada con las cepas endofíticas tóxicas), no siempre mostraron resultados consistentes (Hunt & Newman, 2005; Timper et al. 2005).

El desarrollo de la nueva tecnología de endófitos, se basó en la estrategia de superar la intoxicación por consumo de festuca, mediante el aislamiento de nuevas cepas endofíticas no tóxicas de origen natural (“nuevos endófitos o endófitos amigables”), y reinfectar cepas de cultivares elite (Bouton & Hopkins, 2003; Bouton & Easton, 2005). En esta estrategia las características agronómicas del cultivar se mantienen intactas, pero se elimina la toxicidad animal (Bouton & Easton, 2005). Para lograr esto se requiere obtener la mejor combinación cepa endófito-cultivo. Sin embargo, no todas las infecciones a nivel de cultivar han tenido éxito en la transmisión de semillas y/o en el rendimiento agronómico, requiriendo muchas pruebas

para identificar la mejor combinación. Bouton et al. (2002) reportaron que, en algunas combinaciones, la tasa de transmisión inicial fue solo del 43%, lo que indica que ciertas combinaciones no muestran una buena compatibilidad entre la cepa y el huésped. Hill & Roach (2009) observaron la viabilidad de diferentes endófitos en la semilla de un cultivar común de festuca y diferentes cultivares utilizando un endófito común, y si la viabilidad endófito durante el almacenamiento de semillas era un rasgo hereditario. El endófito novel AR542 fue insertado en diferentes cultivares de festuca que representaban diversos antecedentes genéticos (Parish et al. 2003b; Watson et al. 2004). La supervivencia de AR542 en la semilla varió mucho cuando se comparó en todos los cultivares (Hill & Roach, 2009). Estos resultados sugieren que existe una relación inherente entre la supervivencia de los endófitos y la genética de las plantas huésped, ya que todos los cultivares fueron tratados de la misma manera y las variables que pudieron crear diferencias durante el almacenamiento fueron controladas. Al comparar Jesup-AR542 y Jesup-AR584, AR584 fue 24% más viable en comparación con AR542 en el que se obtuvo 10% de viabilidad después de 18 meses de almacenamiento (Hill & Roach, 2009). Esto indica que además de una interacción de la cepa endófito-genética vegetal, también existe un efecto genotipo-endófito sobre la viabilidad de la semilla durante el almacenamiento. Es evidente que la utilización de nuevos endófitos para aliviar los efectos de la festucosis es una opción viable para los productores, pero también debe tenerse en cuenta la mejor combinación endófito-planta genotipo y la mejora de los rasgos agronómicos a través del cultivo tradicional de plantas (Hill & Roach, 2009).

El programa de endófitos llevado a cabo por Grasslanz Technology y AgResearch aísla endófitos de pasturas recolectadas de todo el mundo. Una vez que se identifica una cepa endofítica, se determina el espectro de compuestos químicos que produce y el impacto que éstos tienen sobre los insectos (comunicación personal, Dr. David Hume). Por otro lado, se realiza un análisis genético para determinar la génesis de producción de alcaloides de la cepa en cuestión. Las cepas endofíticas con una buena gama de tolerancia a los insectos se evalúan agronómicamente en una serie de ambientes y manejos diferentes. Los endófitos agronómicamente superiores a los endófitos estándar se someten a ensayos de seguridad y rendimiento de los animales, que deben añadirse a los protocolos de ensayo agronómico (comunicación personal, Dr. David Hume). Las respuestas de los animales a toxinas endofíticas de festuca que se utilizan en los protocolos de seguridad animal, pueden agruparse en cuatro categorías (Stuedemann & Thompson, 1993): i) disminución de la productividad, expresada en ganancia de peso, producción de leche y / o tasa de preñez; ii) cambios en el comportamiento, como la disminución del consumo y aumento de la ingesta de agua; iii) respuestas fisiológicas, tales como aumento de la temperatura rectal así como frecuencia respiratoria y iv) cambios en los niveles de componentes séricos o plasmáticos como disminución de la prolactina sérica y el colesterol. Generalmente se mide una o más de estas respuestas cuando se evalúa la toxicidad de la festuca (Stuedemann & Thompson, 1993; Bouton & Easton, 2005). Por lo tanto, los ensayos de seguridad para medir estas respuestas son caros y consumen muchos recursos, pero deben llevarse a

cabo para cualquier producto nuevo si se vende con la afirmación de no ser tóxico para el ganado. Las pruebas agronómicas para nuevas combinaciones de cepas reinfectedas con el cultivo deben ser rigurosas. Debe examinar los principales factores estresantes ambientales bióticos y abióticos para la región de interés (Hannaway et al. 2009; Belesky & West, 2009) utilizando controles (E+ y E-) y ser aplicados y probados de manera realista (Bouton & Easton, 2005).

Las cepas de *E. coenophiala* AR542 y AR584 fueron consecuentemente desarrolladas y han sido comercializadas en Estados Unidos, Nueva Zelanda y Australia, demostrando que los cultivares infectados con ellas tienen buen desempeño agronómico y mejoran la productividad animal sin generar festucosis (Hopkins et al. 2010). Al igual que con el endófito tóxico, Bouton et al. (2002) observaron, que había una amplia variabilidad en la habilidad de transmisión por semillas de estas cepas “nuevas”, por lo cual sugirieron la necesidad de realizar seguimientos para identificar las mejores combinaciones. Trabajos en colaboración evaluaron la supervivencia y la producción de materia seca en diferentes combinaciones de cultivares y cepas frente a versiones de los mismos cultivares con E+ y E-. La combinación de festuca Jesup + endófito AR542 fue la mejor, resultando en mejor supervivencia y rendimiento, además de no producir toxicidad en las ovejas (Bouton et al. 2002). Comercialmente la cepa endofítica AR542 es conocida en Estados Unidos como Jesup MaxQ (Pennington Seed Co., Madison, GA) y en Nueva Zelanda y Australia como MaxP (Grasslanz Technology Ltd. Palmerston North, Nueva Zelanda) que ha sido evaluada en pastoreo con ovejas (Parish et al. 2003a), novillos (Parish et al. 2003b), vacas con terneros al pie (Watson et al. 2004), entre otros. Paralelamente, en Arkansas (EUA), insertaron endófitos no productores de ergo-alcaloides (4 y 9) dentro de cultivares de festuca alta HiMag y lanzaron al mercado el “ArkPlus” (Sleper et al. 2002), que ha sido evaluado en ensayos de pastoreo midiendo su productividad y persistencia, así como el desempeño animal con novillos (Nihsen et al. 2004; Beck et al. 2008). Nihsen et al. (2004) observaron que novillos pastoreando HiMag4 y HiMag9 obtuvieron mayores ganancias de peso que aquellos que pastoreaban una festuca E+. Estos últimos tuvieron mayor frecuencia respiratoria, temperatura rectal y bajos puntajes de pelo en comparación con los primeros y con los que consumieron HiMag E-. Beck et al. (2008) obtuvieron resultados similares comparando Jesup AR542 y HiMag11 con K31 y otras pasturas anuales de clima frío en un estudio realizado durante 3 años.

En Uruguay, la festuca es la gramínea perenne invernal más usada (Formoso, 2011) pero se ha identificado como problema la baja persistencia en áreas extensivas ubicadas más que nada en el norte del país, donde las condiciones ambientales más restrictivas -principalmente altas temperaturas en verano- imposibilitan el buen desempeño de esta especie. La exploración de nuevos germoplasmas junto a la utilización de nuevos endófitos, podría ser una alternativa para reducir estas limitantes. Es por esto que a través de un proyecto de mejoramiento genético de INIA, se incorporó el endófito AR584 a nuevos genotipos de festuca liberados. Este es un aporte de fundamental importancia, particularmente en la obtención de cultivares de

festuca mejorados en persistencia, calidad y adaptación a zonas de alta temperatura. Esto representa una innovación en el desarrollo varietal del país y genera nueva información agronómica sobre los beneficios de esta tecnología. Es así que la evaluación de un nuevo endófito incluido en el cultivar INIA Fortuna, a través de este ensayo de seguridad animal, aporta a la validación de la tecnología bajo condiciones climáticas de Uruguay y en una nueva asociación planta-endófito.

#### **4.5 Efecto de los alcaloides en el control biológico de la mosca de los cuernos**

La mosca de los cuernos (*Haematobia irritans irritans*) es un díptero hematófago de distribución mundial que afecta principalmente vacunos en pastoreo causando importantes pérdidas económicas (Cupp et al. 2004). La mosca de los cuernos es considerada una de las ectoparasitosis que más afecta la producción de bovinos en condiciones de pastoreo (Byford et al. 1992). Altas cargas de moscas (por encima de las 200 moscas) están asociadas a pérdidas en la ganancia de peso, en la producción lechera y en la calidad de los cueros obtenidos (Guglielmone et al. 1999, Castro et al. 2008). En Uruguay fue diagnosticada por primera vez en 1991 (Carballo & Martínez, 1991) y hoy afecta todo el territorio nacional; además de ser considerada la segunda ectoparasitosis más importante que afecta el ganado bovino. El control de esta parasitosis, se realiza en base a la utilización de productos químicos (insecticidas), que son aplicados cuando la infestación es masiva (Guglielmone et al. 2002). Esto ha provocado que la *H. irritans* desarrolle resistencia a estos compuestos, disminuyendo la eficacia de los sistemas de control (Oyarzún et al. 2008). Es por esto, que comenzó la búsqueda de métodos alternativos de control, tales como trampas mecánicas y/o controladores biológicos, selección de animales resistentes o el desarrollo de vacunas (Tozer & Sutherst, 1996; Cupp et al. 2004).

Las grandes poblaciones de estas moscas hematófagas se encuentran la mayor parte del tiempo en la superficie dorsal de los bovinos, dejándolos durante unos instantes cuando las hembras oviponen en la materia fecal. En las heces bovinas, es donde se desarrollan los estadios larvarios de la mosca de los cuernos, que luego darán origen a nuevos insectos adultos.

La oferta de moscas a lo largo del año no es homogénea, fluctúa principalmente en respuesta a los cambios en el ambiente (temperatura y humedad) que afectan la sobrevivencia de estadios adultos y larvarios (Castro et al. 2008), así como por efectos de las respuestas inmunes de los hospedadores contra antígenos parasitarios (Breijo et al. 2016). Varios autores han descrito la ocurrencia de dos picos de oferta de moscas para nuestra región, uno a fines de la primavera y el segundo a principios de otoño (Guglielmone et al. 2002; Lima et al. 2002).

Los artrópodos con estadios larvarios en materia fecal, se alimentan de microorganismos del tracto gastrointestinal que pasan con las excretas (Hollis et al. 1985) y consecuentemente responden a las propiedades físicas y químicas de la materia fecal (Meyer et al. 1978; D'Amato et al. 1980). Basados en estos hechos, se han ensayado como medida de control de

desarrollo larvario, moléculas que son incluidas en la dieta de los bovinos que pasen sin ser modificados por el tracto gastrointestinal y se excreten en la orina o materia fecal (Miller, 1994).

Por otro lado, se sabe que la festuca con *E. coenophiala*, sintetiza alcaloides como lolina y peramina, que tienen actividad insecticida (Bush et al. 1993; Siegel & Bush, 1996). Los alcaloides consumidos por los bovinos pueden ser excretados por la orina (Stuedemann et al. 1998) y por la materia fecal (Westendorf et al. 1993). Por lo que se podría pensar que los alcaloides excretados por los animales que consumen festuca E+ podrían inhibir el crecimiento, desarrollo y supervivencia de las larvas que se encuentran en la materia fecal. Hay muy poca información disponible acerca de los efectos de los alcaloides en el control de parásitos en los animales. Dougherty et al. (1998), demostraron que extractos de N-acetil lolina a una concentración superior a 100 µg/g incorporados en la materia fecal de bovinos, causaron 100% de mortalidad de larvas de la mosca de los cuernos. Estos mismos investigadores (Dougherty et al. 1999) reportaron que cuando las moscas de los cuernos son expuestas a materia fecal bovina suplementada con N-formil lolina y ergotamina hay un descenso en el número de pupas recuperadas. De forma similar, Parra et al. (2013) han sugerido que el consumo de festuca Kentucky 31 reduce la presencia de ectoparásitos como la mosca de los cuernos, demostrando una reducción en la carga de moscas adultas y el desarrollo larvario de las moscas cultivadas en heces de bovinos.

Dado el impacto económico de este ectoparásito en nuestro país y la región (De Souza e al. 2005), el estudio de la interacción festuca/endófito-animal-ectoparásito se considera de relevancia e innovador.

## 5. CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA

En nuestro país, las pasturas continúan siendo la base de la alimentación de los rodeos en los distintos sistemas productivos. En los últimos años, ha habido una expansión del área agrícola, con el corrimiento de las áreas de pasturas desde suelos de mayor aptitud agrícola a zonas de menor potencial, lo que genera un nuevo escenario productivo con ciertas limitantes a superar: pobre persistencia de las pasturas y necesidad de incrementar la productividad. Sumado a esto, la aceleración del fenómeno del calentamiento global y por consiguiente el cambio del clima, orienta a que las futuras alternativas incluyan la capacidad de resistir altas temperaturas, eventos extremos de sequías y excesos hídricos (Informe final MGAP, 2011).

Como es ampliamente conocido, la presencia de hongos endófitos en algunas pasturas, particularmente el *Epichlöe coenophiala* en la *Festuca arundinacea*, a partir de la producción de alcaloides, hace que la misma tenga una excepcional performance agronómica, así como tolerancia a la presión de pastoreo y alta persistencia (Lacefield et al. 2004). En condiciones de pastoreo, algunos alcaloides producidos por el *E. coenophiala* pueden ser positivos desde el punto de vista agronómico, pero otros alcaloides pueden resultar en una serie de trastornos de origen animal (Oliver, 1997). Es por esto que surge la necesidad de evaluar el efecto de pasturas con endófitos selectos sobre la fisiología y performance animal. En la búsqueda de nuevas asociaciones simbióticas menos perjudiciales para el ganado, se han identificado y patentado nuevos hongos endófitos (AR542 y AR584 en festuca) capaces de producir solamente los alcaloides que poseen efectos benéficos sobre las plantas (Roynance et al. 1994; Scharld & Panaccione, 2005), quedando demostrado que estas asociaciones mejoran la productividad, reducen el ataque de fitoparásitos (Bouton et al. 1993) y no afectan la salud de los animales que la consumen (Parish et al. 2003b). Por otro lado, cada nueva interacción festuca-endófito se comporta de manera diferente en función de las condiciones climáticas y edáficas (Malinowski et al. 1998). Es por esto que se necesita llevar a cabo un ensayo de seguridad animal que permita evaluar los beneficios y riesgos de la interacción bajo condiciones edafoclimáticas de nuestro país en un ensayo de pastoreo durante un año.

Además de las ventajas en la inclusión de endófitos en la *F. arundinacea* por la protección que le provee a la planta frente al ataque de parásitos, se ha sugerido que el consumo de festuca Kentucky 31 reduce la presencia de ectoparásitos como la mosca de los cuernos, demostrando una reducción en la carga de moscas adultas y el desarrollo larvario de las moscas cultivadas en heces de bovinos (Parra et al. 2013). Esta información nos alienta a conocer si el consumo de festuca asociada a nuevos hongos endófitos conserva esta propiedad de regulación parasitaria a través del consumo de alimentos.

En suma, el presente proyecto plantea el estudio de los efectos sobre la fisiología de los bovinos al consumir esta nueva asociación de festuca-endófito (*Festuca arundinacea* cv Fortuna con el hongo endófito AR584)

cuando es cultivada bajo condiciones ambientales de Uruguay. Paralelamente se analizarán los posibles efectos benéficos en el control de la mosca de los cuernos.

## 6. HIPOTESIS

El consumo de la asociación *Festuca arundinacea* cv. Fortuna y el endófito AR584 no genera efectos negativos en los parámetros fisiológicos ni en el desempeño productivo de los bovinos y colabora en el control de las formas adultas y larvarias de la mosca de los cuernos.

## 7. OBJETIVOS

### 7.1 Objetivo general

Contribuir al conocimiento del efecto de endófitos novel asociados a la festuca Fortuna, su impacto en la ganancia de peso vivo y parámetros fisiológicos de novillos y su asociación con el desarrollo de la mosca de los cuernos.

### 7.2 Objetivos Específicos

- 1) Determinar la concentración de los diferentes alcaloides (peramina, lolina y ergovalina) en festuca con y sin endófito novel AR584 (Fo+ y Fo- respectivamente) y con endófito salvaje tóxico (K31, control positivo) y la concentración urinaria de ergo-alcaloides en los animales de los diferentes tratamientos.
- 2) Determinar los parámetros clínicos (temperatura corporal y frecuencia respiratoria) y paraclínicos (concentración de enzimas hepáticas, urea, creatinina, colesterol y prolactina en suero) así como también el peso vivo de novillos consumiendo *ad libitum* las diferentes variedades de festuca.
- 3) Determinar la carga de moscas adultas en los novillos y evaluar la sobrevida de los estadios larvarios en las heces frescas de los animales de cada tratamiento.

## 8. MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los procedimientos que involucraron el uso de animales fueron aprobados por la Comisión de Ética en el Uso de Animales de INIA (nº expediente: INIA 2014.30). El trabajo de campo se llevó a cabo en la Unidad Experimental Palo a Pique (UEPP) perteneciente a INIA Treinta y Tres, Uruguay (33° 16' S, 54° 29' O), desde el 19 de noviembre de 2013 hasta el 12 de diciembre de 2014.

Los datos de precipitación (mm) (figura 6A), temperatura del aire (TA, °C) y humedad relativa (HR, %) (figura 6B) se recabaron a partir de una estación meteorológica (Marca CampbellSci) ubicada en el sitio experimental (33°15'S 54°29'O), desde noviembre de 2013 a diciembre de 2014. Con los registros de TA y HR de los días donde se realizaron las determinaciones en los animales a lo largo del año experimental, se calculó el Índice de Temperatura-Humedad (ITH) a través de la ecuación desarrollada por Thorn (1959):  $ITH = (0,8 \times \text{temperatura media del aire}) + (\% \text{ humedad relativa}/100) \times (\text{temperatura media del aire} - 14,4) + 46,4$ .

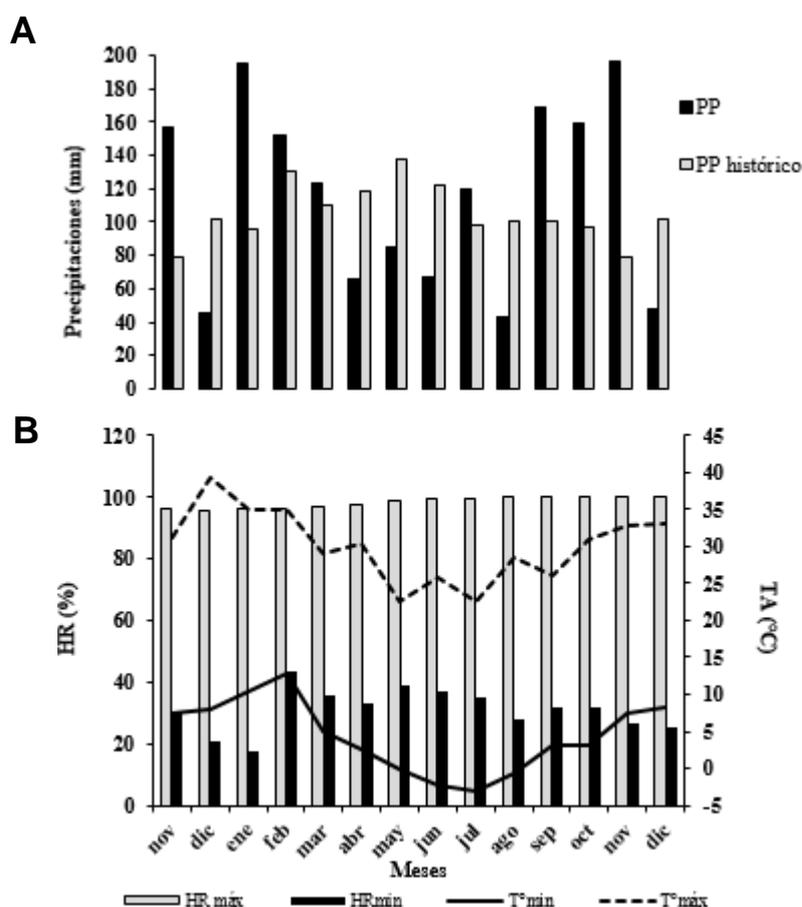


Figura 6. A: Precipitaciones (PP, mm) durante el año experimental (nov/13-dic/14) e histórico de precipitaciones (1991-2013) (PP histórico, mm), B: Temperatura Ambiente (TA, °C) mínima y máxima, y Humedad Relativa (HR, %) mínima y máxima registradas desde noviembre de 2013 a diciembre de 2014 en la UEPP

## 8.1 Diseño experimental

### 8.1.1 Pasturas

A fines de abril de 2013, se establecieron tres cultivares de *Festuca arundinacea* pura: Fo+ (con endófito AR584), Fo- (sin endófito, control negativo) y K31 (endófito salvaje tóxico, control positivo) sobre un área de 14,4 ha. La densidad de siembra promedio fue de 13,0 kg/ha para los tres tratamientos, la fertilización inicial de 150 kg/ha con NPK (triple 15), y posteriormente se fertilizó con urea a razón de 100 kg/ha una vez por estación, en los meses de enero, abril, junio y setiembre. El nivel de infección de endófitos en cada variedad de festuca, se determinó el 12 diciembre de 2013 y el 7 mayo de 2014 a través del blotting test (Gwinn et al. 1991), a partir de 100 macollos tomados al azar en cada parcela. Para la determinación de alcaloides en planta, cada 10 días a partir de abril hasta noviembre, se tomaron muestras de 40 g de forraje disponible que fueron liofilizadas, molidas a través de una malla de 1mm y mantenidas a -20°C hasta su posterior análisis (Baldauf et al. 2011). El diseño experimental fue bloques al azar con 4 repeticiones, siendo el tamaño de cada unidad experimental de 1,2 ha (figura 7). Al momento del ingreso y salida de los animales de cada parcela, se determinó disponibilidad y remanente de forraje. Para ello se midió la altura del forraje mediante una regla en 4 puntos dentro del cuadro y posteriormente se realizaron cortes con tijera eléctrica al ras en cada parcela en 6 cuadros de 50 x 20 cm colocados al azar.

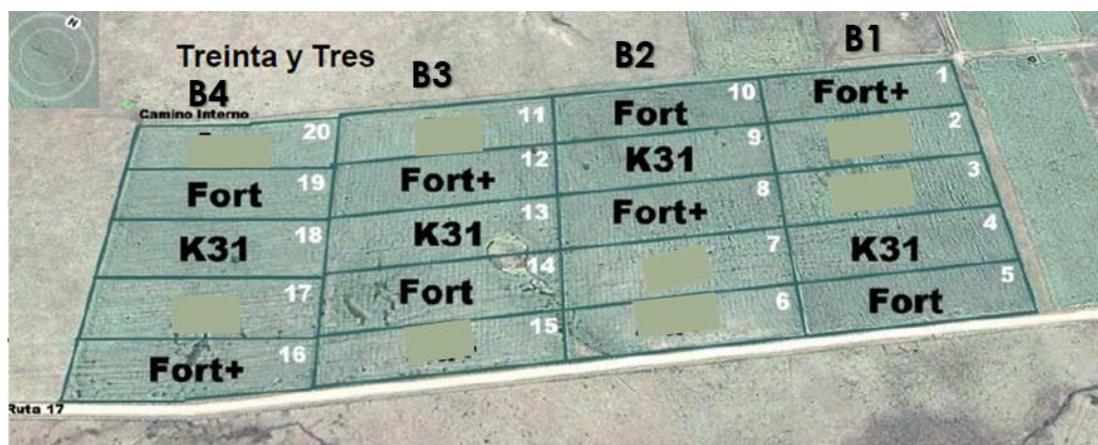


Figura 7: Plano del ensayo instalado. K31: festuca cv Kentucky 31, endófito salvaje tóxico; Fo+: festuca cv Fortuna con endófito AR584; Fo-: festuca cv Fortuna sin endófito. B1: bloque 1, B2: bloque 2, B3, bloque 3, B4, bloque 4.

### 8.1.2 Animales

Previo al inicio del ensayo, los animales fueron desparasitados e inmunizados contra enfermedades clostridiales y carbunco bacteridiano. La carga de endoparásitos fue monitoreada a través del conteo de huevos en heces de los bovinos, siendo siempre <100 hpg.

La elección de los animales se realizó en función de trabajos previos que reportaron que novillos de sobre año son animales en crecimiento y por lo tanto son más susceptibles a cambios en la calidad nutricional (Paterson et al. 1995). Por otra parte, bovinos de capa negra (Breijo et al. 2013) y machos (Franks et al. 1963; Rodriguez-Gallegos & Acosta-Rodriguez, 2011) son más parasitados por la mosca de los cuernos que los animales de capa clara y hembras.

De un total de 60 novillos cruza británico, de biotipo carnívor, capa negra, entre 12 y 18 meses de edad, fueron seleccionados 21 animales de peso vivo homogéneo (promedio de  $198 \pm 20$  kg). Los mismos se asignaron al azar a cada uno de los tratamientos (Fo+, n=7; Fo-, n=7; K31, n=7). Se mantuvo un grupo adicional de animales (Fo+, n=13; Fo-, n=13; K31, n=13) que fueron utilizados como volantes (“put and take”) en los meses de febrero a julio y de octubre a diciembre, a los efectos de mantener una oferta de forraje mínima de 1800 kg/ha de MS (Allen et al. 2011). Los animales se mantuvieron en cada parcela con acceso a agua, forraje *ad libitum* y sin sombra. El manejo del pastoreo se realizó en forma rotativa a lo largo de los cuatro bloques, con períodos de pastoreo de 10 días en cada parcela y descansos de 30 días.

La evaluación de la ganancia diaria de peso (GDP) a través del registro del peso vivo (PV) de los animales de cada tratamiento, se determinó cada 20 días desde el 19 de noviembre de 2013 hasta el 10 de diciembre de 2014. Los animales se pesaron bajo ayuno previo de 12 h, utilizando una balanza electrónica (marca Tru-Test, modelo EW6), comenzando el registro a las 8:00 h.

Además, todos los animales fueron evaluados desde el 10 de diciembre de 2013 a intervalos de 20 días en verano (diciembre-enero-febrero) y otoño (marzo-abril-mayo), 40 días en invierno (junio-julio-agosto) y 30 días en primavera (setiembre-octubre-noviembre) (figura 8) a través de la determinación de la temperatura corporal, frecuencia respiratoria, enzimas hepáticas, urea, creatinina, colesterol y prolactina en suero y ergo-alcaloides en orina de la siguiente forma:

- 1- El registro de la temperatura corporal se realizó a través de la medición de la temperatura rectal (TR) utilizando un termómetro digital y colocando los animales dentro del tubo. Además, se registró la temperatura subcutánea (TSC), para lo cual se seleccionaron al azar tres novillos de cada tratamiento, a los que se les implantó en la parrilla costal, un dispositivo de TSC-grabación automática de temperatura (iButtonR127, Maxim Integrated, Texas, EUA) desde el 21 de febrero al 3 de abril de 2014. Para ello, luego de realizar tricotomía y embrocado del campo quirúrgico, se procedió a realizar una anestesia infiltrativa en la línea de incisión con lidocaína al 2%, una incisión de 3 cm de largo y la colocación subcutánea del dispositivo. La sutura de piel se realizó con puntos simples y con material absorbible (Vicryl n°1). Se realizó antibióticoterapia preventiva con oxitetraciclina a una dosis de 20 mg/kg. Los dispositivos se

colocaron por un período de 42 días, pero se programó el registro para 10 días cada 60 minutos. Terminado dicho período, se extrajo el dispositivo utilizando el mismo procedimiento antes descrito.

- 2- La frecuencia respiratoria (FR) se registró en el tubo contando los movimientos de la pared torácica por un período de 60 segundos. Tanto la FR como la TR se determinaron a partir de las 16:00 h.
- 3- Las muestras de sangre se obtuvieron por punción de la vena yugular, colocadas en tubos secos de 9 mL. A partir de muestras de suero se determinó la concentración de enzimas hepáticas, urea, creatinina, colesterol y prolactina (PRL).
- 4- A los efectos de determinar la concentración urinaria de ergoalcaloides, las muestras de orina se obtuvieron a partir de la micción espontánea de tres animales por tratamiento seleccionados al azar, colectándola a través de un calderín y una bolsa de nylon. Fueron almacenadas en un frasco estéril hasta su llegada al laboratorio.

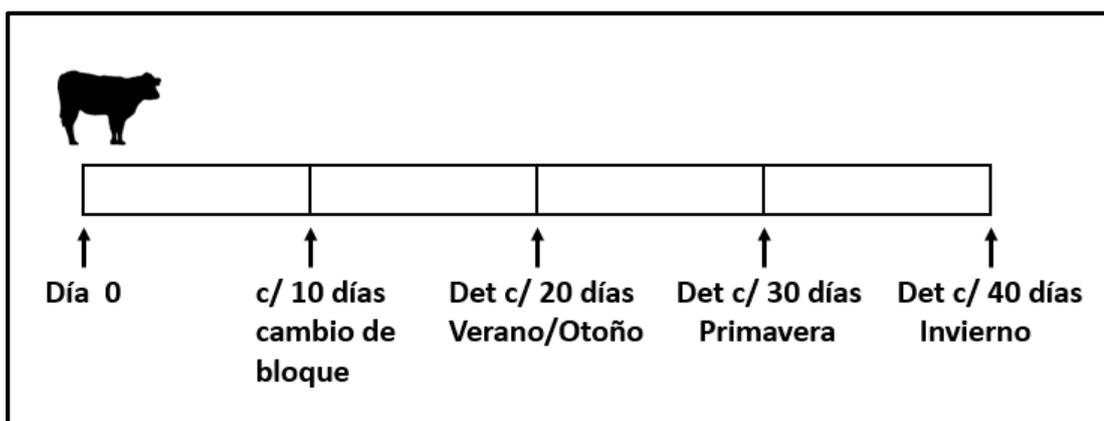


Figura 8: Esquema del diseño experimental en los animales. Intervalos en días (20,30 y 40) de las determinaciones (Det) de parámetros clínicos y paraclínicos en función de la estación del año.

### 8.1.3 Mosca de los cuernos

La carga de moscas de los cuernos en los novillos se monitoreó en cada tratamiento, cada 10 días (desde el 19 de noviembre del 2014 al 5 de mayo del 2015), a través de tres registros fotográficos de la región dorso lateral de los mismos desde la cabeza a la base de la cola, tomados entre las 7:00 y 10:30 h (Breijo et al. 2013).

La capacidad de desarrollo larvario de la mosca de los cuernos en heces de bovinos pertenecientes a los diferentes tratamientos, fue monitoreada el 31 de diciembre del 2013, el 6 de febrero y 20 de marzo del 2014. Para ello, una porción de moscas de los cuernos presentes en el rodeo, fueron capturadas usando redes entomológicas y colocadas al azar en jaulas colocadas sobre un medio de heces bovinas pertenecientes a cada uno de

los tratamientos (tres repeticiones en cada tratamiento: Fo+, n=3; Fo-, n=3; K31, n=3) según lo descrito por Breijo et al. (2013).

## **8.2 Determinación del forraje disponible, remanente y su composición química**

Cada una de las 6 muestras de forraje/parcela, fueron pesadas individualmente para determinar su peso verde. Luego se mezclaron para obtener un “bulk”, y se tomaron dos submuestras al azar. Una se secó en estufa de aire forzado a 60°C durante 48 h para determinar el porcentaje de materia seca (% MS). Todas las muestras obtenidas en enero, abril, julio y octubre de 2014 (un mes por cada estación del año), fueron enviadas al Laboratorio de Nutrición perteneciente a INIA La Estanzuela, para determinar la composición química de las mismas (Digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIV); Proteína cruda (PC); Fibra Detergente Neutro (FDN) y Fibra Detergente Ácido (FDA)). La segunda submuestra, de al menos 100 g de forraje verde, se utilizó para realizar la composición botánica separando las principales fracciones (festuca y resto).

La concentración de alcaloides presentes en cada una de las variedades a lo largo del año, se determinó por HPLC (Barker et al. 1993) en el Laboratorio de Plantas y Química de Endófitos de AgResearch (Palmerston North, Nueva Zelanda). Para ello previamente se tomó una submuestra de forraje que fue liofilizada y posteriormente molida en un molino tipo Willey (malla 1 mm). En función de experiencias previas y en base al trabajo de Takach & Young (2014), quienes secuenciaron el genoma del endófito AR584, los técnicos responsables de este laboratorio, decidieron realizar la determinación de ergovalina en todas las muestras de forraje de K31, pero en sólo 4 muestras (obtenidas el 7,17 y 27 de octubre y el 6 de noviembre) de Fo+ y Fo-.

## **8.3 Evaluación de parámetros fisiológicos y ganancia de peso vivo de los novillos consumiendo las diferentes variedades de festuca**

Las muestras de sangre obtenidas fueron centrifugadas por 5 minutos a 5000 rpm (20°C) y el suero obtenido se almacenó a -20°C hasta su posterior análisis. La evaluación del enzimograma hepático se realizó a través de la determinación en suero de las enzimas Fosfatasa Alcalina Sérica (FAS), Aspartato-Aminotransferasa (AST), Alanino-Aminotransferasa (ALT) y Gamma-glutamil transpeptidasa (GGT), y los niveles de urea y creatinina, con kits y controles comerciales de Wiener Lab (Rosario, Argentina) utilizando un espectrofotómetro Vitalab Selectra en el Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal de Facultad de Veterinaria (UDELAR). Los coeficientes de variación intra-ensayo para todas las enzimas y metabolitos fue menor al 5%. Los niveles de colesterol sérico se determinaron por el mismo procedimiento descrito anteriormente. La determinación de prolactina se realizó por radioinmunoanálisis (RIA), en el Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME, Buenos Aires, Argentina) utilizando un kit proporcionado por el Dr. Parlow del Instituto Nacional de Diabetes y Enfermedades Digestivas y Renales (INDDR, Rockville, Maryland, EUA). Se utilizaron anti-anticuerpos ovinos,

previamente validando la técnica para bovinos (Díaz et al. 2001). La sensibilidad del ensayo fue de 3,2 ng/mL y los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron 6 y 11% respectivamente.

Las muestras de orina obtenidas se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento. La determinación de ergo-alcaloides en orina se realizó en la Unidad de Reactivos y Biomodelos de Experimentación (URBE), Facultad de Medicina, UdelaR utilizando un Kit de ELISA comercial (Agrinostics test, EUA). Además, se determinó la concentración urinaria de creatinina. Esta concentración fue determinada en un espectrofotómetro Vitalab Selectra en el Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal de Facultad de Veterinaria (UdelaR), utilizando kits y controles comerciales de Wiener Lab (Rosario, Argentina). La concentración urinaria de ergo-alcaloides se calculó como nanogramos de alcaloide por miligramo de creatinina para tener en cuenta la variación en la concentración de orina.

#### **8.4 Evaluación de las cargas adultas de la mosca de los cuernos y efectos en el desarrollo larvario de la mosca de los cuernos en heces de novillos alimentados con festuca**

El análisis de las imágenes tomadas en la región dorso-lateral de los novillos para obtener el número final de moscas, se realizó utilizando el software Image J (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

La porción de moscas capturadas y enjauladas, se utilizaron para evaluar el efecto de los alcaloides en el desarrollo larvario. Para esto se prepararon medios de cultivo de larvas de moscas según lo descrito previamente por Breijo et al. (2013). Estos medios utilizaron una mezcla de heces frescas provenientes de diferentes novillos involucrados en cada uno de los tres tratamientos. En ellos se evaluó la sobrevivencia de los estadios larvarios a través del conteo de pupas obtenidas. El número de pupas de cada repetición se corrigió en función del número de moscas presentes en cada jaula.

#### **8.5 Análisis estadístico**

Teniendo en cuenta que el pastoreo de los animales se realizó por bloques de pasturas, el análisis estadístico de la disponibilidad y remanente de forraje y su composición química, se analizaron de forma independiente para cada bloque. El mismo se analizó por estación a través de un Proc GLM (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA), utilizando las 6 submuestras de forraje disponible y remanente como repeticiones.

Para el análisis de la concentración de alcaloides en planta, se utilizó el procedimiento Proc Mixed del paquete estadístico SAS (Institute Inc., Cary, NC, EUA), con un modelo que incluyó como efectos fijos el tratamiento, las observaciones e interacciones, y como efecto aleatorio el bloque.

Para evaluar el efecto de los diferentes tratamientos (K31, Fo+ y Fo-) sobre el peso vivo, la temperatura rectal y subcutánea, la frecuencia respiratoria, la concentración de ergo-alcaloides en orina, prolactina, colesterol, urea, creatinina, enzimas hepáticas y la viabilidad de las larvas se utilizó el procedimiento Proc Mixed del paquete estadístico SAS (Institute Inc., Cary, NC, EUA), con un modelo que incluyó como efectos fijos el tratamiento, las observaciones e interacciones. El novillo se consideró como un efecto aleatorio dentro del tratamiento.

En función de los picos de oferta de moscas descritas para nuestra región (el primero a fines de primavera y el segundo a principios de otoño), la carga de moscas en los individuos se analizó en dos períodos. El período 1: desde el 19 de noviembre al 19 de diciembre de 2013 y el período 2 desde el 30 de diciembre al 30 de mayo. En cada período, se utilizó el procedimiento Proc Mixed del paquete estadístico SAS (Institute Inc., Cary, NC, EUA), con un modelo que incluyó como efectos fijos el tratamiento, las observaciones e interacciones. El novillo se consideró como un efecto aleatorio dentro del tratamiento. El peso vivo se incluyó como covariable.

En todas las variables estudiadas, se compararon las medias por mínima diferencia significativa ( $\alpha \leq 0,05$ ).

## 9.RESULTADOS

### 9.1 Pasturas

#### 9.1.1 Presencia y porcentaje de infección del endófito

Las festucas con endófito salvaje tóxico (K31) y con endófito AR584 (Fo+) presentaron la casi totalidad de los macollos infectados, mientras que la festuca sin endófito (Fo-) no los presentó (Cuadro I).

Cuadro I. Porcentaje de infección del endófito (100 macollos por parcela) en festuca con endófito salvaje tóxico (K31), con endófito AR584 (Fo+) y sin endófito (Fo-) en verano y otoño.

Bloque	Tratamientos					
	K31		Fo+		Fo-	
	Dic/13	Mayo/14	Dic/13	Mayo/14	Dic/13	Mayo/14
1	98	91	99	98	0	1
2	98	96	93	99	0	1
3	96	97	97	90	0	1
4	96	93	96	96	1	0
Promedio	97	94	96	96	0	1

#### 9.1.2 Presencia y concentración de alcaloides en planta

De las muestras de forraje disponible que se obtuvieron en cada cambio de bloque, se realizó la determinación de peramina, lolina total y ergovalina. Las concentraciones de estos tres alcaloides en Fo- fueron indetectables (por lo que no se muestra este tratamiento en la figura 9). Lo mismo ocurrió con la ergovalina en el caso de Fo+ que también fue indetectable. Por otro lado, los tres alcaloides estuvieron presentes en K31.

Como puede observarse en la figura 9A, la concentración de peramina fue diferente entre los tratamientos ( $P < 0,001$ ), pero no hubo efecto de la observación ( $P = 0,2926$ ), ni interacción entre ambos ( $P = 0,2536$ ). La concentración de este alcaloide en K31 fue mayor que en Fo+ ( $2,66 \pm 0,22$  ppm vs  $1,48 \pm 0,22$  ppm respectivamente,  $P < 0,001$ ). Esto ocurrió en todas las observaciones a excepción de las muestras obtenidas en abril y octubre, donde no hubo diferencias entre los tratamientos. Además, nótese que la concentración de este alcaloide en ambos tratamientos, no varió a lo largo del período de estudio, a no ser en K31 donde se observa un aumento en el mes de noviembre, donde se obtiene la mayor concentración.

Las concentraciones de lolina total en K31 fueron mayores ( $P < 0,001$ ) que en Fo+ (Figura 9B), estuvieron afectadas por las observaciones ( $P = 0,003$ ) y la interacción entre los tratamientos y las observaciones ( $P = 0,0018$ ). Las mayores concentraciones de lolina total en K31 se observaron en los meses de mayo y noviembre y la menor concentración en el mes de junio. Se puede apreciar un aumento importante en el mes de noviembre. A diferencia de

K31, la concentración de lolina total en Fo+ se mantuvo constante durante todo el año, encontrándose en promedio valores de 115 ppm.

En la figura 9C, se observa que la concentración de ergovalina en K31 fluctuó entre 0,36 ppm en agosto (invierno) y 0,76 ppm en noviembre (primavera), no hubo un efecto de la observación ( $P=0,3853$ ), por lo que no se encontró un patrón estacional marcado.

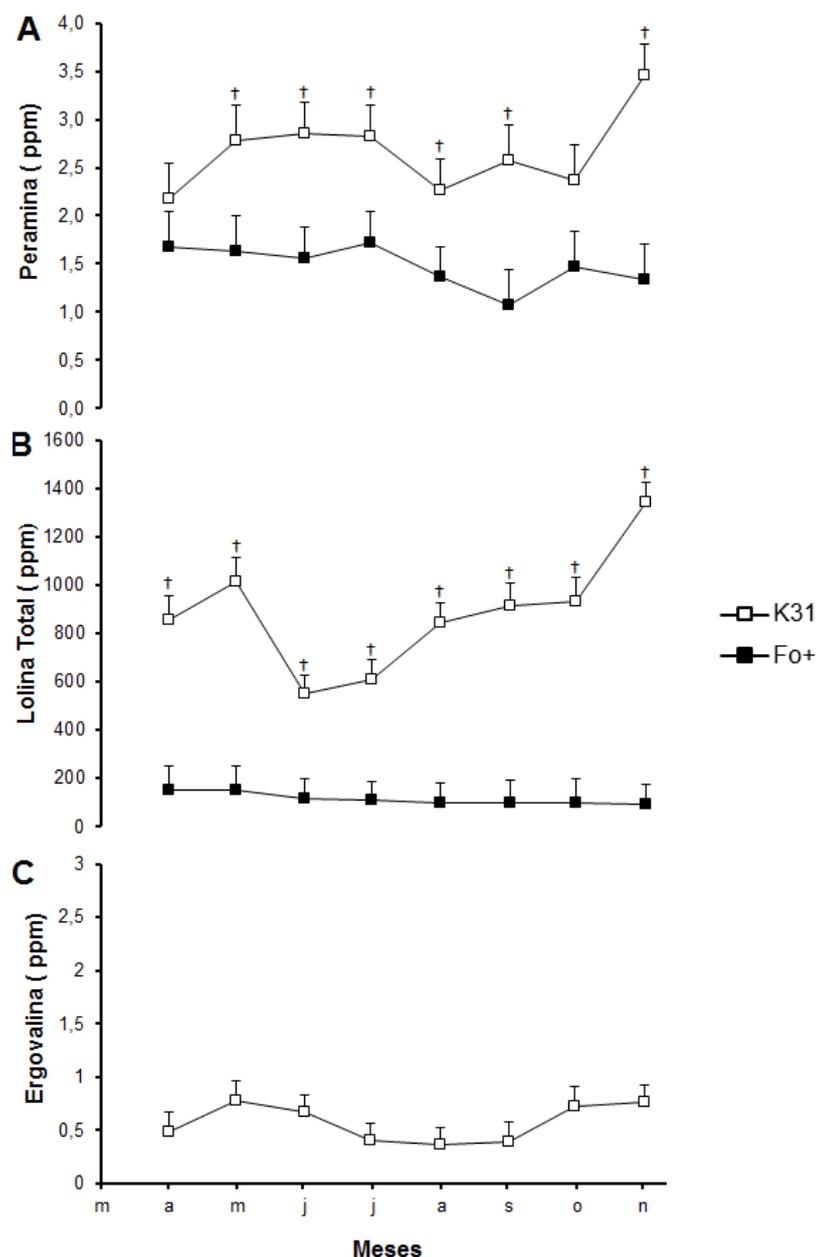


Figura 9. Concentración de alcaloides en planta (expresado en ppm) en muestras de K31 (festuca cv Kentucky 31, endófito salvaje tóxico) y Fo+ (festuca cv Fortuna con endófito AR584) expresadas como promedio de las observaciones realizadas en el mes, desde fines de marzo a fines de noviembre del año experimental. A: Peramina; B: Lolina Total y C: Ergovalina. † $P<0,05$  entre K31 y Fo+.

### 9.1.3 Forraje disponible, remanente y composición química

No se encontraron diferencias entre los tratamientos para materia seca total (MST) disponible o remanente, ni para altura del disponible y del remanente; la estación afectó todas las variables, excepto la MST disponible y en ningunas de las variables la interacción fue significativa (cuadro II).

La MST remanente fue mayor en verano y menor en invierno (datos no mostrados), no encontrándose diferencias en primavera y otoño, teniendo valores intermedios de producción. La altura disponible fue mayor en primavera y otoño, menor en invierno, e intermedia en verano. La altura remanente, fue mayor en primavera, menor en invierno e intermedia en verano y otoño.

Cuadro II. Forraje disponible y remanente de festuca con endófito salvaje tóxico (K31), con endófito AR584 (Fo+) y sin endófito (Fo-) a lo largo del año de ensayo (nov/13 a dic/14).

	Tratamiento				P	
	K31	Fo+	Fo-	Tto <sup>1</sup>	Est <sup>1</sup>	Tto*Est
MSTd <sup>1</sup> (kgMS/ha)	3190	3267	3492	0,9296	0,5379	0,9968
MSTr <sup>1</sup> (kgMS/ha)	2524	2866	2711	0,8739	***	0,9944
Altura d <sup>1</sup> (cm)	19,8	20,0	21,6	0,8185	***	0,9943
Altura r <sup>1</sup> (cm)	12,8	12,4	13,3	0,6814	***	1,0

<sup>1</sup>Tto= tratamiento; Est= estación; MSTd= Materia Seca Total disponible; MSTr= Materia Seca Total Remanente; Altura d= altura disponible; Altura r= altura remanente.

No se encontraron diferencias en la DIV, FDA y FDN entre los diferentes tratamientos, sin embargo, la PC en K31 tendió a ser mayor que en las otras pasturas (cuadro III).

Cuadro III. Composición química de festuca con endófito salvaje tóxico (K31), con endófito AR584 (Fo+) y sin endófito (Fo-) (Media ± EE).

%	Tratamiento			P
	K31	Fo+	Fo-	
DIV <sup>1</sup>	61 ± 0,72	63 ± 0,72	62,9 ± 0,72	0,1020
PC <sup>1</sup>	13,7 ± 0,38 <sup>a</sup>	12,6 ± 0,38 <sup>b</sup>	12,4 ± 0,38 <sup>b</sup>	0,0516
FDA <sup>1</sup>	39,7 ± 1,10	38,6 ± 1,10	38,3 ± 1,10	0,6422
FDN <sup>1</sup>	62,2 ± 0,52	62,8 ± 0,52	63,3 ± 0,52	0,3588

<sup>a-b</sup> Diferentes letras superíndice indica diferencia significativa dentro de una misma fila (P<0,05)

<sup>1</sup>DIV= Digestibilidad in vitro; PC= Proteína Cruda; FDA= Fibra Detergente Ácido; FDN= Fibra Detergente Neutro

## 9.2 Animales

### 9.2.1 Concentración de ergo-alcaloides en orina

La concentración urinaria de ergo-alcaloides fue afectada por los tratamientos (P<0,001), los días de observación (P=0,0045) pero no hubo interacción entre ambos (P= 0,2434) (Figura 10).

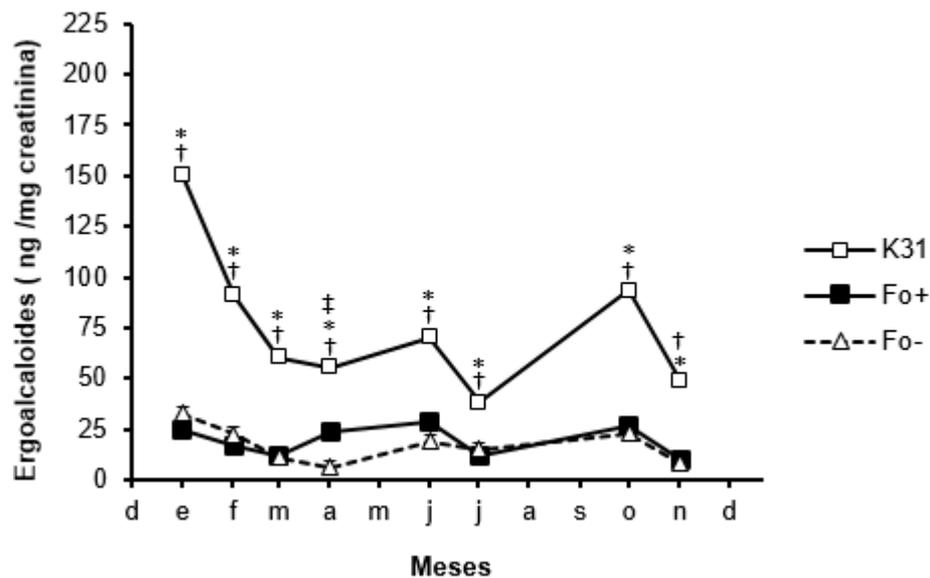


Figura 10. Concentración urinaria de ergo-alkaloides (expresados en ng en función de los mg de creatinina) a largo del período de estudio (meses), de los diferentes tratamientos (K31: festuca cv Kentucky 31, endófito salvaje tóxico; Fo+: festuca cv Fortuna con endófito AR584; Fo-: festuca cv Fortuna sin endófito); †P<0,05 entre K31 y Fo+; \*P<0,05 entre K31 y Fo-; ‡P<0,05 entre Fo+ y Fo-).

La concentración urinaria de ergo-alkaloides fue mayor ( $P<0,001$ ) en los animales de K31 (76,9 ng/mg creatinina) que en los animales que consumían Fo+ (18,1 ng/mg creatinina) y Fo- (15,2 ng/mg creatinina), no encontrándose diferencias entre estos. Si bien la interacción entre tratamiento y observación no fue significativa, en la comparación de medias Fo+ presentó mayor concentración de ergo-alkaloides urinarios que Fo- en abril (24,1 ng/mg creatinina vs 6,1 ng/mg creatinina respectivamente,  $P<0,05$ ).

Los animales que consumían K31 presentaron variaciones estacionales marcadas. La concentración más elevada de ergo-alkaloides fue en enero (151 ng/mg creatinina) y luego disminuyó drásticamente hasta marzo. Un pico de menor intensidad se observó en octubre (93,3 ng/mg creatinina). En el caso de los novillos que consumían Fo+ y Fo-, no se observó un patrón estacional, ni fluctuaciones importantes durante el período de estudio, pero se encontraron concentraciones más altas en enero, junio y octubre.

### 9.2.2 Concentraciones de Prolactina Sérica

Las concentraciones de PRL de los novillos que consumían Fo+ y Fo- fueron mayores que los novillos consumiendo K31 ( $P<0,001$ ) (Figura 11). Las concentraciones de PRL también estuvieron afectadas por las observaciones y la interacción entre los tratamientos y las observaciones, ( $P<0,001$ ). Las concentraciones de PRL en K31 descendieron a partir de enero, para mantenerse en valores indetectables hasta julio, comenzando a subir en setiembre en pequeñas cantidades hasta diciembre. Los tratamientos Fo+ y Fo- presentaron una gran variabilidad a lo largo del año, observándose los valores más bajos durante el otoño e invierno y los más altos en primavera.

Estos tratamientos difirieron entre sí, ya que los animales de Fo- presentaron mayor concentración sérica de PRL que los animales de Fo+ en julio.

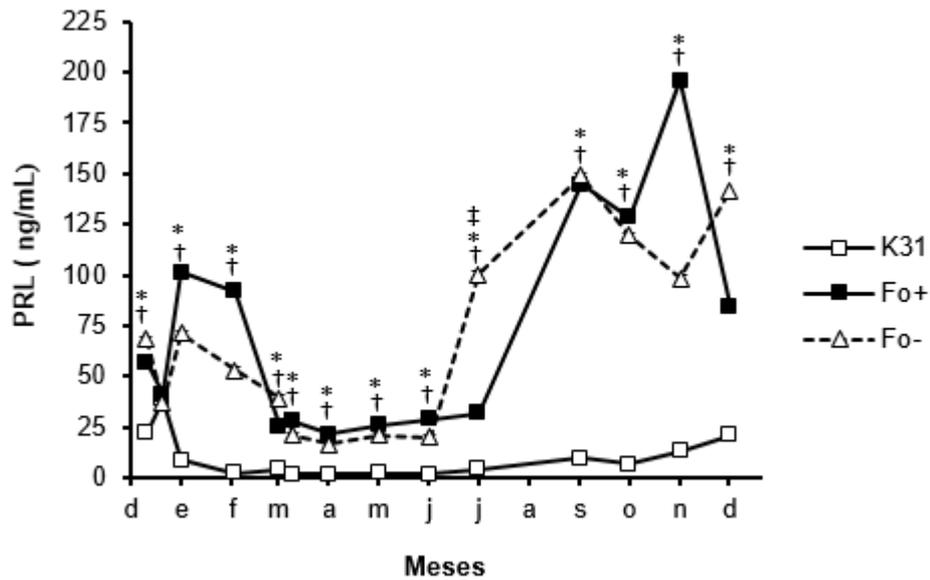


Figura 11: Concentración sérica de prolactina (PRL) durante el año de ensayo de los diferentes tratamientos (K31: festuca cv Kentucky 31, endófito salvaje tóxico; Fo+: festuca cv Fortuna con endófito AR584; Fo-: festuca cv Fortuna sin endófito); †P<0,05 entre K31 y Fo+; \*P<0,05 entre K31 y Fo-; ‡P<0,05 entre Fo+ y Fo-).

### 9.2.3 Bioquímica sérica

En el cuadro IV se presentan los datos de concentración sérica de colesterol, metabolitos renales y enzimas hepáticas de los diferentes tratamientos, así como los rangos de referencia manejados en este ensayo. El valor presentado representa la media de cada analito para todas las determinaciones realizadas a lo largo del año. Los patrones de cambio en el tiempo de cada uno de éstos, se representan en sus figuras respectivas.

Cuadro IV. Concentración sérica de colesterol, metabolitos renales y enzimas hepáticas de novillos consumiendo festuca con endófitos (Media  $\pm$  EE)

	Tratamiento <sup>1</sup>			Rangos de referencia <sup>3</sup>
	K31	Fo+	Fo-	
Colesterol (mmol/L)	2,92 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	3,39 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	3,49 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	2,7-5,3
Urea (mmol/L)	5,13 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	4,78 $\pm$ 0,11 <sup>b</sup>	4,71 $\pm$ 0,11 <sup>b</sup>	2,6-7,0
Creatinina (ng/dL)	1,19 $\pm$ 0,04	1,15 $\pm$ 0,04	1,09 $\pm$ 0,04	1,0-2,0
FAS <sup>2</sup> (UI)	168,42 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	219,85 $\pm$ 1,04 <sup>b</sup>	243,17 $\pm$ 1,04 <sup>c</sup>	< 500
GGT <sup>2</sup> (UI)	22,86 $\pm$ 1,05	25,27 $\pm$ 1,05	24,50 $\pm$ 1,05	< 39
ALT <sup>2</sup> (UI)	11,24 $\pm$ 1,14	13,95 $\pm$ 1,14	12,07 $\pm$ 1,14	< 55
AST <sup>2</sup> (UI)	84,29 $\pm$ 1,04	90,50 $\pm$ 1,04	90,99 $\pm$ 1,04	<110

<sup>a-b</sup> Diferentes letras superíndice indica diferencia significativa dentro de una misma fila (\*\*\*)  $P < 0,001$ ; \*\*  $P < 0,05$ ; \*  $P < 0,01$ )

<sup>1</sup>Tratamientos: K31= festuca con endófito salvaje tóxico; Fo+= festuca con nuevo endófito no productor de ergo-alcaloides; Fo-= festuca sin endófito

<sup>2</sup>FAS= fosfatasa alcalina serica; AST= aspartato amino-transferasa; ALP= alanino amino-transferasa; GGT= Gamma-glutamyl transpeptidasa

<sup>3</sup>Manual de Patología Clínica Veterinaria, Witter, F. (2012)

### 9.2.3.1 Colesterol

Se encontraron diferencias ( $P < 0,05$ ) entre los tratamientos, hubo un efecto de las observaciones y de las interacciones entre ambos ( $P < 0,001$ ). Los animales consumiendo Fo+ y Fo- no difirieron entre sí, pero ambos presentaron valores de colesterol mayores que los animales que pastorearon K31 ( $P < 0,001$ ) (figura 12).

La concentración de colesterol en los animales de K31, fluctuó a lo largo del año de estudio, teniendo la menor concentración en los meses de enero, marzo y abril, período en cual difirió de Fo+ y Fo-, y mayores concentraciones en los meses de invierno, donde no hubo diferencias con Fo+ y Fo-.

La concentración de colesterol en Fo+ y Fo- se comportó de manera similar, disminuyendo en el mes de enero, para aumentar paulatinamente hasta llegar a la mayor concentración en el mes de octubre.

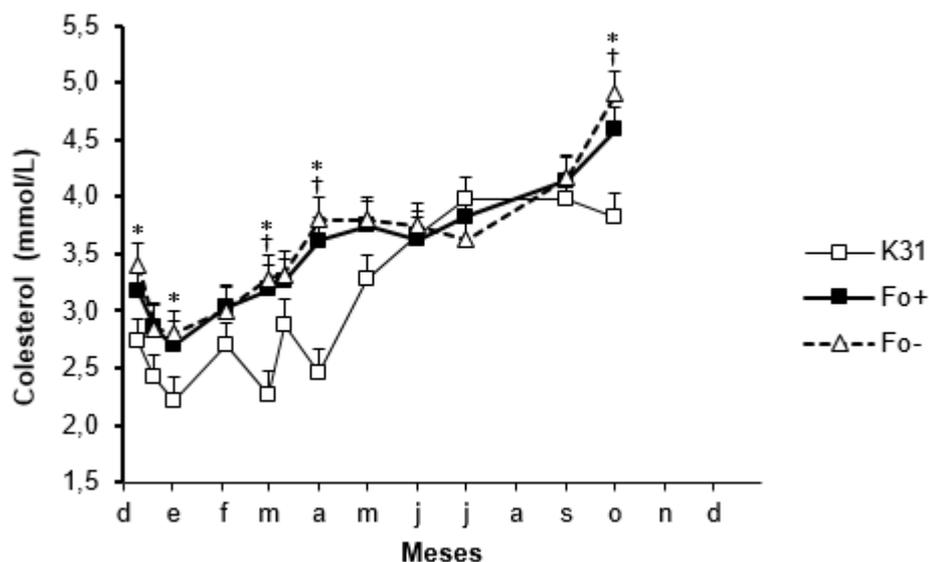


Figura 12: Concentración sérica de colesterol durante el año de ensayo de los diferentes tratamientos (K31: festuca cv Kentucky 31, endófito salvaje tóxico; Fo+: festuca cv Fortuna con endófito AR584; Fo-: festuca cv Fortuna sin endófito); †P<0,05 entre K31 y Fo+; \*P<0,05 entre K31 y Fo-)

### 9.2.3.2 Urea y Creatinina

Las concentraciones de urea fueron diferentes entre los tratamientos (P<0,05) no así las concentraciones de creatinina (P=0,194). Ambas variables fueron afectadas por las observaciones y las interacciones (P<0,001 y P<0,001 respectivamente para ambos).

La concentración de urea fue mayor en novillos que consumían K31, con respecto a los que consumían Fo+ y Fo-, no encontrándose diferencias entre estos dos. Como se puede observar en la figura 13A, existió una gran variación en el periodo de estudio destacándose dos aumentos en K31 en los meses de mayo y noviembre. Este último se presentó en los tres tratamientos.

Como se observa en la figura 13B, la interacción entre tratamiento y observación es significativa, debido a los aumentos existentes en los animales de K31 en los meses de diciembre y abril.

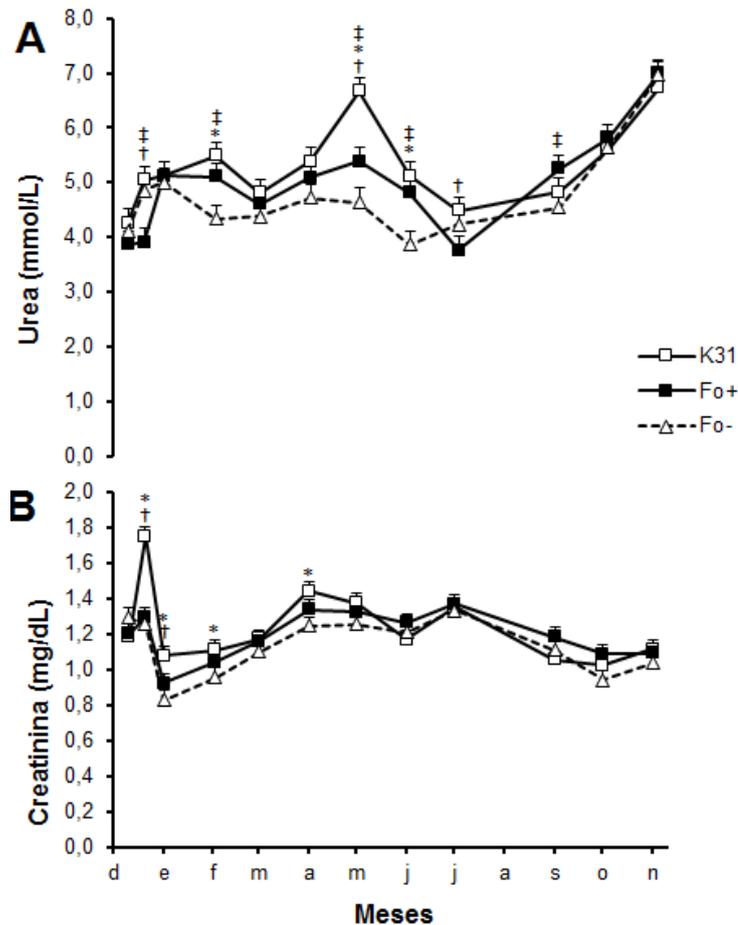


Figura 13. Concentración de urea (mmol/L) (A) y de creatinina (ng/dL) (B) a largo del período de estudio (meses), de los diferentes tratamientos (K31: festuca cv Kentucky 31, endófito salvaje tóxico; Fo+: festuca cv Fortuna con endófito AR584; Fo-: festuca cv Fortuna sin endófito); † $P < 0,05$  entre K31 y Fo+; \* $P < 0,05$  entre K31 y Fo-; ‡ $P < 0,05$  entre Fo+ y Fo-

### 9.2.3.3 Enzimas hepáticas

La concentración de FAS fue diferente entre los tratamientos ( $P < 0,001$ ), hubo efecto de las observaciones ( $P < 0,001$ ), y se encontró interacción entre ambos ( $P < 0,05$ ). Los novillos consumiendo K31 presentaron menor nivel sérico de FAS que Fo+ y Fo- y Fo+ menor que Fo- (figura 14A).

Las concentraciones de GGT, ALT y AST no estuvieron afectadas por los tratamientos, si por las observaciones ( $P < 0,05$ ,  $P < 0,001$  y  $P < 0,001$  respectivamente). La interacción entre tratamiento y observación fue significativa para AST y tendió a serlo para GGT ( $P < 0,05$  y  $P = 0,069$ ). Se encontraron variaciones estacionales en la concentración de FAS, ALT y AST, mientras que las de GGT se mantuvieron relativamente estables (figura 14B, C y D respectivamente).

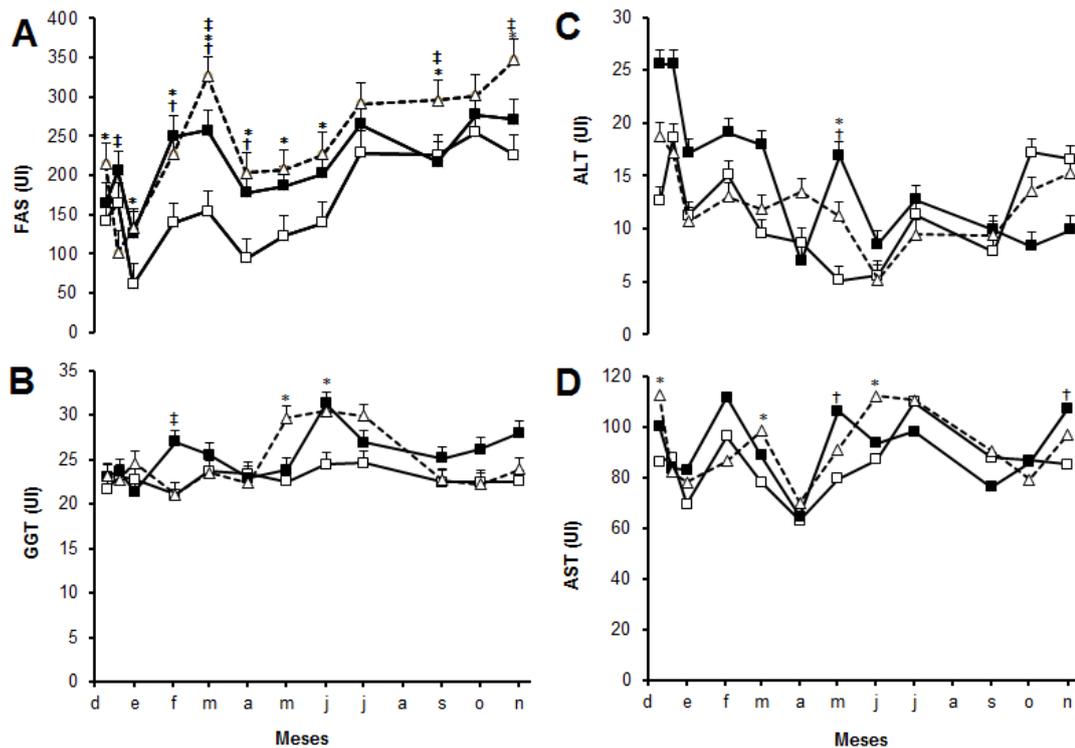


Figura 14. Concentración sérica de enzimas hepáticas (expresadas en UI) de novillos a largo del período de estudio (meses), de los diferentes tratamientos (K31  $\square$  festuca cv Kentucky 31, endófito salvaje tóxico; Fo+  $\blacksquare$  festuca cv Fortuna con endófito AR584; Fo-  $\triangle$  festuca cv Fortuna sin endófito); A) FAS= fosfatasa alcalina sérica; B) GGT= Gamma-glutamil transpeptidasa; C) ALT= alanino amino-transferasa y D) AST= aspartato amino-transferasa; †P<0,05 entre K31 y Fo+; \*P<0,05 entre K31 y Fo-; ‡P<0,05 entre Fo+ y Fo-).

## 9.2.4 Temperatura corporal

### 9.2.4.1 Temperatura rectal

La TR fue afectada por los tratamientos ( $P < 0,001$ ), los días de observación ( $P < 0,001$ ) y la interacción entre ambos ( $P < 0,001$ ) (Figura 15).

La TR fue mayor ( $P < 0,001$ ) en los animales de K31, que en los animales que consumían Fo+ y Fo-, no encontrándose diferencias entre éstos ( $40,0^{\circ}\text{C}$ ,  $39,3^{\circ}\text{C}$  y  $39^{\circ},3$  respectivamente). En todos los grupos se encontró un aumento en la TR de enero a marzo, así como de setiembre a noviembre. Además, los novillos de K31 presentaron otros dos picos de aumento de TR en abril y junio.

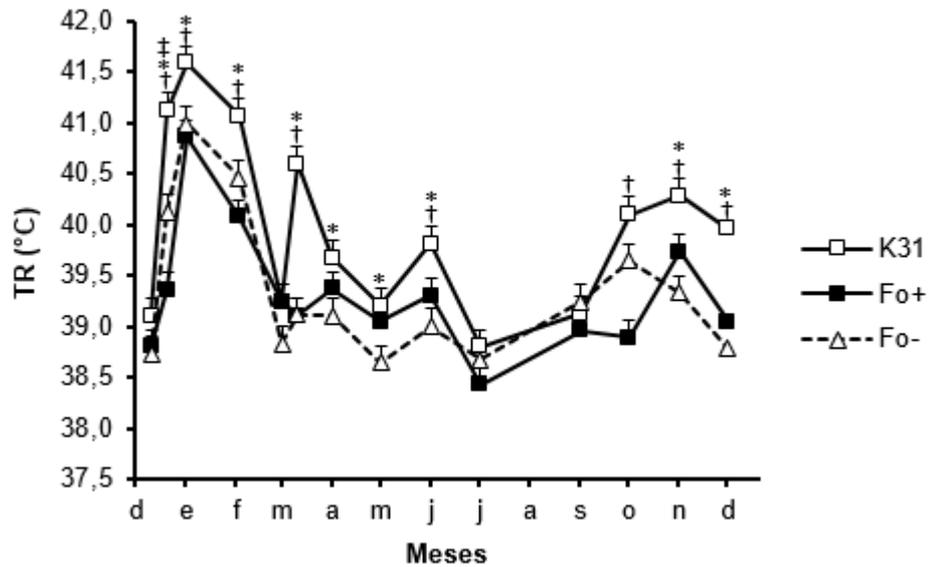


Figura 15: Temperatura rectal (°C) a largo del período de estudio (meses), de los diferentes tratamientos (K31: festuca cv Kentucky 31, endófito salvaje tóxico; Fo+: festuca cv Fortuna con endófito AR584; Fo-: festuca cv Fortuna sin endófito); †P<0,05 entre K31 y Fo+; \*P<0,05 entre K31 y Fo-; ‡P<0,05 entre Fo+ y Fo-).

#### 9.2.4.2 Temperatura Subcutánea

La TSC fue diferente entre los tratamientos ( $P < 0,001$ ), varió a lo largo de las horas de observación ( $P < 0,001$ ) y hubo interacción entre ambos ( $P < 0,001$ ) (Figura 16).

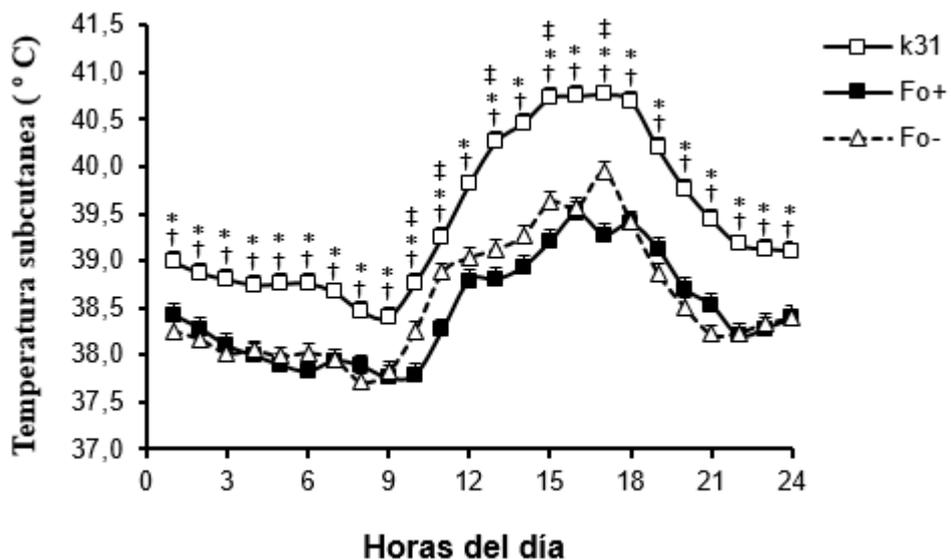


Figura 16. Temperatura subcutánea de novillos consumiendo festuca con endófitos en verano, en función de las horas del día (promedio de 10 días: 21/2/14 al 2/3/14) (K31= festuca cv Kentucky 31, endófito salvaje tóxico; Fo+= Festuca cv Fortuna, con endófito AR584, no productor de ergo-alcaloides; Fo-= Festuca cv sin endófito); †P<0,05 entre K31 y Fo+; \*P<0,05 entre K31 y Fo-; ‡P<0,05 entre Fo+ y Fo-).

Los animales de K31 presentaron una mayor temperatura media que los animales pastoreando Fo+ y Fo- pero no hubo diferencias significativas entre

éstos dos. Además, se observó que las mayores TSC se registraron a las 17:00 h y las más bajas entre las 5:00 h y las 9:00 h (Figura 16).

### 9.2.5 Frecuencia respiratoria

La tasa de FR fue afectada por los tratamientos ( $P<0,001$ ), los días de observación ( $P<0,001$ ) y la interacción entre ambas ( $P<0,001$ ) (Figura 17A).

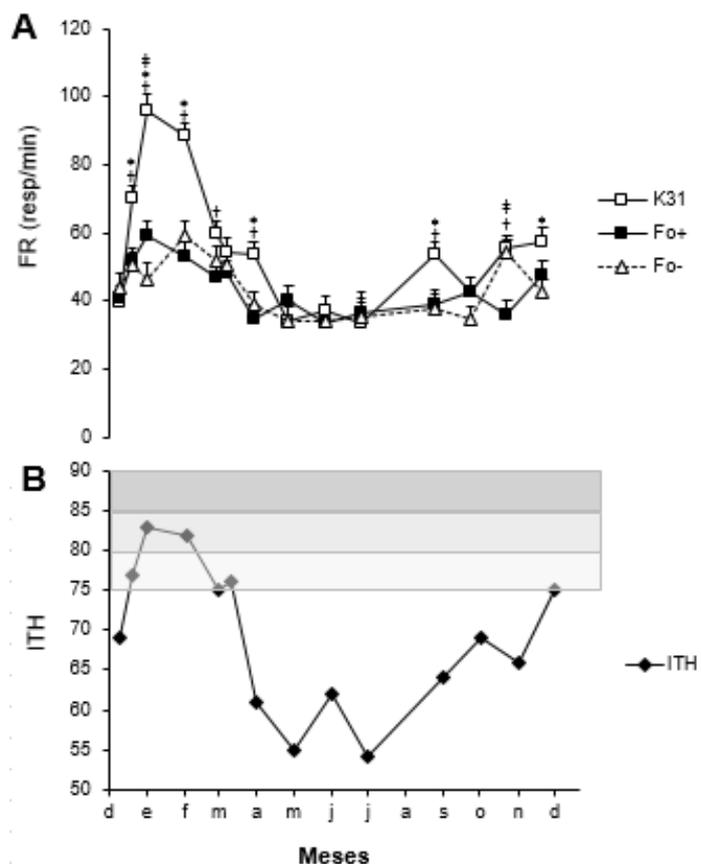


Figura 17A: Frecuencia respiratoria (respiraciones por minuto= rpm) a largo del período de estudio (meses), de los diferentes tratamientos (K31: festuca cv Kentucky 31, endófito salvaje tóxico; Fo+: festuca cv Fortuna con endófito AR584; Fo-: festuca cv Fortuna sin endófito); † $P<0,05$  entre K31 y Fo+; \* $P<0,05$  entre K31 y Fo-; ‡ $P<0,05$  entre Fo+ y Fo-). Figura 17B. Índice de Temperatura y Humedad (ITH) de acuerdo a la ecuación desarrollada por Thorn (1959), determinado para cada día de observación en los animales. Los rectángulos de colores dentro de la figura delimitan las cuatro categorías del riesgo de estrés calórico: normal ( $ITH \leq 74$ ), alerta ( $74 < ITH < 79$ ), peligro ( $79 \leq ITH < 84$ ) y emergencia ( $ITH \geq 84$ ) (Mader et al. 2006).

Los novillos consumiendo K31 presentaron mayor ( $P<0,001$ ) FR que los animales que consumían Fo+ y Fo-, obteniéndose valores similares en ambos tratamientos.

En los animales que consumían K31, se observó un marcado aumento de FR en los meses de enero, febrero y marzo, mientras que los otros dos tratamientos aumentaron, pero en menor medida. En enero los animales de Fo+ presentaron mayor FR que los de Fo-. En noviembre, los animales de Fo- presentaron similar FR que los del K31, y mayor a los de Fo+.

En la figura 17B, se muestran los diferentes índices de temperatura y humedad (ITH) calculados en las fechas donde se realizaron las determinaciones clínicas y paraclínicas en los animales. Se observa que los mayores valores de ITH se encuentran en los meses de enero (ITH=83), febrero (ITH=82), marzo (ITH=76) y diciembre (ITH=75), ubicándose los dos primeros meses en la categoría de peligro de estrés calórico, y los otros dos meses dentro de alerta. El ITH más bajo, se registró en el mes de mayo (ITH=55), este valor se encuentra dentro del rango normal como el resto de los valores del año.

### 9.2.6 Evolución de peso vivo

La evolución del PV fue diferente entre tratamientos ( $P < 0,001$ ), siendo similar en Fo+ y Fo-, pero mayor que en K31. Además, el PV varió a lo largo de los meses ( $P < 0,001$ ) y se encontró una interacción entre tratamiento y las observaciones en los diferentes meses ( $P < 0,001$ ) (Figura 18).

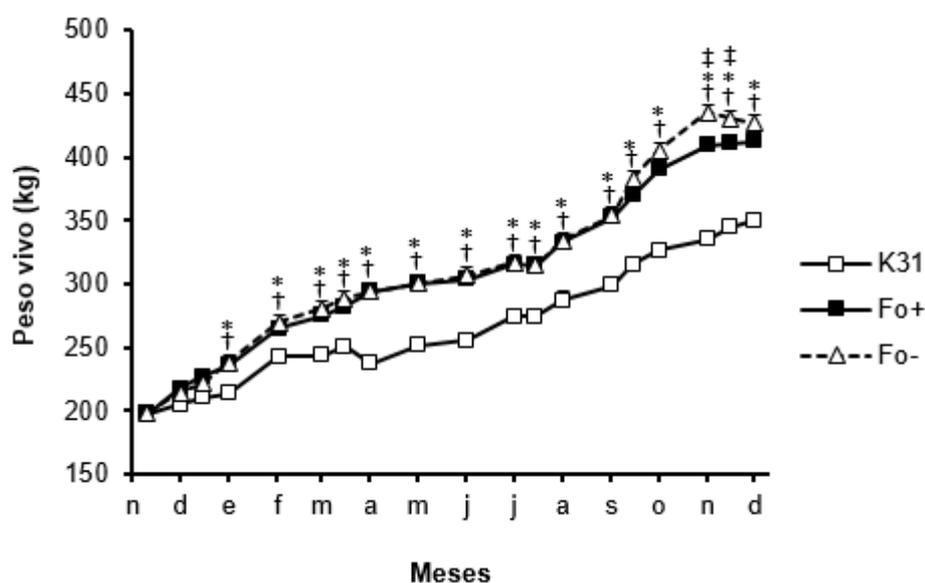


Figura 18: Evolución del peso vivo (PV) a largo del ensayo (meses), en los diferentes tratamientos (K31: festuca cv Kentucky 31, endófito salvaje tóxico; Fo+: festuca cv Fortuna con endófito AR584; Fo-: festuca cv Fortuna sin endófito); † $P < 0,05$  entre K31 y Fo+; \* $P < 0,05$  entre K31 y Fo-; ‡ $P < 0,05$  entre Fo+ y Fo-

Los novillos de los tres tratamientos partieron de PV similares (K31  $197,3 \pm 6,9$ , Fo+  $197,9 \pm 6,9$  y Fo-  $198,5 \pm 6,9$  kgPV), pero a finales de enero, Fo+ y Fo- mantuvieron PV similares ( $235,2 \pm 6,9$  kgPV y  $238,7 \pm 7,5$  kgPV respectivamente) pero mayores a K31 ( $213,6 \pm 6,9$  kgPV,  $P < 0,05$ ).

Durante el otoño se observó que Fo+ y Fo- aumentaron progresivamente de PV mientras que el PV de K31 se mantuvo relativamente constante. En todos los tratamientos se observó un aumento importante a partir de agosto. En noviembre de 2014 se observó que Fo- presentó mayor PV que los demás tratamientos, quedando con similar PV que Fo+ a final del año. Al final del ensayo los PV de K31, Fo+ y Fo- fueron de  $350,2 \pm 6,4$ ;  $412,3 \pm 6,2$  y  $426,9 \pm 6,4$  kgPV respectivamente.

Si bien no se hizo un estudio de comportamiento de los novillos, cuando se realizaron las determinaciones en las pasturas y en los animales, pudimos observar que, en los meses de verano los animales de K31 permanecían gran parte del día en “lagunas” artificiales que hicieron en las parcelas y de pie alrededor de los bebederos (figura 19). Además, se echaban en el barro producido, evidenciándose por la capa de barro que cubría gran parte de su cuerpo. Por otro lado, presentaron retención de pelajes largos, descoloridos, jadeo y excesiva salivación.



Figura 19. Imágenes de los alrededores de los bebederos y las “lagunas” artificiales de las parcelas de K31 (K31: festuca cv Kentucky 31, endófito salvaje tóxico).

### 9.3 Mosca de los Cuernos

#### 9.3.1 Carga de moscas de los cuernos adultas

En el período 1 la carga de moscas adultas fue diferente entre los tratamientos ( $P<0,05$ ), varió con la observación ( $P<0,05$ ) y tendió a haber una interacción entre ambas ( $P=0,09$ ). La covariable peso fue significativa ( $P<0,001$ ) (figura 20).

Los animales de K31 tuvieron mayor carga de moscas ( $490\pm 1,17$ ) que los animales de Fo+ ( $312\pm 1,15$ ) y Fo- ( $269\pm 1,16$ ), no encontrándose diferencias entre estos.

En el período 2 la carga de moscas adultas fue diferente entre los tratamientos ( $P<0,05$ ), varió con las observaciones ( $P<0,001$ ) y hubo interacción entre ambas ( $P<0,001$ ). La covariable peso fue significativa ( $P<0,001$ ) (figura 20).

Los animales de Fo+ tuvieron similar carga de moscas ( $93\pm 1,13$ ) que los animales K31 ( $79\pm 1,18$ ), y éstos mayor carga que los animales de Fo- ( $45\pm 1,16$ ).

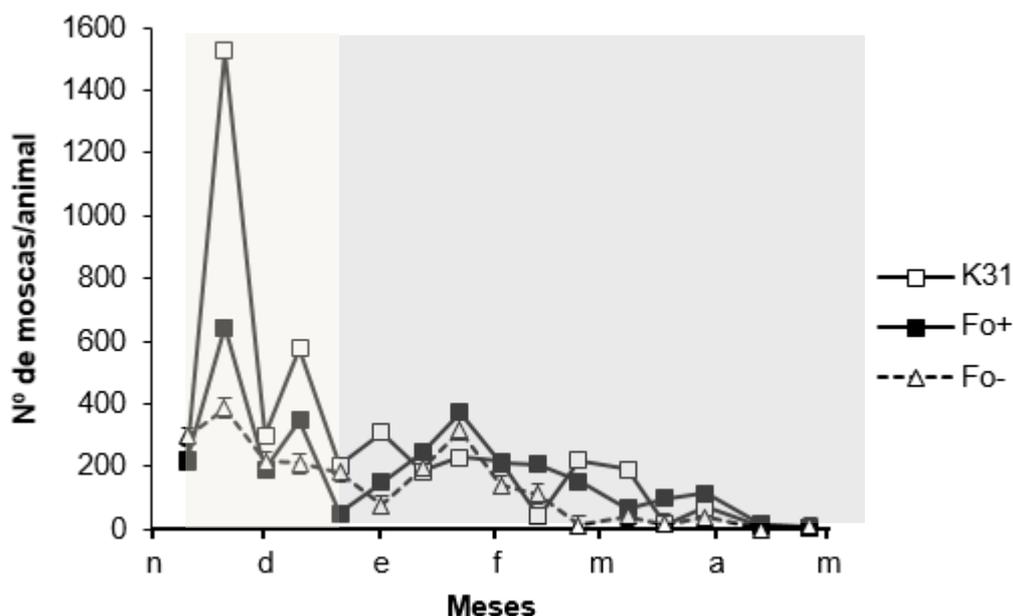


Figura 20: Evolución de la carga de moscas adultas por individuo, a largo del ensayo (meses), en los diferentes tratamientos (K31: festuca cv Kentucky 31, endófito salvaje tóxico; Fo+: festuca cv Fortuna con endófito AR584; Fo-: festuca cv Fortuna sin endófito). Para su estudio, la carga de moscas en el año, fue dividido en dos períodos: período 1 rectángulo gris claro (primer pico a fines de primavera) y período 2 rectángulo gris oscuro (segundo pico a principios de otoño) ( $\dagger P<0,05$  entre K31 y Fo+;  $*P<0,05$  entre K31 y Fo-;  $\ddagger P<0,05$  entre Fo+ y Fo-).

#### 9.3.2 Número de pupas obtenidas en la materia fecal de los novillos de K31, Fo+ y Fo-.

El número de pupas obtenidas en la materia de fecal de los novillos no fue diferente entre los tratamientos ( $P=0,637$ ), no varió en las diferentes observaciones ( $P=0,372$ ) y no hubo interacción entre ambas ( $P=0,554$ ) (figura 21).

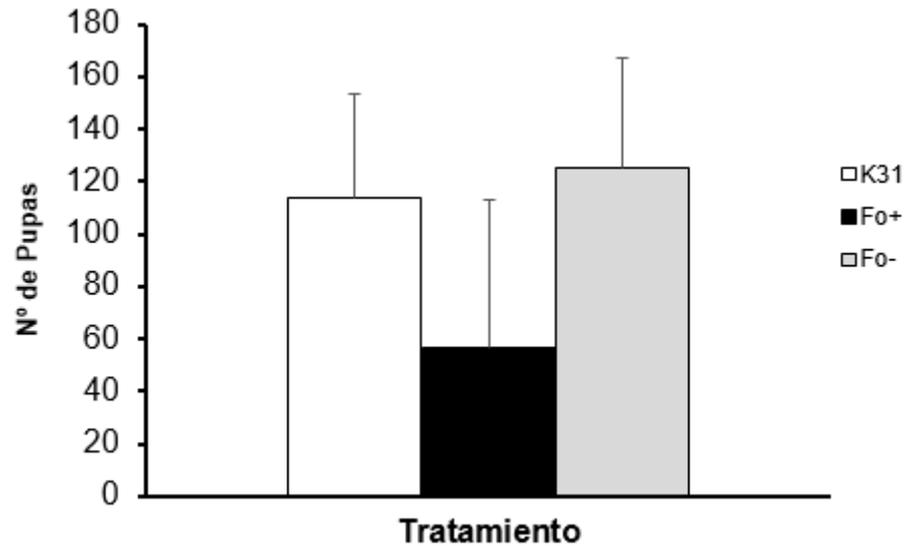


Figura 21. Número de pupas obtenidas del cultivo de materia fecal de novillos pastoreando los diferentes tratamientos (K31: festuca cv Kentucky 31, endófito salvaje tóxico; Fo+: festuca cv Fortuna con endófito AR584; Fo-: festuca cv Fortuna sin endófito). Los resultados son en base a tres replicas y a 4 muestreos: 2 en diciembre, uno en febrero y otro en marzo.

## 10. DISCUSIÓN

Este es el primer reporte de un ensayo de seguridad animal utilizando la nueva asociación de festuca Fortuna con el hongo endófito AR584 que busca con un enfoque integral e innovador para evaluar la seguridad animal del uso de esta combinación por primera vez en regiones subtropicales. Este trabajo se destaca por la alta frecuencia en la determinación de un importante número de variables que reflejan la fisiología animal durante un año entero de pastoreo, algunas de ellas no reportadas en protocolos internacionales, como lo es la temperatura subcutánea. Además, se buscó determinar los efectos de los alcaloides en el control de la mosca de los cuernos, tanto en la carga de las mismas como en el desarrollo larvario.

Los hongos endófitos habitan en las plantas sin causar enfermedad en la misma, estableciendo con ella una relación simbiótica, permitiendo e incrementando la sobrevivencia de ambos organismos (Hill et al. 1991; Thompson et al. 2001). Se ha reportado que la planta infectada con endófitos ejerce un control genético sobre la producción (presencia y cantidad) de alcaloides por parte del endófito (Agee & Hill, 1994), y que éstos están sujetos a grandes variaciones debido a factores estacionales y ambientales (Powell et al. 1993; Woodburn et al. 1993). En nuestro ensayo los porcentajes de infección del endófito fueron 97, 96 y 0% para K31, Fo+ y Fo- respectivamente, por lo que se podría esperar la máxima expresión de productos potencialmente tóxicos en plantas y así registrar los efectos sobre los bovinos que la consumen. Sin embargo, la presencia del endófito en los cultivares de festuca, puede conducir a una interpretación errónea de los datos de producción tanto de plantas como de animales, si no se conoce el perfil de alcaloides producidos (van Heeswijck & McDonald, 1992; Fletcher et al. 1996). Se ha documentado que los alcaloides producidos por el endófito, tienden a aumentar en la primavera, cayendo a finales de la misma después del crecimiento reproductivo, y continúan aumentando en el verano y principios del otoño, antes de caer a finales del otoño e invierno (Woodburn et al. 1993; Easton et al. 1996).

Los niveles de peramina encontrados en este ensayo (2,66 y 1,48 ppm para K31 y Fo+ respectivamente) fueron ligeramente superiores a los descritos por Roylance et al. (1994) y Bush & Fannin (2009). La concentración de peramina aumentó en otoño y primavera-verano, en discrepancia con trabajos previos con plantas cultivadas en invernadero (Roylance et al. 1994) o a campo (Bush & Schmidt 1994), donde en ninguno de los dos casos encontraron un patrón estacional. El perfil de expresión de este alcaloide en Fo+ es coherente con otros cultivares a los que se les ha incluido el AR584 (comunicación personal, Dr. Wade Mace).

Las lolinas se encontraron en mayor concentración que el resto de los alcaloides producidos por *E. coenophiala* en la festuca como ha sido descrito previamente (Bush y Fannin, 2009). En nuestro ensayo, K31 presentó mayores concentraciones de lolina total en los meses de mayo (otoño) y noviembre (primavera-verano), siendo consistente con reportes anteriores

(Fletcher, 1999). Sin embargo, el contenido de lolina total en primavera-verano fue más bajo (1400 ppm) de lo que se ha observado para K31 (2800 ppm, Bush & Fannin, 2009). Por su parte, la concentración de lolina en Fo+, permaneció constante durante todo el año.

Los análisis de ergovalina para K31 detectaron niveles débiles a moderados (0,36-0,76 ppm) e incluso no se encontró un patrón estacional marcado, considerando que en otros ensayos los valores de ergovalina variaron de 1,3 ppm en primavera, 0,7 ppm en verano a 2,5 ppm en otoño (Nihsen et al. 2004). En las muestras de Fo+ y Fo-, en las que se analizó la concentración de ergovalina, no se encontró evidencia de contaminación de estas líneas con la cepa tóxica de K31.

Las diferencias encontradas en los niveles y patrones estacionales de los alcaloides con la literatura disponible confirman el concepto que los resultados no puedan ser extrapolados de un sitio a otro, de un año a otro, y a otros cultivares (van Heeswijck & McDonald, 1992) y remarca la relevancia de testear las nuevas cepas endofíticas en cultivares y en diferentes entornos ambientales o sitios geográficos (Siegel, 1993; Latch, 1994). Por otro lado, está descrito que este hongo tiene el potencial para expresar otros tipos de alcaloides como los indol-diterpenos (comunicación personal, Dr. Wade Mace); por lo que cada nueva asociación (festuca-endófito) debería testearse desde el punto de vista químico para supervisar la expresión de estos alcaloides.

Utilizando el manejo de pastoreo "put-and-take", la MST disponible y remanente se mantuvo en niveles que no difirieron entre los tratamientos. Esto coincide con lo reportado por Watson et al. (2004) y Johnson et al (2012), pero no así con Parish et al. (2003b) donde la MST disponible fue mayor en K31 que en los tratamientos de festuca con endófito novel (EN) y éstos mayor MST disponible que la festuca E-. Esto podría deberse a las diferencias en las condiciones ambientales (altas precipitaciones, óptimas temperaturas de crecimiento) que se presentaron en nuestro año experimental. Se puede sugerir que las condiciones ambientales favorables para la producción forrajera observadas en el período de estudio, no permitieron observar las ventajas productivas de la asociación endófito/planta, que según algunos autores se expresan bajo condiciones estrés ambiental (Schmidt & Osborn, 1993; Lacefield et al. 2004).

Los novillos que consumían K31 presentaron concentraciones urinarias de ergo-alcaloides de al menos 76,9 ng/mg de creatinina, lo que es consistente con trabajos previos (Stuedemann et al. 1998; Hill et al. 2000). La concentración de ergo-alcaloides en orina varió durante el año de estudio, obteniéndose los valores mayores en enero y los menores en julio; éstos son relativamente similares a los reportados (50, 80 y 60 ng/mg de creatinina en otoño, primavera y verano respectivamente, Hill et al. 2000). Sin embargo, las variaciones de ergo-alcaloides en orina no son consistentes con los contenidos de ergovalina en la pastura. Esto podría deberse a que en orina se determinó la concentración de ergo-alcaloides totales, y la ergovalina si bien representa un gran porcentaje de los ergo-péptidos (84 a 97 % de la

fracción total; Porter, 1995; Strickland et al. 2011), es uno de ellos, pero hay otros que no se midieron (como ergocriptina, ergotamina y ergonovina) y que pudieron haber aumentado o disminuido su concentración en función de la estación, y explicar las variaciones encontradas en los ergo-alcaloides en orina.

Las concentraciones de ergo-alcaloides en orina fueron consistentes con las concentraciones de PRL sérica, ya que los novillos de K31 tenían niveles muy inferiores respecto a Fo+ y Fo-, e incluso algunos alcanzaron valores cercanos a cero. La reducción en la concentración de la PRL sérica, es el marcador fisiológico más comúnmente analizado para confirmar los efectos fisiológicos de la festucosis en el ganado (Goetsch et al.1987; Davenport et al. 1993; Strickland et al. 1993; Rice et al. 1997). Los receptores de dopamina D2 son estimulados por los ergo-alcaloides provenientes del endófito, lo que resulta en una reducción de la secreción de PRL por la hipófisis anterior (Peters et al. 1981; Browning et al. 1997; Freeman et al. 2000). Estos resultados son consistentes con estudios previos que encontraron que novillos consumiendo festuca E+ tenían menor concentración de PRL respecto a los animales consumiendo festuca E- (Karg & Schams, 1974; Browning et al. 1997; Hill et al. 2001, Nihsen et al. 2004). Por otra parte, se ha demostrado que las concentraciones de PRL varían con el fotoperíodo y la temperatura ambiente (Peters et al. 1981), así como con la edad (McCarthy et al. 1979). Los novillos de Fo+ y Fo- presentaron mayores concentraciones de PRL en la primavera y menores en otoño-invierno lo que concuerda con estudios anteriores (Gomez & Lopez, 1991; Curlewis, 1992). En este ensayo la temperatura ambiente fue igual para todos los tratamientos, y del mismo modo todos los animales tenían edad similar, por lo cual la diferencia en las concentraciones de PRL entre K31 y Fo+ y Fo- se puede asignar al efecto intrínseco de los ergo-alcaloides.

La concentración sérica de colesterol fue menor en los animales de K31 que en Fo+ y Fo-, no encontrándose diferencias entre éstos, lo que coincide con lo descrito previamente (Oliver et al. 2000; Nihsen et al. 2004; Brown et al. 2009). Los ergo-alcaloides afectan el metabolismo de los lípidos causando una disminución de las reservas de grasa, el colesterol y la concentración de triglicéridos en la sangre (Cincotta & Meier, 1989; Barnett et al. 1991). El aumento de colesterol en todos los grupos a lo largo del ensayo puede estar relacionado con el desarrollo, en efecto, las concentraciones de este metabolito son mayores en animales de mayor edad (Cavestany et al. 2005).

Si bien las concentraciones de urea obtenidas están dentro del rango de referencia, la concentración de ésta fue mayor en animales K31 que en Fo+ y Fo-. Esta diferencia puede deberse al mayor contenido de proteína cruda en la festuca K31 y/o a una menor síntesis proteica (masa muscular, crecimiento) en estos animales, lo que resulta en mayor concentración de este metabolito y posible excreción del mismo. Se ha descrito en humanos (Samra & Abcar, 2012) que el aumento del consumo de proteína cruda también lleva a un aumento de la concentración sérica de creatinina. Los aumentos puntuales de éstas que se observaron en los novillos K31 también puede asociarse esto. Dado que estos aumentos en K31 se observaron

mayormente en enero, también puede estar vinculado a dificultades en el control de la temperatura corporal (ver debajo) y consecuente deshidratación (Oliver et al. 1997).

Las menores concentraciones de FAS en novillos pastoreando K31, son consistentes con los resultados de otros estudios en los que los bovinos que consumen festuca con endófitos tóxicos (E+) tienen menor concentración de esta enzima en sus sueros (Jackson et al. 1984; Oliver et al. 2000, Nihsen et al. 2004) que los animales consumiendo festuca E-; pero dichos valores se encuentran dentro de rangos establecidos como normales. A la fecha, se desconoce el mecanismo exacto por el cual estas enzimas están relacionadas con la “festucosis”.

Al igual que lo reportado por Parish et al. (2003b), Nihsen et al. (2004) y Johnson et al. (2012), los novillos que pastoreaban Fo+ y Fo- tenían temperaturas rectales (TR) normales, mientras que los que pastoreaban K31 sufrieron de estrés térmico como lo indican las TR elevadas y el aumento de la frecuencia respiratoria (FR, Silanikove, 2000). De la misma manera los animales de Fo+ y Fo- de enero a marzo, fueron afectados (en menor medida) por el mismo fenómeno. Esto se explica, porque en verano la ganancia diurna de calor corporal por radiación (más la ausencia de sombra) y el metabolismo, generalmente exceden la pérdida de calor (ya sea por radiación, conducción, convección y/o evaporación); por lo tanto, éste se almacena, la temperatura corporal sube y como respuesta fisiológica aumenta la FR.

Los efectos del estrés térmico han sido difíciles de separar de los efectos que causan los ergo-alcaloides sobre el ganado. Muchos de los signos de la exposición a éstos se superponen con signos de estrés por calor (consumo de alimento deprimido, TR y FC elevada, jadeo). Los animales que consumen ergo-alcaloides tienen reducida la capacidad de termorregulación, que además se exagera por cambios en la temperatura ambiente (Spiers et al. 2012) y que en parte determina la presentación clínica que observamos (Hemken et al. 1981). En función de las variables medidas en este ensayo solo pudimos observar el síndrome distérmico, no así el pie de festuca. El aumento de la temperatura corporal central se debe, por un lado, a la vasoconstricción periférica producida cuando los ergo-alcaloides se unen a los receptores  $\alpha$ -2 adrenérgicos y serotoninérgicos (Strickland et al. 1993; Oliver, 1997) que perjudica la transferencia de calor del interior del animal a la superficie de la piel a través de la evaporación (Rhodes et al. 1991, Aldrich et al. 1993). Por otro lado, la disminución en la concentración de PRL (Porter & Thompson, 1992) debida a ergo-alcaloides hace que el ganado no peleeche, lo que fue observado en nuestro estudio presentando los novillos de K31, una típica capa de pelos incluso en el verano, exacerbando el estrés por calor asociado al síndrome distérmico.

Las variaciones horarias en la temperatura subcutánea (TSC) fueron similares para los tres tratamientos, presentando los novillos K31 siempre mayores temperaturas, de forma consistente con la temperatura rectal. Este tipo de variación monofásica diurna fue descrito por Al-Haidary et al. (2001),

utilizando transmisores de temperatura telemétricos implantados en la cavidad peritoneal de los bovinos. Sin embargo, estos mismos autores, reportaron que la exposición a ergo-alcaloides inhibe esta variación diurna de la temperatura central. Las mayores TSC se registraron a las 17:00 h y las más bajas a las 5:00 y a las 9:00 h. Este mismo patrón de temperatura (pero temperatura timpánica) fue reportado por Arias & Mader (2009) para el ganado en engorde. La TSC en todos los grupos exhibió un retraso de aproximadamente 4 horas detrás de las condiciones climáticas más propensas para el estrés calórico. Esta estimación está en general de acuerdo con otros estudios, que se han reportado entre 2 y 5 h entre la temperatura corporal y la temperatura ambiente (Al-Haidary & Al Hassan, 2003; Brown-Brandl et al. 2003; Kendall et al. 2006).

Los novillos de K31 presentaron mayor FR que los animales de Fo+ y Fo-, no habiendo diferencias entre estos. Estos resultados son similares a los reportados por Nihsen et al. (2004). En los meses de diciembre a marzo, los tres tratamientos estuvieron por encima de los valores fisiológicos descritos (10 a 40 rpm, Cunnhigham, 2003), teniendo K31 mayores valores de FR que los otros dos. El aumento de FR por encima de los valores de referencia en Fo+ y Fo- durante ese período, son explicados por los valores obtenidos de ITH, que muestran que los animales estuvieron en alerta ( $74 < ITH < 79$ ) y en peligro ( $79 \leq ITH < 84$ ) de estrés calórico. Si bien la FR es un buen indicador de estrés térmico, ya que los bovinos pierden calor metabólico a través del tracto respiratorio (Finch, 1986), se ha demostrado que el consumo de festuca E+ aumenta la FR de los bovinos por encima de la causada por estrés (Carr & Jacobson, 1969; Osborn et al. 1992). Por un lado, cuando los ergo-alcaloides estimulan a los receptores serotoninérgicos-2 provocan broncoconstricción (Oliver, 1997). En tanto que los  $\alpha$ -2 adrenérgicos presentes en las plaquetas de la sangre, cuando son estimulados por los ergo-alcaloides aumentan la producción de tromboxano, causando agregación plaquetaria (Oliver, 1997). Estos se combinan para dar lugar a una reducción en la saturación de O<sub>2</sub> en la sangre, por lo que hay un aumento en la tasa de respiración para oxigenar suficientemente los tejidos (Oliver, 1997).

Los novillos que pastoreaban Fo+ y Fo-, tuvieron ganancias de pesos vivo (GDP) similares, siendo mayores que los encontrados en K31, reflejando un efecto adverso de la festucosis sobre la performance productiva de los novillos. Estos resultados son consistentes con otros ensayos de pastoreo (Parish et al. 2003b; Nihsen et al. 2004; Beck et al. 2008; Jonhson et al. 2012) que reportaron que cultivares con endófito novel y E- presentaron similar y mayor GDP en todos los sitios y fechas evaluados, en comparación con los que pastoreaban E+, pudiendo deberse a una menor ingesta de forraje por parte de los animales de K31. En nuestro ensayo evaluamos la MST disponible y remanente, no encontrando diferencias entre los tratamientos, lo que a pesar de no haber medido el consumo, sugiere que una menor disponibilidad del forraje no fue el causante de un menor PV. No se observaron diferencias en la composición química en desmedro de la festuca K31 lo que es consistente con reportes previos donde se demostró que los parámetros de calidad del forraje no cambian por la presencia del

endófito en la festuca (Bush & Burrus, 1988; Matthews et al. 2005). Estos últimos autores demostraron además una digestibilidad similar pero un menor consumo en animales consumiendo heno de festuca E+. Por lo antes dicho, podemos decir que la diferencia de PV es un efecto intrínseco del endófito y no del forraje y que las diferencias en el desempeño animal deben estar relacionadas con la ingesta de alcaloides que afectan negativamente la fisiología del animal.

Goetsch et al. (1987) observaron disminución de la ingesta cuando las vacas consumían festuca E+ en comparación con novillos consumiendo festuca E- en climas cálidos. Por su parte, Nihsen et al. (2004) reportaron que -si bien no recogieron datos de comportamiento- los novillos que consumían festuca E+ permanecían más tiempo en la sombra y en los bebederos. En este ensayo tampoco se registraron datos de comportamiento, y las parcelas donde se encontraban los animales carecían de sombra. Sin embargo, además de un evidente menor PV de los animales y el pelaje de los mismos, se observó la formación de “parches de agua” en las parcelas donde permanecían los animales de K31.

Aldrich et al. (1993) llevaron a cabo una evaluación del consumo de festuca E+ en la dieta en la relación con la temperatura, encontrando una notable reducción en la actividad de pastoreo durante los meses de verano. Los resultados indicaron que a una temperatura ambiente alta (32°C), la ingesta de forraje se redujo en un 22% en todo el ganado, y el consumo de agua aumentó en un 62%. Por lo tanto, lo que sugiere que las reducciones en la ingesta, son sin duda, exacerbadas por factores externos como el medio ambiente. Estos hallazgos confirmados por McClanahan et al. (2008), que informaron una correlación negativa en la frecuencia de pastoreo (porcentaje de pastoreo activo) y temperatura ambiente, ya que la mayor frecuencia de pastoreo se produjo durante la mañana temprana asociada con temperaturas ambiente más bajas. Éstos autores concluyeron que la reducción en la ingesta puede deberse a combinaciones de factores ambientales, del hongo y fisiológicos. En relación a esto, la menor GDP podría explicarse en función de que los animales consumiendo festuca con endófitos tóxicos tuviesen alterada su capacidad metabólica, tal como se observa en los resultados de TR, TSC y FR que indican baja eficiencia metabólica (Zanzalari et al. 1989). La respuesta inmediata de los animales frente al estrés por calor es reducir la ingesta en un intento de reducir la producción de calor metabólico a un nivel que pueda ser disipado (Beede & Collier, 1986). Está descrito que incluso en termoneutralidad el control del consumo es más sensible a los ergo-alcaloides y que la supresión del apetito no se deba solo a un cambio en la temperatura corporal central. Existe la posibilidad de que la reducción del consumo y la hipertermia que caracterizan la festucosis, estén mediadas por diferentes vías o diferentes toxinas (Spiers et al. 2012). Los ergo-alcaloides al actuar como agonistas de los receptores serotoninérgicos (Dyer, 1993), pueden deprimir la ingesta mediante el aumento de la saciedad (Simansky, 1996). Otros investigadores han demostrado que la tasa de pasaje de alimentos disminuye en los animales que consumen festuca E+ (Goetsch et al. 1987), lo que también puede contribuir a reducir la ingesta y por tanto la GDP.

Nuestros datos de carga de moscas mostraron que en el primer pico de moscas (fines de primavera) los animales que pastoreaban K31 tuvieron mayor carga de mosca que los animales de Fo+ y Fo-. Estos hallazgos son opuestos a los reportados por Brown et al. (1993), que encontraron que el ganado de carne pastoreando festuca E+ tenía menor carga de moscas de los cuernos y de la cara (*Musca autumnalis*) que el ganado pastoreando pasto bermuda (*Cynodon dactylon* L.). Cuando la festuca E+ es ingerida por los bovinos, los alcaloides que llegan al rumen se absorben a través de la pared del mismo y permanecen en el torrente sanguíneo (Stuedemann et al. 1998). Debido a que la mosca de los cuernos es totalmente dependiente de la sangre bovina como fuente de alimento, el alcaloide que fluye a través del torrente sanguíneo puede ejercer una acción repelente (Kuramochi, 2000), por lo cual, en vez de alimentarse de animales con alcaloides en sangre, busque otros hospedadores. En el mismo sentido, Parra et al. (2013) reportaron menor carga de moscas en los animales que pastoreaban K31, que en los animales que pastoreaban pasturas E-. Pero en dicho trabajo, los tratamientos no se realizaron de forma simultánea (todos los animales pasaban primero por un tratamiento y luego por otro), por lo que no es posible aislar efectos estacionales de la mosca, ni efectos residuales del consumo de alcaloides. Además, el conteo de moscas se realizó de 10:00 a 15:00 h, momentos del día en que las moscas se encuentran en la región ventral del animal para evitar la incidencia del sol.

La mayor carga de moscas en los animales de K31 en nuestro experimento, podría deberse a una atracción diferencial de las moscas por este grupo de bovinos. Breijo et al. (2013) reportaron que los cambios fenotípicos modifican la facilidad de acceso de la mosca de los cuernos a la sangre de los bovinos, algunos de los cuales se explican por cambios en el espesor de la piel de los mismos. Animales de capa oscura, machos y más pesados presentan mayor carga de mosca (Franks et al. 1963; Rodríguez-Gallegos & Acosta-Rodríguez, 2011). Por esta razón, se utilizaron bovinos con características fenotípicas similares (machos oscuros y con similares PV), por lo cual estos efectos fenotípicos no son la causa de los resultados obtenidos. Una posible explicación está asociada a la temperatura corporal. Se ha descrito que varias especies de insectos, utilizan sensores de temperatura para identificar a sus hospedadores y a su vez el aumento de la temperatura modula la respuesta al sabor a algunos nutrientes. (Afroz et al. 2013). En el presente trabajo, los bovinos K31 tenían una mayor temperatura corporal respecto a los de los grupos Fo+ y Fo- pudiendo facilitar la atracción diferencial de las moscas que determinó mayor carga en los bovinos K31. Respecto al período 2, observamos que no hay diferencias en la carga de moscas adultas entre los animales de K31 y los de Fo+, teniendo ambos tratamientos mayor carga de moscas que los animales de Fo-; no encontramos una explicación para este hallazgo.

En nuestro ensayo, no encontramos diferencias en el número de pupas obtenidas en los diferentes tratamientos. Por su parte, Dougherty et al. (1998), demostraron que extractos de N-formil-lolina (NFL) y N-acetil-lolina (NAL) a una concentración superior a 100 ppm incorporados en la materia fecal de bovinos, causaron 100 y 95% de mortalidad de larvas de la mosca

de los cuernos respectivamente. Además, establecieron que la DL50 de la lolina total fue de 30 ppm. Estos mismos investigadores (Dougherty et al. 1999) reportaron que cuando las moscas de los cuernos son expuestas a materia fecal bovina suplementada con N-formil lolina y ergotamina hay un descenso en el número de pupas recuperadas. De forma similar, Parra et al. (2013) encontraron que el consumo de festuca Kentucky 31 reduce el desarrollo larvario de las moscas cultivadas en heces de bovinos, pero no determinó la concentración de alcaloides en planta ni en materia fecal. Por lo que la sola presencia del hongo no es indicativa de producción (cuales y que cantidad) de alcaloides. Lamentablemente sabemos muy poco acerca del destino y el metabolismo de los ergo-alcaloides y las lolinas en los bovinos. Así como tampoco se sabe cuáles y que cantidad de alcaloides están presentes en la materia fecal de los bovinos que consumen festuca con endófitos. Westerndorf et al. (1993) recuperaron 70% de la ergovalina ingerida en la materia fecal de ovejas que pastoreaban festuca E+, pero no pudieron detectar lolina. Es decir que si bien sabemos la concentración de alcaloides en planta de la que partimos (en el caso de las lolinas totales fue de 897 y 108 ppm para K31 y Fo+ respectivamente), desconocemos la concentración en la que estos alcaloides están presentes en la materia fecal de los bovinos. Por lo que, si la concentración de los mismos fuese menor a 30 ppm (DL50, Dougherty et al. 1998) no hubiéramos visto el efecto insecticida de las larvas como ocurrió en nuestro ensayo. Además, la importancia ecológica de NFL y NAL puede minimizarse si el metabolismo en el tracto gastrointestinal transforma las acil-lolinas en la lolina que es menos activa (Westerndorf et al. 1993).

## 11- CONCLUSIONES

Los animales consumiendo K31 mostraron signos de intoxicación a través de todas las variables medidas: pobre ganancia de peso vivo, temperatura corporal y frecuencia respiratoria elevadas, así como disminución de la concentración de prolactina y presencia de ergo-alcaloides en orina. Esto permite concluir que las condiciones del ensayo permitieron la expresión de los efectos de los ergo-alcaloides.

En los novillos pastoreando Fo+ y Fo-, no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las variables estudiadas, manteniéndose todas dentro de valores normales, por lo que concluimos que la utilización de festuca con el endófito AR584 no afecta los parámetros fisiológicos ni en el desempeño productivo de los animales que la consumen bajo condiciones edafoclimáticas de la región este de Uruguay.

La determinación de la temperatura subcutánea es una buena herramienta de estimación de la temperatura corporal en bovinos que nos permitió además observar que el consumo de ergo-alcaloides no afecta la variación diurna de la temperatura central.

No se encontró un efecto de regulación parasitaria de los alcaloides en el control de la mosca de los cuernos, ni en las formas adultas ni en las larvarias.

## 12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Afroz, A., Howlett, N., Shukla, A., Ahmad, F., Batista, E., Bedard, K., Payne, S., Morton, B., Mansfield, JH., Glendinning, I. (2013). Gustatory receptor neurons in *Monduca sexta* contain a TrpA1- dependent signaling pathway that integrates taste and temperature. *Chem Senses* 38:605-617.
- 2) Agee, CS., Hill, NS. (1994). Ergovaline variability in *Acremonium*-infected tall fescue due to environment and plant genotype. *Crop Sci* 34:221–226.
- 3) Aldrich, CG., Paterson, JA., Tate, JL., Kerley, MS. (1993). The effects of endophyte-infected tall fescue consumption on diet utilization and thermal regulation in cattle. *J Anim Sci* 71:164-170.
- 4) Al-Haidary, A., Al-Hassan, M. (2003). Effect of rationalization of water consumption for evaporative cooling on productivity of dairy cattle. *Indian J Anim Sci* 73:695-698.
- 5) Al-Haidary, A., Spiers, DE., Rottinghaus, GE., Garner, GB., Ellersieck, MR. (2001). Thermoregulatory ability of beef heifers following intake of endophyte-infected tall fescue during controlled heat challenge. *J Anim Sci* 79:1780–1788.
- 6) Allen VG., Batello, C., Berretta, EJ., Hodgson, J., Kothmann, M., Li, X., Mclvor, J., Milne, J., Morris, C., Peeters, A., Sanderson, M. (2011). An international terminology for grazing lands and grazing animals. *Grass Forage Sci* 66:2–28.
- 7) Arechavaleta, M., Bacon, CW., Plattner, RD., Hoveland, CS., Radcliffe, DE. (1992). Accumulation of ergopeptide alkaloids in symbiotic tall fescue grown under deficits of soil water and nitrogen fertilizer. *Appl Environ Microbiol* 58 (3):857-861.
- 8) Arias, R., Mader TL. (2009). Effects of environmental factors on body temperature of feedlot cattle. Animal Science Department, University of Nebraska-Lincoln. Nebraska Beef Cattle Reports, Paper 510.
- 9) Assuero, SG., Tognetti, JA., Colabelli, MR., Agnusdei, MG., Petroni, EC., Posse, MA. (2006). Endophyte infection accelerates morphophysiological responses to water deficit in tall fescue. *N Z J Agric Res* 49(4):359-370.
- 10) Assuero, SG., Matthew, C., Kemp, PD. (2000). Morphological and physiological effects of water deficit and endophyte infection on contrasting tall fescue cultivars. *N Z J Agric Res* 43(1):49-61.
- 11) Bacon, CW. (1995). Toxic Endophyte-infected fescue and range grasses: historic perspective. *J Anim Sci* 73:861-870.

- 12) Bacon, CW. (1993). Abiotic stress tolerances (moisture, nutrients) and photosynthesis in endophyte infected tall fescue. *Agric Ecosyst Environ* 44:123–141.
- 13) Bacon, CW., De Battista, J. (1991). Endophytic fungi of grasses. In: Arora, DK., Rai, B., Mukerji, KG., Knudsen, GR. *Handbook of Applied Mycology*. Ed. Marcel Dekker, Inc. New York, Vol 1, pp. 231-257.
- 14) Bacon, CW., Siegel, MR. (1988). Endophyte parasitism of tall fescue. *J Prod Agric* 1:45-55.
- 15) Bacon, CW., Porter, JK., Robbins, JD., Lutrell, ES. (1977). *Epichl e typhina* from toxic tall fescue grasses. *Appli Environ Microbiol* 34(5): 576-581.
- 16) Baldauf, MW., Mace, WJ., Richmond, DS. (2011). Endophyte-mediated resistance to black cutworm as function of plant cultivar and endophyte strain in tall fescue. *Environ Entomol* 40(3): 639-647.
- 17) Barker, DJ., Davies, D., Lane, GA., Latch, GCM., Nott, HM.; Tapper, B.A. (1993). Effect of water deficit on alkaloid concentrations in perennial ryegrass endophyte associations. In: *Proceedings of the Second International Symposium on Acremonium/Grass Interactions*. Eds. Hume, DE., Latch, GCM., Easton, HS. Palmerston North, New Zeland, AgResearch Grassland Research Centre, pp. 67-71.
- 18) Barnett, PS., Palazidou, E., Mitchell, JP., Coskeran, PB., Butler, J., Dawson, JM., Maccabe, J., McGregor, AM. (1991). Endocrine function, psychiatric and clinical consequences in patients with macroprolactinomas after long-term treatment with the new non-ergot dopamine agonist CV205–502. *Q J Med* 81:891–906.
- 19) Beck, PA., Gunter, SA., Lusby, KS, West, CP., Watkins, KB., Hubbell III, DS. (2008). Animal performance and economic comparison of novel and toxic endophyte tall fescues to cool-season annuals. *J Anim Sci* 86:2043-2055.
- 20) Beede, DK., Collier, RJ. (1986). Potential nutritional strategies for intensively managed cattle during thermal stress. *J Anim Sci* 62:543-554.
- 21) Belesky, DP., West, CP. (2009). Abiotic stresses and endophyte effects. In: Fribourg, HA., Hannaway, DB., West, CP. *Tall fescue for the Twenty-first Century*. Ed. Lisa Al-Amoodi, *Agronomy Monograph* 53, ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI, Cap. 4, pp.49-64.
- 22) Berde, B., Strumer, E. (1978). Introduction to the pharmacology of ergot alkaloids and related compounds as a basis of their therapeutic application. In: *Ergot alkaloids and related compounds, Handbook of experimental pharmacology*. Eds. Berde, B., Schild, HO., Springer-Verlag, Berlin, Vol. 49, pp. 1-28.
- 23) Bidega n, M. (2008). Proceso de cambio climático y el desafío en la producción de pasturas. En XXII Reunión del grupo técnico en forrajeras del

Cono Sur. Bioma Campos. Minas, Uruguay, pp.43-45.

24) Bond, J., Powell, JB., Weinland, BT. (1984). Behavior of steers grazing several varieties of tall fescue during summer conditions. *Agron J* 76:707-709.

25) Bouton, JH., Easton, HS. (2005). Endophytes in forage cultivars. In: *Neotyphodium in Cool Season Grasses*. Ed. Roberts, CA., West, CP., Spiers, DE. Blackwell Publishing Asia, Ames, Cap. 15, pp 327-340.

26) Bouton, JH., Hopkins, AA. (2003). Commercial applications of endophytic fungi. In: *Clavicipitalean fungi: Evolutionary biology, chemistry, biocontrol, and cultural impacts*. Eds. White Jr., JF., Bacon, CW., Hywel-Jones, NL., Spatafora, JW. Marcel Dekker, New York, Cap. 17, pp. 495-516.

27) Bouton, JH., Latch, GCM., Hill, NS., Hoveland, CS., McCann, MA., Watson, RH., Parish, JA., Hawkins, LL., Thompson, FN. (2002). Re-infection of tall fescue cultivars with non-ergot alkaloid-producing endophytes. *Agron J* 94:567-574.

28) Bouton, JH., Gates, RN., Belesky, DP., Owsley, M. (1993). Yield and persistence of tall fescue in the southeastern Coastal Plain after removal of its endophyte. *Agron J* 85(1):52-55.

29) Breijo, M., Pastro, L., Rocha, S., Ures, X., Alonso, P., Santos, M., Bolatto, C., Fernandez, C., Meikle, A. (2016). A natural cattle immune response against horn fly (*Dipera: Muscidae*) salivary antigens may regulate parasite blood intake. *J Econ Entomol* 109(4):1951-1956.

30) Breijo, M., Rocha, S., Ures, X., Pedrana, G., Alonzo, P., Meikle, A. (2013). Accessibility to blood affects the attractiveness of cattle to horn flies. *Med Vet Entomol* 111:1 -3.

31) Brown, KR., Anderson, GA., Son, K., Rentfrow, G., Bush, LP., Klotz, JL., Strickland, JR., Boling, JA., Matthews, JC. (2009). Growing steers grazing high versus low endophyte (*Neotyphodium coenophialum*)-infected tall fescue have reduced serum enzymes, increased hepatic glucogenic enzymes, and reduced liver and carcass mass. *J Anim Sci* 87: 748-760.

32) Brown, MA., Steelman, CD., Tolley, G., Jackson, WG. (1993). Genotype x environment interactions in horn fly (*Diptera: Muscidae*) resistance in Angus, Brahman, and reciprocal crossbred cows on common bermudagrass or endophyte-infected tall fescue. *Prof Anim Sci* 9:178-182.

33) Brown-Brandl, TM. Nienaber, JA., Eigenberg, RA., Hahn, GL., Freetly, H. (2003). Thermoregulatory responses of feeder cattle. *J Therm Biol* 28:149-157.

34) Browning Jr., R., Schrick, FN., Thompson, FN., Wakefield Jr., T. (2001). Effect of an acute ergotamine challenge on reproductive hormones in follicular phase heifers and progesterin-treated cows. *Anim Repr Sci* 66:135-

149.

- 35) Browning Jr., R., Thompson, FN., Sartin, JL., Leite-Browning, ML. (1997). Plasma concentrations of prolactin, growth hormone, and luteinizing hormone in steers administered ergotamine or ergonovine. *J Anim Sci* 75:796-802.
- 36) Bush, LP., Fannin, FF. (2009). Alkaloids. In: Fribourg, HA., Hannaway, DB., West, CP. Tall fescue for the Twenty-first Century. Ed. Lisa Al-Amoodi, Agronomy Monograph 53, ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI, Cap. 13, pp.229-249.
- 37) Bush, LP., Wilkinson, HH., Scharld, C. (1997). Bioprotective Alkaloids of Grass-Fungal Endophyte Symbioses. *Plant Physiol* 114:1-7.
- 38) Bush, LP., Schmidt, D. (1994). Alkaloid content of meadow fescue and tall fescue with their natural endophytes. In: Krohn, K. Int. Conf. Harmful Beneficial Microorganisms in Grasslands, Pastures and Turf. 1993. Int. Org. Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants, Paderborn, Germany, p. 259-266.
- 39) Bush, LP., Fannin, FF., Siegel, MR., Dahlman, DL., Burton, HR. (1993). Chemistry, occurrence and biological effects of saturated pyrrolizidine alkaloids associated with endophyte-grass interactions. *Agric Ecosyst Environ* 44:81-102.
- 40) Bush, LP., Burrus Jr., PB. (1988). Tall fescue forage quality and agronomic performance as affected by endophyte. *J Prod Agri* 1(1):55-60.
- 41) Byford, RL., Craig, ME., Crosby, BL. (1992). A review of ectoparasites and their effect on cattle production. *J Anim Sci* 70(2):597–602.
- 42) Carballo, M., Martinez, M. (1991). Hallazgo de *Haematobia irritans* en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)* 27:20–21.
- 43) Carr, SB., Jacobson, DR. (1969). Bovine physiological responses to toxic fescue and related conditions for application in a bioassay. *J Dairy Sci* 52:1792–1799.
- 44) Castro, E., Gil, A, Piaggio, J., Chifflet, L., Farias, NA., Solari, MA, Moon, RD. (2008). Population dynamics of horn fly, *Haematobia irritans irritans* (L.) (Diptera: Muscidae), on Hereford cattle in Uruguay. *Vet Parasitol* 151(2-4):286–299.
- 45) Cavestany, D., Blanc JE., Kulcsar, M., Uriarte, G., Chilbroste, P., Meikle, A., Febel, H., Ferraris, A., Krall, E. (2005). Studies of the transition cow under a pasture-based milk production system: metabolic profiles. *J Vet Med Physiol Pathol Clin Med* 52(1):1-7.
- 46) Cheeke, PR. (1995). Endogenous toxins and mycotoxins in forage grasses and their effects on livestock. *J Anim Sci* 73:909-918.

- 47) Cincotta, AH., Meier, AH. (1989). Reductions of body fat stores and total plasma cholesterol and triglyceride concentrations in several species by bromocryptine treatment. *Life Sci* 45:2247–2254.
- 48) Clay, K., Hardy, TN., Hammond Jr., AM. (1985). Fungal endophytes of grasses and their effects on an insect herbivore. *Oecologia*. 66(1):1-5.
- 49) Cross, DL., Redmond, LM., Strickland, JR. (1995). Equine fescue toxicosis: signs and solutions. *J Anim Sci* 73:899-908.
- 50) Cunningham, J. (2003). *Fisiología veterinaria*. Ed. Klein, BG. 5º ed. Elsevier, España.
- 51) Cupp, M., Cupp, E., Navarre, C., Wisnewski, N., Brandt, K., Gary, M., Dunhua, Z., Panangala, V. (2004). Evaluation of a recombinant salivary gland protein (thrombostasin) as a vaccine candidate to disrupt blood-feeding by horn flies. *Vaccine* 22:2285–2297.
- 52) Curlewis JD, 1992 Seasonal prolactin secretion and its role in seasonal reproduction: a review. *Reprod Fertil Dev* 4:1-23.
- 53) D'Amato, LA., Knapp, FW., Dahlman, DL. (1980). Survival of face fly in feces from cattle fed alfalfa hay or grain diets: effect of fermentation and microbial changes. *Environ Entomol* 9:557-560.
- 54) Davenport, GM., Boling, JA., Rahe, CH. (1993). Growth and endocrine responses of cattle to implantation of estradiol-17 beta during continuous or discontinuous grazing of high- and low-endophyte-infected tall fescue. *J Anim Sci* 71:757-764.
- 55) De Lorme, MJM., Lodge-Ivey, SL., Craig, AM. (2007). Physiological and digestive effects of *Neotyphodium coenophialum*-infected tall fescue fed to lambs. *J Anim Sci* 85:1199-1206.
- 56) De Souza, AP., Bellato, V., Ramos, Cl., Dalagnol, CA., Henschel, GDS. (2005). Seasonal variation of *Haematobia irritans* in the Santa Catarina State plateau and efficiency of the Directed Control. *Rev Bras Parasitol Vet* 14(1): 5-11.
- 57) Diaz-Torga, GS., Mejía, ME., Gonzalez-Iglesias, A., Formía, N., Becú-Villalobos, D., Lacau-Mengido, IM. (2001). Metabolic cues for puberty onset in free grazing Holstein heifers naturally infected with nematodes. *Theriogenology* 56:111-122.
- 58) Dougherty, CT, Knapp, W., Bush, LP. (1999). Mortality of horn fly larvae (Diptera: Muscidae) in bovine dung supplemented with ergotamine and *N*-Formyl Loline. *Med Entomol* 36(1): 73-77.
- 59) Dougherty, CT., Knapp, W., Bush, LP., Maul, JE., Van Willige, J. (1998). Mortality of horn fly larvae (Diptera: Muscidae) in bovine dung supplemented with loline alkaloids from tall fescue. *J Med Entomol* 35(5): 798-803.

- 60) Dyer, DC. (1993). Evidence that ergovaline acts on serotonin receptors. *Life Sci* 53: 223-228.
- 61) Easton, HS., Lane, GA., Tapper, BA., Keogh, RG., Cooper, BM., Blackwell, M., Anderson, M., Fletcher, LR. (1996). Ryegrass endophyte related heat stress in cattle. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association* 57: 37–41.
- 62) Eckert, H., Kiechel, JR., Rosenthaler, J., Schmidt, R., Schreier, E (1978). Biopharmaceutical aspects: Analytical methods, pharmacokinetics, metabolism and bioavailability. In: *Ergot alkaloids and related compounds, Handbook of experimental pharmacology*. Eds. Berde, B., Schild, HO., Springer-Verlag, Berlin, Vol. 49, pp. 719-803.
- 63) Emile, JC., Bony, S., Ghesquiére, M. (2000). Influence of consumption of endophyte-infested tall fescue hay on performance of heifers and lambs. *J Anim Sci* 78:358-364.
- 64) Evans, TJ., Rottinghaus, GE., Casteel, SW. (2004). Fescue. In: Plumlee, KH. ed. *Clinical Veterinary Toxicology*. Mosby, St. Louis, MO, pp. 243-250.
- 65) Finch, AV. (1986). Body temperature in beef cattle: Its control and relevance to production in the tropics. *J Anim Sci* 62:531-542.
- 66) Fletcher, LR. (1999). “Non-toxic” endophytes in ryegrass and their effect on livestock health and production. *Grassland Research and Practice Series* 7:133-139.
- 67) Fletcher, LR., Sutherland, BL., Fletcher, CG., Easton, HS. (1996). The impact of endophyte toxins on the health of grazing sheep-an evolving story. In: *Proceedings of the 2<sup>o</sup> Pan Pacific Veterinary Conference-Sheep*: 31–42.
- 68) Formoso, F. (2011). Manejo de mezclas forrajeras y leguminosas puras. *Producción y calidad del forraje. Efectos del estrés ambiental e interferencia de gramilla*. Montevideo: INIA, 302 p (INIA Serie Técnica;188).
- 69) Franks, R., Burns, E., England, N. (1963). Color preference of the horn fly, *Haematobia irritans*, on beef cattle. *J Econ Entomol* 57(3):371-372.
- 70) Freeman, ME., Kanyicska, B., Lerant, A., Nagy, G. (2000). Prolactin: Structure, function and regulation of secretion. *Physiol Rev* 80: 1523-1631.
- 71) Glenn, AF., Bacon CW., Price R., Hanlin TR. (1996). Molecular phylogeny of *Acremomiun* and its taxonomic implications. *Mycologia* 88:369-383.
- 72) Goetsch, AL., Jones, AL., Stokes, SR., Beers, KW., Piper, EL. (1987). Intake, digestion, passage rate, and serum prolactin in growing dairy steers fed endophyte-infected fescue with noninfected fescue, clover, or wheat straw. *J Anim Sci* 64:1759-1768.

- 73) Gomez, A., Lopez, A. (1991). Effect of season on plasma concentrations of prolactin and cortisol in pregnant, non-pregnant and lactating ewes. *Anim Reprod Sci* 26(3-4):251-268.
- 74) Guglielmone, AA., Castelli, ME., Volpogni, MM., Anziani, OS., Mangold, AJ. (2002). Dynamics of cypermethrin resistance in the field in the horn fly, *Haematobia irritans*. *Med Vet Entomol*16(3):310–315.
- 75) Guglielmone, AA., Gimeno, E., Idiart, J., Fisher, WF., Volpogni, MM., Quaino, O., Warnke, O. (1999). Skin lesions and cattle hide damage from *Haematobia irritans* infestations. *Med Vet Entomol* 13(3):324–329.
- 76) Gwinn, KD., Shepard-Collins, MH., Reddick, BB. (1991). Tissue print-immunoblot: an accurate method for the detection of *Acremonium coenophialum* in tall fescue. *Phytopathology* 81:747-748.
- 77) Hannaway, DB., Daly, C., Halbleib, MD., James, D., West, CP., Volenec, JJ., Chapman, D., Li, X., Cao, W., Shem, J., Shi, X., Johnson, S. (2009). Development of suitability maps with examples for the United States and China. In: Fribourg, HA., Hannaway, DB., West, CP. Tall fescue for the Twenty-first Century. Ed. Lisa Al-Amoodi, Agronomy Monograph 53, ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI, Cap. 3, pp.33-48.
- 78) Hemken, RW., Jackson Jr., JA., Boling, JA. (1984). Toxic factors in tall fescue. *J Anim Sci* 58:1011-1016.
- 79) Hemken, RW., Boling, JA., Bull, LS., Hatton, RH., Buckner, RC., Bush, LP. (1981). Interaction of environmental temperature and anti-quality factors on the severity of summer fescue toxicosis. *J Anim Sci* 52:710-714.
- 80) Hemken, RW., Bull, LS., Boling, JA., Kane, E., Bush, LP., Buckner RC. (1979). Summer fescue toxicosis in lactating dairy cows and sheep fed experimental strains of ryegrass-tall fescue hybrids. *J Anim Sci* 49: 641-646.
- 81) Hiatt III, EE., Hill, NS., Bouton, JH., Stuedemann, JA. (1999). Tall fescue endophyte detection: commercial immuno-blot test kit compared with microscopic analysis. *Crop Sci* 39:796-799.
- 82) Hill, NS., Roach, PK. (2009). Endophyte survival during seed storage: endophyte-host interactions and heritability. *Crop Sci* 49:1425-1430.
- 83) Hill, NS., Hiatt III, EE., De Battista, JP., Costa, MC., Griffiths, CH., Klap, J., Thorogood, D., Reeves, JH. (2002). Seed testing for endophytes by microscopic and immunoblot procedures. *Seed Sci Technol* 30:347-355.
- 84) Hill, NS., Thompson, FN., Stuedemann, JA., Rottinghaus, GW., Ju, HJ., Dawe, DL., Hiatt III, EE. (2001). Ergot alkaloid transport across ruminant gastric tissues. *J Anim Sci* 79:542-549.
- 85) Hill, NS., Thompson, FN., Stuedemann, JA., Dawe, DL., Hiatt III, EE. (2000). Urinary alkaloid excretion as a diagnostic tool for fescue toxicosis in cattle. *J Vet Diagn Invest* 12: 210-217.

- 86) Hill, NS., Rottinghaus, GE., Agee, CS., Schultz, LM. (1993). Simplified Sample Preparation for HPLC Analysis of Ergovaline in Tall Fescue. *Crop Sci* 33:331-333.
- 87) Hill, NS., Belesky, DP., Stringer, WC. (1991). Competitiveness of tall fescue as influenced by *Acremonium coenophialum*. *Crop Sci* 31:185-190.
- 88) Hollis, JH., Knapp, FW., Dawson, KA. (1985). Influence of bacteria within feces on the development of the face fly (Diptera: Muscidae). *Environ Entomol* 14: 568-571.
- 89) Hopkins, AA., Young, CA., Panaccione, DG., Simpson, WR., Mittala, S., Bouton, JH. (2010). Agronomic performance and lamb health among several tall fescue novel endophyte combinations in the South-Central USA. *Crop Sci* 50:1552-1561.
- 90) Hoveland, CS. (1993). Importance and economic significance of the *Acremonium* endophytes to performance of animals and grass plant. *Agric Ecosyst Environ* 44:3-12.
- 91) Hoveland, CS., Schmidt, SP., King Jr., CC., Odom, JW., Clark, EM., McGuire, JA., Smith, LA., Grimes, HW., Holliman, JL. (1983). Steer performance and association of *Acremonium coenophialum* fungal endophyte on tall fescue pasture. *Agron J* 75:821-824.
- 92) Howard, M.D., Muntifering, RB., Bradley, NW., Mitchell Jr., GE., Lowry, SR. (1992). Voluntary intake and ingestive behavior of steers grazing Johnstone or endophyte-infected Kentucky-31 tall fescue. *J Anim Sci* 70:1227-1237.
- 93) Hunt, MG., Newman, JA. (2005). Reduced herbivore resistance from a novel grass– endophyte association. *J Appl Ecol* 42:762-769.
- 94) Jackson, JR., Hemken Jr., RW., Boling, JA., Harmon, R.J., Buckner, RC., Bush, LP. (1984). Summer fescue toxicity in dairy steers feed tall fescue seed. *J Anim Sci* 58:1057-1061.
- 95) Jacobson, DR., Carr, SB., Hatton, RH., Buckner, RC., Graden, AP., Downen, DR., Millerl, WM. (1969). Growth physiological responses, and evidence of toxicity in yearling dairy cattle grazing different grasses. *J Dairy Sci* 53:575-587.
- 96) Johnson, JM., Aiken, GE., Phillips, TD., Barrett, M., Klotz, JL., Schrick, FN. (2012). Steer and pasture responses for a novel endophyte tall fescue developed for the upper transition zone. *J Anim Sci* 90: 2402-2409.
- 97) Joost, RE. (1995). *Acremonium* in fescue and ryegrass: boon or bane? A review. *J Anim Sci* 73:881-888.
- 98) Kallenbach, RL., Bishop-Hurley, GJ., Massie, MD., Rottinghaus, GE., West, CP. (2003). Herbage mass, nutritive value, and ergovaline concentration of stockpiled tall fescue. *Crop Sci.* 43:1001-1005.

- 99) Karg, H., Schams, D. (1974). Prolactin release in cattle. *J Reprod Fert* 39:463-472.
- 100) Kendall, PE., Nielsen, PP., Webster, JR., Verkerk, GA., Littlejohn, RP., Matthews, LR. (2006). The effects of providing shade to lactating dairy cows in a temperate climate. *Livest Sci* 103:148-157.
- 101) Kuramochi, K. (2000). Survival, ovarian development and bloodmeal size for the horn fly *Haematobia irritans irritans* reared in vitro. *Med Vet Entomol* 14(2):201-206.
- 102) Lacefield, G., Ball, D., Hoveland, C. (2004). Tall fescue-endophyte-animal relations: historical perspective. In: Cassida, K. Proc. Am. Forage and Grassl. Co. Conf. Roanoke, VA. 13:120-124.
- 103) Larson, BT., Samford, MD., Camden, JM. Piper, EL., Kerley, MS., JA. Patterson, Turner, JT. (1995). Ergovaline binding and activation of D2 dopamine-receptors in GH (4) ZR (7) cells. *J Anim Sci* 73:1396-1400.
- 104) Latch, GCM. (1994). Influence of Acremonium endophytes on perennial grass improvement. *N Z J Agr Res* 38: 311-318.
- 105) Leuchtman A., Bacon CW., Schardl CL, White Jr., JF., Tadych M. (2014). Nomenclatural realignment of *Neotyphodium* species with genus *Epicholë*. *Mycologia* 106(2):202-15.
- 106) Lima, LGF., Prado, AP., Perri, SHV. (2002). Comparison of two methods (visual estimates and filming) for counts of horn flies (*Haematobia irritans irritans*) (L.) (Diptera: Muscidae). *Vet Parasitol* 103(3):227–235.
- 107) Lyons, PC., Plattner, RD., Bacon, CW. (1986). Occurrence of peptide and clavinet ergot alkaloids in tall fescue grasses. *Science* 232:487-489.
- 108) Maddaloni, J., Ferrari, L. (2001). *Festuca alta*. In: Forrajeras y pasturas del ecosistema templado húmedo de la Argentina. Eds. Maddaloni, J., Ferrari, L. INTA -Universidad Nacional de Lomas de Zamora, Facultad de Ciencias Agrarias, Argentina, pp.165-182.
- 109) Mader TL., Davies, MS., Brown-Brandl, T. (2006). Environmental factors influencing heat stress in feedlot cattle. *J Anim Sci* 84:de712-719.
- 110) Malinowski, DP., Belesky, DP., Hill, NS., Baligar, VC., Fedders, JM. (1998). Influence of phosphorus on the growth and ergot alkaloid content of *Neotyphodium coenophialum*-infected tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Plant Soil* 198:53-61.
- 111) Matthews, AK., Poore, MH., Huntington, GB., Green, JT. (2005). Intake, digestion, and N metabolism in steers fed endophyte-free, ergot alkaloid-producing endophyte-infected, or nonergot alkaloid-producing endophyte-infected fescue hay. *J Anim Sci* 83:1179-1185.
- 112) Mayland, HF., Cheeke, PR. (1995). Forage-induced Animal Disorders.

In: Forages: The Science of Grassland Agriculture. Eds. Barnes, RF., Miller, DA., Nelson, CJ., 5<sup>o</sup> ed. Iowa State University Press, Ames, Vol. 2, pp. 121-135.

113) McCarthy, MS., Hafs, HD., Convey, EM. (1979). Serum hormone patterns associated with growth and sexual development in bulls. *J Anim Sci* 49: 1012-1020.

114) McClanahan, LK., Aiken, GE., Dougherty, CT. (2008). Case study: Influence of rough hair coats and steroid implants on the performance and physiology of steers grazing endophyte-infected tall fescue in the summer. *PAS* 24(3):269-276.

115) Meyer, JA., C. Christensen, C., Knapp, FW. (1978). The influence of various levels of ground ear corn and alfalfa hay in the bovine diet on the development of the face fly. *Environ Entomol* 7: 829-830.

116) MGAP. DIEA. Anuario estadístico agropecuario 2016. Disponible en: [http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/exportaciones\\_e\\_importaciones\\_p\\_esqueras\\_por\\_ano\\_-\\_anuario\\_diea\\_2016.pdf](http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/exportaciones_e_importaciones_p_esqueras_por_ano_-_anuario_diea_2016.pdf). Fecha de consulta: 8/12/2016.

117) MGAP. DIEA. Anuario estadístico agropecuario 2015. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/unidad-ejecutora/oficina-de-programacion-y-politicas-agropecuarias/publicaciones/anuariosdiea/anuario2015>. Fecha de consulta: 8/3/2016.

118) MGAP. Adaptación y mitigación al cambio climático en sistemas agropecuarios del Uruguay. Informe final- agosto 2011, pp.17-23.

119) Miller, RW. (1994). Inhibition of house flies and stable flies (Diptera: Muscidae) in field-spread dairy bedding from cattle treated with diflubenzuron boluses. *J Econ Entomol* 87:402-404.

120) Morgan-Jones, G., Gams, W. (1982). Notes on Hyphomycetes, XLI. An endophyte of *Festuca arundinacea* and the anamorph of *Epichlœ typhina*, new taxa in one of two new sections of *Acremonium*. *Mycotaxon* 15:311–318.

121) Moubarak, AS., Rosenkrans, CF. (2000). Hepatic metabolism of ergot alkaloids in beef cattle by cytochrome P450. *Biochem Biophys Res Commun* 274:746-749.

122) Moubarak, AS., Piper, EL., Johnson, ZB., Flieger, M. (1996). HPLC method for detection of ergotamine, ergosine, and ergine after intravenous injection of a single dose. *J Agric Food Chem* 44:146-148.

123) Muller-Schweinitzer, E., Weidmann, H. (1978). Basic pharmacological properties. In: Ergot alkaloids and related compounds, Handbook of experimental pharmacology. Eds. Berde, B., Schild, HO., Springer-Verlag, Berlin, Vol. 49, pp. 87-232.

124) Nihsen, ME., Piper, EL., West, CP., Crawford, RJ., Denard, TM.,

Johnson,ZB., Roberts,CA., Spiers,DA., Rosenkrans Jr., CF. (2004). Growth rate and physiology of steers grazing tall fescue inoculated with novel endophytes. *J Anim Sci* 82:878-883

125) Oliver, JW. 2005. Pathophysiological response to endophyte toxins. In: *Neotyphodium in Cool Season Grasses*. Ed. Roberts, CA., West, CP., Spiers, DE. Blackwell Publishing Asia, Ames, Cap. 13, pp 291-304.

126) Oliver, JW., Schultze, AE., Rohrbach, BW., Fribourg, HA., Ingle, T., Waller, JC. (2000). Alterations in hemograms and serum biochemical analyses of steers after prolonged consumption of endophyte-infected tall fescue. *J. Anim. Sci.* 78:1029-1035.

127) Oliver, JW. (1997). Physiological manifestations of endophyte toxicosis in ruminant and laboratory species. In: *Bacon, CW, Neotyphodium/Grass Interactions*. Ed. Bacon, CW. Hill, NS. Springer US, New York, Cap. 56, pp311–346.

128) Osborn, TG., Schmidt, SP., Marple, DN., Rahe, CH., Steenstra, JR. (1992). Effect of consuming fungus-infected and fungus-free tall fescue and ergotamine tartrate on selected physiological variables of cattle in environmentally controlled conditions. *J Anim Sci* 70:2501-2509.

129) Oyarzún, MP., Quiroz, A., Birkett, MA. (2008). Insecticide resistance in the horn fly: alternative control strategies. *Med Vet Entomol* 22(3):188-202.

130) Oyhantçabal, W. (2009). Tomando conciencia del cambio climático. *Revista Plan Agropecuario* nº129; 12-13.

131) Panaccione, DG., Johnson, RD., Wang, J., Young, CA., Damronhkoool, P., Scott, B., Schardl, CL. (2001). Elimination of ergovaline from a grass-*Neotyphodium* endophyte symbiosis by genetic modification of the endophyte. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(22):12820-12825.

132) Parish, JA., McCann, MA., Watson, RH., Hoveland, CS., Hawkins, LL., Hill, NS., Bouton, JH. (2003a). Use of non-ergot alkaloid-producing endophytes for alleviating tall fescue toxicosis in sheep. *J Anim Sci* 81:1316-1322.

133) Parish, JA., McCann, MA., Watson, RH., Paiva, NN., Hoveland, CS., Parks, H., Upchurch, BL. Hill, NS., Bouton, JH. (2003b). Use of non-ergot alkaloid-producing endophytes for alleviating tall fescue toxicosis in stocker cattle. *J Anim Sci* 81:2856-2868.

134) Parra, L., Rojas, C., Catrileo, A., Galdames, R., Mutis, A., Birkett, M., Quiroz, A. (2013). Differences in the fly-load of *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) on cattle is modified by endophyte infection of pastures. *Electron J Biotec* 15 (5)-4p.

135) Paterson, J., Forcherio, B., Larson, B., Samford, M., Kerley, M. (1995). The effects of fescue toxicosis on beef cattle productivity. *J Anim Sci* 73:889-898.

- 136) Pedersen, JF., McGuire, JA., Schmidt, SP., King Jr., CC., Hoveland, CS., Smith, LA. (1986). Steer performance as affected by tall fescue cultivar and level of *Acremonium coenophialum* infection. N Z J Exp Agric 14(3):307-312.
- 137) Pertz, H., Eich, E. (1999). Ergot alkaloids and their derivatives as ligands for serotonergic, dopaminergic, and adrenergic receptors. In: Medicinal and Aromatic Plants. Eds. Kren, V, Cvak, L., Industrial Profiles, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, Vol. 6, pp 411-440.
- 138) Peters, RR., Chapin, LT., Emery, RS., Tucker, HA. (1981). Milk yield, feed intake, prolactin, growth hormone, and glucocorticoid response of cows to supplemented light. J Dairy Sci 64:1671-1678.
- 139) Popay, AJ., Hume DE., Baltus JG., Latch GCM., Tapper BA., Lyons TB., Cooper BM., Pennell CG., Eerens JP., Marshall S.L. (1999). Field performance of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) infected with toxin-free fungal endophytes (*Neotyphodium spp.*). Ryegrass endophyte: an essential New Zealand symbiosis. Grassland Research and Practice Series 7:112-122.
- 140) Popay, AJ., Rowan, DD. (1994). Endophytic fungi as mediators of plants-insect interactions. In: Bernays Ed. Insect plants interaction. CRC Press, Vol. 5, pp.83-103.
- 141) Porter, JK. (1995). Analysis of endophyte toxins: fescue and other grasses toxic to livestock. J Anim Sci 73:871-880.
- 142) Porter, JK., Thompson Jr., FN. (1992). Effects of fescue toxicosis on reproduction in livestock. J Anim Sci 70:1594-1603.
- 143) Powell, RG., TePaske, MR., Plattner, RD., Petroski, RJ. (1993). Recent progress in the chemistry of grass/fungal interactions. In: Proc. 2<sup>o</sup> Int. Symp. on *Acremonium/Grass Interactions: Plenary Papers*. Ed. Hume, DE. NZ AgResearch, Palmerston North, New Zeland, pp. 57-85.
- 144) Read, JC., Camp, BJ. (1986). The effect of the fungal endophyte *Acremonium coenophialum* in tall fescue on animal performance, toxicity and stand maintenance. Agron J 78:848-850.
- 145) Reddick, BB. (1988). Detection of the tall fescue endophyte with emphasis on enzyme-linked immunosorbent assay. J Prod Ag 1:133-136.
- 146) Riedell, WE., Kieckhefer, RE., Petroski, RJ., Powell, RG. (1991). Naturally occurring and synthetic loline alkaloid derivatives: insect feeding behavior modification and toxicity. J Entomol Sci 26(1):122-129.
- 147) Rhodes, MT., Paterson, JA., Kerlye, MS., Garner, HE., Laughlin, MH. (1991). Reduced blood flow to the peripheral and core body tissues in sheep and cattle induced by endophyte-infected tall fescue. J Anim Sci 69:2033-2041.
- 148) Rice, RK., Blodgett, DJ., Schurig, GG., Swecker, WS., Fontenot, JP.,

Allen, VG., Akers, RM. (1997). Evaluation of humoral immune responses in cattle grazing endophyte-infected or endophyte-free fescue. *Vet Immunol Immunopathol* 59:285–291.

149) Roberts, C., Andrae, J. (2004). Tall Fescue Toxicosis and Management. [en línea]. *Crop Management*. doi:10.1094/CM-2004-0427-01-MG.

150) Rodríguez-Gallegos, CE., Acosta-Rodríguez, MR. (2011). Genetic and environmental factors influencing the resistance of terminal cross calves to tick *Rhipicephalus (boophilus) microplus* and horn fly *Haematobia irritans*. *Trop Subtrop Agroecos* 13:437-444.

151) Rottinghaus, GE., Garner, JGB., Cornel, CN., Ellis, JL. (1991). HPLC Method for quantitating ergovaline in endophyte-infested tall fescue: seasonal variation of ergovaline levels in stems with leaf sheaths, leaf blades, and seed heads. *J Agric Food Chem* 39:112-115.

152) Roylance, JT., Hill, NS., Agee, CS. (1994). Ergovaline and peramine production in endophyte-infected tall fescue: Independent regulation and effects of plant and endophyte genotype. *J Chem Ecol* 20:2171-2183.

153) Rutschmann, J., Stadler, PA. (1978). Chemical background. In: Ergot alkaloids and related compounds, *Handbook of experimental pharmacology*. Eds. Berde, B., Schild, HO., Springer-Verlag, Berlin, Vol. 49, pp. 29-85.

154) Samra, M., Abcar, AC. (2012). False estimates of elevated creatinine. *Perm J* 16(2):51-52.

155) SAS Institute Inc. 2002. The SAS System for Windows Version 8.0. SAS Inst., Cary NC.

156) Schardl, CL., Panaccione, DG. (2005). Biosynthesis of ergot and loline alkaloids. In: Roberts, CA., West, CP., Spiers, DE., *Neotyphodium* in cool-season grasses. Ed. Donald E. Spiers, Blackwell Publishing, Ames, Cap. 2, pp. 75-92.

157) Schardl, CL., Leuchtman, A., Spiering, MJ. (2004). Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Annu Rev Plant Biol* 55:315-340.

158) Schmidt, SP., Osborn, TG. (1993). Effects of endophyte-infected tall fescue on animal performance. *Agric Ecosyst Environ* 44:233-262.

159) Schmidt, SP., Hoveland, CS., Clark, EM, Davis, ND., Smith, LA., Grimes, HW., Hollimann, JL. (1982). Association of an endophyte fungus with fescue toxicity in steers fed Kentucky 31 tall fescue seed and hay. *J Anim Sci* 55:1259-1263.

160) Settivari, RS., Evans, TJ., Rucker, E., Rottinghaus, GE., Spiers, DE. (2008). Effect of ergot alkaloids associated with fescue toxicosis on hepatic cytochrome P450 and antioxidant proteins. *Toxicol Appl Pharmacol* 227:347-356.

- 161) Siegel, MR., Bush, LP. (1996). Defensive chemicals in grass-fungal endophyte associations. In: Phytochemical diversity and redundancy in ecological interactions. Ed. Romeo, JT. Plenum Press, New York, Vol. 30, pp. 81-119.
- 162) Siegel, MR., Latch, GCM., Bush, LP., Fannin, FF., Rowan, DD., Tapper, BA. Bacon, CW., Johnson, MC. (1990). Fungal endophyte-infected grasses: Alkaloid accumulation and aphid response. *J Chem Ecol* 16:3301-3315.
- 163) Siegel, MR., Latch, GCM., Johnson, MC. (1985). *Acremonium* fungal endophytes of tall fescue and perennial ryegrass: significance and control. *Plant Dis* 69:179-183.
- 164) Siegel, MR., Johnson, MC., Varney, DR., Nesmith, WC., Buckner, RC., Bush, LP., Burrus II, PB., Jones, TA., Boling, JA. (1984). A fungal endophyte in tall fescue: Incidence and dissemination. *Phytopathology* 74:932-937.
- 165) Silanikove, N. (2000). Effect of heat stress on the welfare of extensively managed domestic ruminants. *Livest Prod Sci* 67:1-18.
- 166) Simansky, KJ. (1996). Serotonergic control of the organization of feeding and satiety. *Behav Brain Res* 73:37-42.
- 167) Sleper, DA., Mayland, HF., Crawford Jr., RJ., Shewmarker, GE., Massie, MD. (2002). Registration on HiMag tall fescue germplasm. *Crop Sci* 42:318-319.
- 168) Spiering, MJ., Davies, E., Tapper, BA., Schmid, J., Lane, GA. (2002). Simplified extraction of ergovaline and peramine for analysis of tissue distribution in endophyte-infected grass tillers. *J Agric Food Chem* 50:5856-5862.
- 169) Spiers, DE., Eichen, PA., Scharf, B., Settivari, RS., Vellios, H., Johnson, J., Bryant, J., Kishore, D. (2012). Fescue Toxicosis and Heat Stress: Recent Advances. In: *Epichloae, Endophytes of Cool Season Grasses: Implications, Utilization and Biology*. Eds. Young, CA., Aiken, GE., McCulley, RL., Strickland, JR., Schardl, CL., Noble Foundation, Ardmore, OK, Estado Unidos, pp. 20–23.
- 170) Spiers, DE., Eichen, PA., Rottinghaus, GE. (2005). A model of fescue toxicosis: Responses of rats to intake of endophyte-infected tall fescue. *J Anim Sci* 83:1423-1434.
- 171) Strickland, JR., Looper, ML., Matthews, JC., Rosenkrans Jr., CF., Flythe, MD., Brown, KR. (2011). Board-invited review: St. Anthony's fire in livestock: causes, mechanisms, and potential solutions. *J Anim Sci* 89:1603-1626.
- 172) Strickland, JR., Oliver, JW., Cross, DL. (1993). Fescue toxicosis and its impact on animal agriculture. *Vet Human Tox* 35:454-464.

- 173) Strickland, JR., Cross, DL., Jenkins, TC, Petroski, RJ., Powell, RG. (1992). The effect of alkaloids and seed extracts of endophyte-infected fescue on prolactin secretion in an in vitro rat pituitary perfusion system. *J Anim Sci* 70:2779-2786.
- 174) Stuedemann, JA., Hill, NS., Thompson, FN., Fayrer-Hosken, RA., Hay, WP., Dawe, DL. Seman, DH., Martin, SA. (1998). Urinary and biliary excretion of ergot alkaloids from steers that grazed endophyte-infected tall fescue. *J Anim Sci* 76:2146-2154.
- 175) Stuedemann, JA., Thompson, FN. (1993). Management strategies and potential opportunities to reduce the effects of endophyte-infested tall fescue on animal performance. In: Proc. 2<sup>o</sup> Int. Symp. *Acremonium/Grass Interactions: Plenary Papers*. Ed. Hume, DE. NZ AgResearch, Palmerston North, New Zeland, pp.103-114.
- 176) Stuedemann, JA., Hoveland, CS. (1988). Fescue Endophyte: History and impact on animal agriculture. *J Prod Agric* 1: 39-40.
- 177) Stuedemann, JA., Rumsey, TS., Bond, J., Wilkinson, SR., Bush, LP., Williams, DJ., Caudle, AB. (1985). Association of blood cholesterol with occurrence of feet necrosis in cows and tall fescue summer toxicosis in steers. *Am J Vet Res* 46(9):1990-5.
- 178) Takach, JE., Young, CA. (2014). Alkaloid genotype diversity of tall fescue endophytes. *Crop Sci* 54:667-678.
- 179) TePaske, MR., Powell, RG., Clement, SL. (1993). Analyses of selected endophyte-infected grasses for the presence of loline-type and ergot-type alkaloids. *J Agric Food Chem.* 41:2299-2303.
- 180) Thompson, FN., Stuedemann, JA., Hill, NS. (2001). Anti- quality factors associated with alkaloids in Eastern temperate pasture. *J Range Manage* 54(4):474-489.
- 181) Thorn, EC. (1959). The discomfort index. *Weatherwise* 12: 57-59.
- 182) Timper, P., Gates, RN., Bouton, JH. (2005). Response of *Pratylenchus spp.* in tall fescue infected with different strains of the fungal endophyte *Neotyphodium coenophialum*. *Nematology*.7(1):105-110.
- 183) Tor-Agbidye, J., Blythe, LL., Craig, AM. (2001). Correlation of endophyte toxins (ergovaline and lolitrem B) with clinical disease: fescue foot and perennial ryegrass staggers. *Vet Hum Toxicol* 43:140-146.
- 184) Tozer, RS., Sutherst, RW. (1996). Control of horn fly (Diptera: Muscidae) in Florida with an Australian trap. *J Econ Entomol* 89(2):415–420.
- 185) Travasso, M. (2008). Cambio climático y producción forrajera en el noreste argentino. En XXII Reunión del grupo técnico en forrajeras del Cono Sur. *Bioma Campos*. Minas, Uruguay, pp. 47-53.

- 186) Trethewie, ER., Gaffney FM., Gladwell, PJ. (1953). Pharmacological studies of grasses obtained from a property where tall fescue lameness in cattle occurs. *Aust J Exp Biol Med Sci* 32(2):207-211.
- 187) van Heeswijck, R.; McDonald, G. (1992). *Acremonium* endophytes in perennial ryegrass and other pasture grasses in Australia and New Zealand. *Australian. J Agric Res* 43: 1683-1709.
- 188) Waller, JC. (2009). Endophyte effects on cattle. In: Fribourg, HA., Hannaway, DB., West, CP. Tall fescue for the Twenty-first Century. Ed. Lisa Al-Amoodi, Agronomy Monograph 53, ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI, Cap. 16, pp.289-310.
- 189) Watson, RH., McCann, MA., Parish, JA., Hoveland, CS., Thompson, FN., Bouton, JH. (2004). Productivity of cow-calf pairs grazing tall fescue pastures infected with either the wild-type endophyte or a nonergot alkaloid-producing endophyte strain, AR542. *J Anim Sci* 82:3388-3393.
- 190) West, CP., Izekor, KE, Elmi, AA. (1993). Endophyte effects on growth and persistence tall fescue along a water-supply gradient. *Agron J* 85:264-270.
- 191) Westendorf, ML., Mitchell Jr., GE., Tucker, RE., Bush, LP., Petroski, RJ., Powell, RG. (1993). In vitro and in vivo ruminal and physiological responses to endophyte-infected tall fescue. *J Dairy Sci* 76:555-563.
- 192) Woodburn, OJ., Walsh, JR., Foot, JZ., Heazlewood, PG. (1993). Seasonal ergovaline concentrations in perennial ryegrass cultivars of differing endophyte status. In: Proceedings of the 2nd Symposium on *Acremonium/Grass Interactions*. Eds. Hume, DE., Latch, GCM., Easton, HS. Palmerston Nth, New Zealand, pp 100-102.
- 193) Yahdijian, L., Sala, O. (2008). Climate change impacts on South American Rangelands. *Rangelands* 30(3):34-39.
- 194) Yates, SG., Rothfus, JA., Garner, GB., Cornell, CN. (1979). Video thermometry for assay of fescue foot in cattle. *Am J Vet Res* 40(8):1192-1196.
- 195) Young, CA., Hume, DE., McCulley, RL. (2013). Forages and pastures symposium: Fungal endophytes of tall fescue and perennial ryegrass: Pasture friend or foe?. *J Anim Sci*. 91:2379-2394.
- 196) Zanzalari, KP., Heitmann, RN., McLaren, JB., Fribourg, HA. (1989). Effects of endophyte-infected fescue and cimetidine on respiration rates, rectal temperatures and hepatic mixed function oxidase activity as measured by hepatic antipyrine metabolism in sheep. *J Anim Sci* 67: 3370-3378.

