

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**TOXICIDAD DEL RAIGRÁS ANUAL (*Lolium rigidum*) ASOCIADO A UN
COMPLEJO NEMATODO-BACTERIA.**

Por

Leonor SICALO GIANECHINI

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias.

Orientación: Producción Animal.

MODALIDAD: Revisión monografía

MONTEVIDEO

URUGUAY

2017

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

Rodolfo RIVERO

Segundo miembro (Tutor):

Ernesto ODRIEZOLA

Tercer miembro:

Alejandra CAPELLI

Cuarto miembro (Co-tutor):

Lourdes ADRIEN

Fecha:

06/12/2017

Autores:

Leonor SICALO GIANECHINI

AGRADECIMIENTOS

Gracias.

En primer lugar a mi familia y en particular a Leonardo y Fabiana, mis padres, por el apoyo incondicional a lo largo de toda la carrera y en todos los aspectos de mi vida.

A mi abuela, Juanita, que es la luz de mis ojos.

A todos los docentes de Facultad, que de una manera u otra supieron transmitir sus conocimientos y colaborar en mi formación como profesional. Por el apoyo incondicional que me han brindado Ernesto Odriozola, Germán Cantón y Lourdes Adrien, quienes se comprometieron a ayudarme en esta última etapa de mi vida como estudiante de veterinaria. Al jefe de Residentes del INTA Balcarce, Ignacio Llada....gracias!

Y a todas las personas, que extra académicamente estuvieron presentes en este camino de crecimiento como persona...simplemente gracias.

TABLA DE CONTENIDOS

	Pág
Página de aprobación.....	2
Agradecimientos.....	3
Tabla de contenidos.....	4
Lista de figuras.....	5
Resumen.....	6
Summary.....	7
1. Introducción.....	8
2. Objetivos.....	11
2.1 Objetivos generales.....	11
2.2 Objetivos específicos.....	11
3. Materiales y Métodos.....	12
4. Revisión Bibliográfica.....	13
4.1 Mecanismos de defensa vegetal.....	13
4.2 Definición de la enfermedad.....	13
4.3 Etiología.....	14
4.3.1 La bacteria.....	14
4.3.2 Producción de corinetoxinas.....	17
4.3.3 Detección de <i>R.toxicus</i> en el alimento.....	19
4.4 Raigrás Anual.....	20
4.5 <i>Anguina spp.</i>	20
4.6 La enfermedad en el ganado.....	25
4.6.1 Efectos a largo plazo de las toxinas.....	25
4.6.2 Hallazgos de necropsia.....	26
4.6.3 Hallazgos histopatológicos.....	27
4.6.4 Bioquímica sanguínea.....	29
4.6.5 Control y prevención.....	29
4.7 Los agentes como plaga cuarentenaria.....	30
5. Conclusiones.....	35
6. Bibliografía.....	36
7. Glosario.....	44

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Distribución de las enfermedades de importancia económica en Australia, vectorizadas por nematodos del género <i>Anguina</i> spp.....	15
Figura 2. Ejemplar de <i>L. rigidum</i> “sano” (A), ejemplar de <i>L. rigidum</i> con contaminación bacteriana (B).....	16
Figura 3. Estructura química genérica de las corinetoxinas.....	17
Figura 4. Ciclo de vida del nematodo <i>Anguina</i> spp.....	22
Figura 5. Ciclo anual biológico de la ARGT.....	23
Figura 6. Semilla de raigrás normal, semilla con agalla de <i>A. funesta</i> y semilla con agalla bacteriana.....	24
Figura 7. Hígado procedente de un ovino afectado por ARGT.....	27
Figura 8. Hepatocitos de un ovino intoxicado crónicamente con corinetoxinas..	28
Figura 9. Lista de nematodos cuarentenarios para la región según COSAVE, marzo 2016.....	32
Figura 10. Detalle de importaciones de <i>L. multiflorum</i> procedentes de Australia y Nueva Zelanda, para el período comprendido entre 1998-2017.....	34

RESUMEN

La intoxicación con corinetoxinas es un desorden neurológico del ganado bovino, ovino y equino que ocurre en forma de brotes principalmente en Australia. Dicha entidad patológica se produce por el consumo de *Lolium rigidum* asociado a un complejo nematodo-bacteria, que genera toxinas biológicamente iguales a los antibióticos del grupo tunicamicinas. *L. rigidum* es una maleza presente en Uruguay, que potencialmente puede ser parasitada por *Anguina funesta* asociado a *Rathayibacter toxicus* si no se establecen los controles cuarentenarios necesarios al ingreso de semillas hospedadoras del nematodo, como ser las del género *Lolium*, *Vulpia* y *Festuca*. Dichas semillas pueden transportar las formas de resistencia anhidrobióticas, tanto del nematodo como bacterianas, las cuales pueden permanecer viables por más de una década. Se realizó una revisión bibliográfica de manera de generar un material disponible para los profesionales asociados a la producción agropecuaria sobre la entidad patológica ante potenciales presentaciones clínicas en el país. Se entrevistaron las autoridades sanitarias en la materia (MGAP, INASE e INIA), vía correo electrónico para identificar las medidas preventivas y de control tendientes a evitar el ingreso de los agentes responsables de la toxicidad del raigrás anual. El ingreso de la bacteria o el nematodo al país representa un riesgo potencial a la industria agropecuaria, que generaría grandes pérdidas económicas. Es necesario que los responsables sanitarios en materia vegetal y productiva adquieran conciencia y conocimiento en el tema.

SUMMARY

Corinetoxin poisoning is a neurological disorder affecting cattle, sheep and horses, mainly reported in Australia ("Annual Ryegrass Toxicity"). This poisoning is caused by the consumption of *Lolium rigidum* associated with a complex nematode-bacterium (*Anguina funesta* - *Rathayibacter toxicus*) generating toxins biologically similar to tunicamycins. *L. rigidum* is a weed present in Uruguay, but the presence of *Anguina funesta* associated with *Rathayibacter toxicus* is unknown. Therefore, if quarantine controls fail to prevent the entry of the nematode's host seeds, it can be a potential problem in the agricultural industry of Uruguay. A bibliographic review was done in order to provide information to those professionals related to the agricultural production. Authorities of MGAP, INASE and INIA were interviewed in order to identify preventive and control measures aimed to avoid the entry of agents responsible for the "Annual Ryegrass Toxicity". The entry of the bacterium or the nematode into the country represents a potential risk to the agricultural and farming industry, which would generate large economic losses.

1. INTRODUCCIÓN

La producción agropecuaria en Uruguay se caracteriza por ser ganadera principalmente dado que se ocupa el 80% del territorio nacional para esta actividad, destinando un total de 13,4 millones de hectáreas de la superficie total del país (DIEA, 2011). Dependiendo de diferentes aspectos, la producción ganadera, puede ser clasificada en tres grandes grupos: exclusivamente ganadería para carne, sistemas agrícola-ganaderos y exclusivamente ganadería para leche. La ganadería extensiva que predomina en el 80,7% de las explotaciones agropecuarias de Uruguay se realiza básicamente sobre campo natural (CN) con apenas 11,3% de áreas mejoradas incluyendo mejoramiento del CN, praderas artificiales y verdeos. Los sistemas agrícola-ganaderos representan el 11% de las explotaciones, haciendo un uso más intensivo del suelo con praderas implantadas y cultivos forrajeros de ciclo más corto ("verdeos") en un 20% de la superficie. De todos modos, la producción lechera es la más intensiva de todas, comprendiendo un 8,3% del total de las explotaciones agropecuarias con un 57,2% de su superficie mejorada (DIEA, 2015).

Con el crecimiento de la superficie destinada a la agricultura del secano y la forestación, Uruguay ha perdido más de 400 mil hectáreas de praderas entre el año 2006 y 2011, con una pérdida adicional de 500 mil hectáreas de CN. Para reemplazar dicha área de pastoreo se ha incrementado el uso de verdeos, reduciendo la distancia temporal entre siembra y producción de carne. Históricamente se sembraban 200 mil hectáreas de verdeos, llegando a un record histórico de 503.930 hectáreas sembradas en 2011 (DICOSE, 2011). Entre ellos, la avena (*Avena sativa*) y raigrás (*Lolium multiflorum*) se utilizan como verdeos durante el invierno, mientras que el sorgo y otras especies se implantan para consumir durante el verano (DICOSE, 1990-2015).

A modo de síntesis, el área bajo mejoramientos forrajeros en Uruguay es relativamente estable entorno a los 2,2 millones de hectáreas, equivalente al 13,4% del territorio nacional. Por lo que la intensificación de la producción no se basa en el aumento de la superficie de pasturas sembradas, pero sí en el cambio de su composición. Siendo los verdeos, una proporción cada vez más importante de los

mejoramientos que se realizan sobre todo en aquellas explotaciones mixtas con gran participación de la agricultura como resultado productivo del sistema.

La marcada estacionalidad de las pasturas perennes hace necesaria la suplementación del ganado bovino en los periodos de escasez forrajera. Para los sistemas pastoriles, es esencial que esta herramienta sea de alto impacto y de bajo costo relativo, por lo que la utilización de verdeos de verano y de invierno suelen ser la mejor opción a la hora de cubrir la escasa oferta forrajera, aportando alimento de buena calidad en las épocas del año donde las pasturas perennes disminuyen su tasa de crecimiento, principalmente desde fines del otoño hasta el inicio de la primavera (Formoso, 1996).

A la hora de implementar el uso de verdeos en cada establecimiento, es necesario tener en cuenta la calidad de semilla disponible en el mercado y el tipo de cultivar más apropiado.

Desde el punto de vista de la industria semillera, Uruguay se puede categorizar como país importador. Realizando un balance comercial de semillas de los años 2005-2009, las exportaciones representan en promedio y en dólares, solamente un 12% de las importaciones (INASE, 2010). Las importaciones de semillas forrajeras en el Uruguay presentan oscilaciones importantes no siguiendo una tendencia clara, y en directa dependencia de las condiciones climáticas y de precios específicos para cada año (INASE, 2010).

Entre Argentina y Estados Unidos proveen a Uruguay del 72% de la semilla importada. De esta manera, el 64% de las importaciones uruguayas de semillas forrajeras provienen del MERCOSUR, principalmente de Argentina (59%), Brasil (4%) y Paraguay (1%) (INASE, 2010). Este hecho adquiere gran importancia en el control de las plagas cuarentenarias para el país, ya que al existir un ingreso de semillas constante aumenta la posibilidad de la introducción de noxas exóticas para los cultivos presentes en el territorio nacional y demanda de un control más exhaustivo.

La posibilidad de que con la importación de semillas se introduzcan los agentes etiológicos asociados a la "Toxicidad del raigrás Anual" (ARGT), representa una

amenaza importante para la industria agropecuaria que significa el 13,02% (promedio 2007-2013) del Producto Bruto Interno del país (DIEA, 2015).

La ARGT o Toxicidad del raigrás anual, es una enfermedad neurológica del ganado bovino, ovino y equino con altas tasas de morbilidad y mortalidad, debido al consumo de raigrás anual contaminado con toxinas producidas por un complejo nematodo-bacteria (Berry y Wise, 1975). La enfermedad se distribuye de forma natural en Australia y Sudáfrica, sin embargo, representa un riesgo potencial para países ganaderos que se caracterizan fundamentalmente por importar semillas forrajeras. Las mismas pueden actuar como vehículo tanto de los nematodos bajo anhidrobiosis así como de la bacteria productora de las toxinas (Eisenback y Triantaphyllou, 1991). Por lo que, es necesario conocer la enfermedad y evitar el ingreso de los agentes etiológicos al país mediante controles estandarizados en los puntos de ingreso de semillas forrajeras y heno, previniendo el establecimiento de una patología con alto impacto en la producción agropecuaria nacional (Murray y col., 2014). Más si se tiene en cuenta, que la producción bovina y ovina nacional es de base pastoril, por lo que cualquier entidad patológica asociada a la producción de forraje tendría consecuencias importantes.

2. OBJETIVOS

2.1 *Objetivos generales:*

- Realizar una revisión de bibliografía asociada al complejo *Anguina funesta* - *Rathayibacter toxicus* - *Lolium rigidum*.
- Prevenir el ingreso de los agentes involucrados en la entidad patológica mediante la difusión de la información recabada y concientización de las autoridades competentes al tema.

2.2 *Objetivos específicos:*

- Recabar información sobre los controles realizados en Uruguay, tendientes a evitar el ingreso de los agentes involucrados en la entidad patológica conocida como toxicidad del raigrás anual (ARGT, del inglés *annual ryegrass toxicity*).
- Generar una fuente de información ante la eventual presentación de la enfermedad en Uruguay.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo constó de una revisión bibliográfica, revisando bibliografía nacional e internacional. Para esto se utilizó la plataforma de búsqueda del Timbó (<http://www.timbo.org.uy/>) y Scielo Uruguay y Brasil (<http://www.scielo.edu.uy/scielo.php>, <http://www.scielo.br/?lng=es>), así como otras fuentes bibliográficas de bibliotecas de Facultad de Veterinaria.

Además, se realizaron entrevistas a autoridades del Instituto Nacional de Semillas, Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca e INIA.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 *Mecanismos de defensa vegetal*

La mayoría de las especies de gramíneas han co-evolucionado con los herbívoros por lo que han desarrollado diversos mecanismos de defensa, físicos y químicos. Las defensas físicas incluyen espinas, hojas tomentosas (provistas de pelos) y tejido altamente lignificado, mientras que las defensas químicas son sustancias con efecto adverso para los herbívoros (Cheeke y Shull, 1985).

En contraste a las plantas herbáceas, las cuales cuentan con abundantes sistemas de defensas químicas (alcaloides, glicósidos, aminoácidos tóxicos y compuestos fenólicos), las gramíneas no presentan este tipo de defensa. Sin embargo, las gramíneas pueden formar asociaciones con otros microorganismos (hongos, nematodos, bacterias, entre otros), donde las plantas proveen un ambiente óptimo para su desarrollo y los microorganismos secretan metabolitos para proteger su medio-ambiente (Cheeke, 1995). Tal parecería ser el caso del complejo formado entre *Lolium rigidum* (gramínea), *Anguina funesta* (nematodo) y *Rathayibacter toxicus* (bacteria). Dicho complejo es el responsable de la producción de toxinas que afectan a ovinos, bovinos y equinos, enfermedad conocida en Australia bajo las siglas "ARGT" del inglés "Annual Rye-Grass Toxicity" o traducido al español como "Toxicidad del raigrás anual".

4.2 *Definición de la enfermedad*

La ARGT es un desorden neurológico primario del ganado bovino, ovino y equino que se encuentran pastoreando raigrás parasitado por un complejo nematodo-bacteria-bacteriófago (McIntosh y col., 1967; Berry y Wise, 1975). El nematodo *Anguina funesta* provoca agallas (excrecencia del tejido vegetal) principalmente en la semilla del raigrás, lo que permite que la bacteria toxigénica, *Rathayibacter toxicus*, que normalmente se encuentra en el suelo, pueda acceder a la planta (Allen, 2012). La *R. toxicus* produce una variedad de toxinas denominadas corinetoxinas siendo la intoxicación con dichas toxinas un evento frecuente en Australia y en menor medida, Sudáfrica, con serias consecuencias para el ganado bovino y ovino principalmente (Culvenor, 1978; Roberts et al., 1994).

4.3 Etiología

4.3.1. La bacteria

La participación de la bacteria *R. toxicus* en los brotes de ARGV fue reconocida en 1968 (Price y col, 1979). La *R. toxicus*, es vectorizada hacia el raigrás mediante un nematodo perteneciente al género *Anguina spp.* Varios nematodos de éste género pueden vectorizar a *R. toxicus*, a distintas especies vegetales. Por lo que la intoxicación con “corinetoxinas”, toxinas producidas por *R. toxicus*, se ha visto también asociada al consumo de *Agrostis avenacea* (*Lachnagrostis filiformis*) y *Polypogon monspeliensis*. Dichas enfermedades se conocen bajo el nombre de "Flood plain staggers" (FPS) (Bourke y col., 1992).

Dentro de las gramíneas hospedadoras conocidas para la bacteria se destacan: *Agrostis avenacea*, *Festuca nigrescens*, *Lolium multiflorum* (raigrás italiano), *Lolium rigidum* (raigrás anual), *Lolium spp.* (ryegrass), y *Polypogon monspeliensis* (Putnam, 2009; Murray y col., 2014).

En Australia, *R. toxicus* se encuentra más comúnmente en *L. rigidum* con *A. funesta* como vector. Sin embargo, esta relación no es específica con éste nematodo y con esta especie forrajera, pudiendo potencialmente colonizar y producir toxinas en una amplia variedad de cereales y forrajeras, inclusive en especies consumidas por seres humanos (Murray y col, 2014). Sin embargo, se desconoce el potencial de las distintas asociaciones entre bacteria-nematodo-especie vegetal, a no ser por las intoxicaciones ya conocidas y denominadas como “ARGV” y “FPS”.

A continuación, se muestra la Figura 1, donde se presenta la distribución de la ARGV, FPS y el nematodo *Anguina tritici* el cual produce una enfermedad (cóclea de la espiga) en el trigo, en Australia.

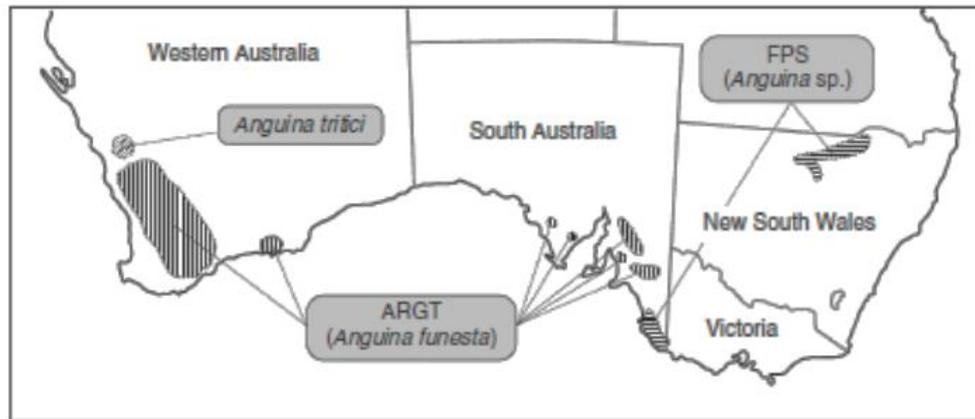


Figura 1. Distribución de las enfermedades de importancia económica en Australia, vectorizadas por nematodos del género *Anguina spp.* Reproducido de Riley y Barbetti, 2008.

El género *Rathayibacter spp.* se encuentra incluido dentro de la familia de los actinomicetos, por lo que se la identifica como una bacteria Gram positiva (Sasaki, 1998). La misma crece entre la gluma de las semillas y la semilla, y en las agallas formadas por el nematodo después de haber sido introducido en la planta hospedadora. La bacteria vuelve al suelo cuando la planta hospedadora envejece y las semillas caen al suelo (Murray y col., 2014).

La enfermedad en la planta se conoce como "gummosis" y se genera a partir de la colonización de las estructuras reproductivas, produciendo una "agalla" en las semillas infestadas. Cuando las condiciones climáticas son favorables, la bacteria puede crecer al grado de eliminar los nematodos dentro de la agalla y formar su propia agalla. El ciclo se cierra cuando las formas de resistencia, anhidrobióticas, caen al suelo esperando el otoño siguiente para encontrar otra planta hospedadora (Putnam, 2009).

Generalmente, es posible observar un material cristalino naranja presente en las semillas de las plantas afectadas, sin embargo, el hecho de que este material se encuentre ausente no es indicativo de ausencia bacteriana. En la siguiente figura (Fig. 2), es posible observar en primer lugar, una planta de *L. rigidum* de características normales (A) y a su derecha, un ejemplar contaminado con bacterias, donde es posible visualizar el material cristalino naranja producto de la contaminación bacteriana (B).



Figura 2. Ejemplar de *L. rigidum* "sano" (A), ejemplar de *L. rigidum* con contaminación bacteriana (B). Reproducido de Murray y col., 2014.

Australia es el país donde se producen mayores pérdidas debido a la intoxicación del ganado con las denominadas "corinetoxinas" producidas por la bacteria. Sin embargo, se han observado casos en Sudáfrica y en Japón (Schneider, 1981). Por otro lado, en Estados Unidos, se asociaron episodios de mortandad por intoxicación con corinetoxinas relacionadas al consumo de *Festuca nigrescens* (Haag, 1945; Shaw, 1949; Galloway, 1961).

En ese sentido, *R. toxicus* se encuentra formando parte de un listado de agentes biológicos que potencialmente son un riesgo para la salud animal en Estados Unidos de América, establecido por el Departamento de Agricultura (U.S Government Publishing office, 2017). Las pérdidas para la industria cárnica fueron estimadas en 2010 para Australia, con un total de 37 millones de dólares, afectando una superficie de 10 millones de hectáreas (Kessel, 2010; Carslake, 2006). La experiencia de Australia en la enfermedad tanto en la planta como en los animales ha llevado al desarrollo de prácticas de manejo para reducir la incidencia de la entidad patológica.

4.3.2 Producción de corinetoxinas

Los metabolitos tóxicos producidos por *R. toxicus* se conocen como "corinetoxinas" (Vogel y col., 1981) y se encuentran relacionados al grupo de antibióticos de las tunicamicinas (Edgar y col., 1982). La *R. toxicus* produce hasta 16 corinetoxinas diferentes, las cuáles son biológicamente indistinguibles de las tunicamicinas originalmente aisladas del actinomiceto *Streptomyces lisosuperificus* (Takatsuki, 1982).

Las corinetoxinas son glicolípidos estables al calor, altamente tóxicas (dosis letal para ovejas de 3-6 mg/kg de peso vivo) y con efectos acumulativos, por lo que bajas concentraciones de las toxinas repetidas en el tiempo pueden tener el mismo efecto que una sola dosis aguda (Jago y Culvenor, 1987). Las corinetoxinas han resultado tóxicas para todos los animales expuestos experimental o naturalmente: ovinos, bovinos, equinos, ratones, cobayo y ratas (Jago y col., 1983; Edgar y col., 1982).

Los 16 tipos de corinetoxinas varían en sus cadenas laterales (Murray y col, 2014). La Fig. 3 ejemplifica la estructura química genérica de la corinetoxinas, componente principal de las 16 corinetoxinas y que difieren únicamente en la cadena lateral alifática (Cockrum y Edgar., 1985).

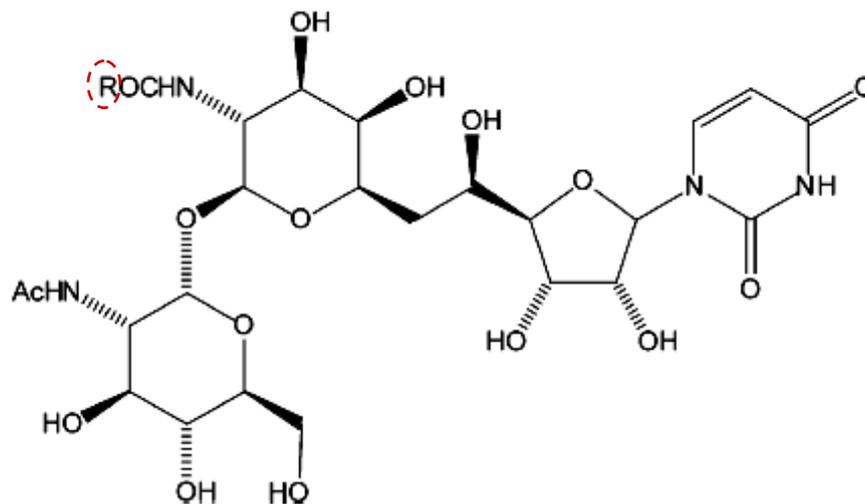


Figura 3. Estructura química genérica de las corinetoxinas. R= C15-C19: cadena alifática. Reproducido de Than y col., 2005.

Las toxinas son inhibidores específicos de una enzima denominada GlcNAc-transferasa, la cual se encarga de catalizar el paso inicial en la síntesis de glicoproteínas que requieren la unión de un compuesto *N*-acetilglucosamina mediante un enlace glicosídico (Lehle y Tanner, 1976; Vogel y col., 1983). La inhibición de dicha enzima es la responsable de los hallazgos de la ARG1 (Jago y col., 1983; Culvenor y Jago, 1985).

En la presencia de suficientes cantidades del tóxico, las proteínas no son glicosiladas, proceso que se produce en el retículo endoplásmico rugoso, con alguna modificación que puede ocurrir en el complejo de Golgi. En presencia de corinetoxinas, la parte proteica de la molécula puede que sea sintetizada con cambios mínimos en la función, pero factiblemente se degrade más rápidamente (Schwartz y Datema, 1982).

Las glicoproteínas se encuentran involucradas en la formación de conexiones sinápticas específicas entre neuronas y en el mantenimiento de estabilidad adhesiva de las sinapsis una vez formada. La mayoría de los receptores de transmisión son glicoproteínas de membrana. Además se ha observado que, las tunicamicinas causan una muerte apoptótica en cultivos de neuronas hechos de ganglios simpáticos (Chang y Korolev., 1996) y capa granular cerebelar (Chang y col., 1997) sugiriendo un rol vital de la *N*-glicosilación para la supervivencia neuronal (Lin y col., 1999; Finnie, 2006). Mientras que las glicoproteínas asociadas a la mielina se encuentran en un 1% en el SNC, las mismas se encuentran en concentraciones del orden del 50-70 % asociadas a la mielina en los nervios periféricos (Finnie, 2006; Olden y col., 1982). Esto explicaría la presentación clínica de la enfermedad.

La participación de un virus bacteriano o bacteriófago ha sido considerado importante para la producción de toxinas por parte de *R. toxicus*. No obstante, la significancia del bacteriófago en el desarrollo de los casos clínicos es incierta. Bird y col. (1980) y Stynes y Bird (1983) demostraron la presencia de un bacteriófago en semillas tóxicas provenientes de *L. rigidum*.

Por otro lado, Kowalski y col. (2007) llevaron a cabo un estudio sobre agallas tóxicas obtenidas del cribado de grano cosechado y de semillas recolectadas de muestras

de centeno, encontrando una baja correlación entre la presencia de corinetoxinas y el bacteriófago. Por lo tanto, su participación en la ARGV está aún en dudas.

El mecanismo por el cual se desencadena la producción de toxinas por parte de *R. toxicus* es desconocido. No obstante, las toxinas se detectan generalmente tarde, cuando la planta se encuentra en etapa de senescencia y la bacteria alcanzó su pico de biomasa (Murray, 2017). Este factor es importante a la hora de incorporar ciertas medidas de manejo en verdeos afectados.

4.3.3 Detección de *R. toxicus* en el alimento

La identificación de las agallas tanto bacterianas como las de los nematodos puede realizarse mediante la observación del material contaminado bajo una lupa. Sin embargo, para la correcta identificación y cuantificación de la bacteria en el alimento se desarrolló una técnica de ELISA, el cual es actualmente ofrecido en los laboratorios de diagnóstico de Australia (Riley and Mckay, 1991; Masters y col., 2011). Dicha técnica es utilizada también para confirmar la presencia en materia fecal y contenido ruminal (Allen y Gregory, 2011).

Para realizar el muestreo de la pastura se sugiere trazar una "W" imaginaria en el potrero a analizar (de hasta 40 ha) y tomar unas 100 muestras en su recorrido. Dichas muestras deben estar compuestas de 3-4 espigas por cada parada que se realiza. Si el raigrás no se encuentra distribuido de manera homogénea en la pastura, deberían efectuarse recolecciones en aquellas áreas donde hay mayor densidad del mismo, de manera de establecer el riesgo de presencia bacteriana en las muestras correctas. Si el potrero supera las 40 ha, es necesario realizar sub-muestreos (Allen, 2012).

Las determinaciones también suelen realizarse en el heno. Luego de que se produjera la muerte de ganado bovino en Japón, en 1996, que había consumido heno de avena contaminado con raigrás tóxico procedente de Australia, se introdujo una rutina de inspección y control de *R. toxicus* para todo heno que se exporte desde dicho país (Masters y col., 2006, 2011).

4.4 Raigrás anual

Lolium rigidum es una gramínea forrajera adaptada al clima mediterráneo, por lo que se siembra principalmente en el Sur de Australia (Purcell, 1983) e Italia para pastoreo invernal. En esta especie se reconocen al menos dos subespecies: *Lolium rigidum* subsp. *rigidum* y *Lolium rigidum* subsp. *rottbolloides* (Terrel, 1968).

Lolium rigidum es un forraje de excelente adaptación al secano y capacidad de auto-resiembra: interrumpiendo su pastoreo a partir del inicio del espigado la pradera se re-semilla para el año siguiente. Un ligero laboreo o el pisoteo posterior de los animales son suficientes para asegurar la siembra del próximo año, con el consiguiente ahorro en gastos de cultivo y protección del suelo. Además, se suele consociar con leguminosas anuales del género *Medicago* (Delgado, 1996).

En Uruguay su uso no ha llegado a generalizarse por considerarla en principio una planta que puede infectar los campos y tierras de labor (INIA, 2005). Podría ser empleada como un cultivo anual igual que *L. multiflorum*, sembrada a fines de verano. Por su gran capacidad de auto-resiembra y supervivencia en condiciones de estrés (baja fertilidad, sequía, entre otros). Otras posibles aplicaciones de esta especie para usos no forrajeros son la estabilización de taludes en autopistas, vías férreas, cauces hidráulicos, la cubrición de vertederos y bocas de mina, la revegetación de espacios naturales deteriorados, entre otros usos (Johnson y col., 1992).

El cultivar Wimmera, originario de Australia, se ha transformado en un serio problema en los sistemas que combinan la ganadería con la siembra de cereales, debido a su resistencia a los herbicidas. Por ende, puede encontrarse clasificada como una maleza de los cereales (Demagnet, 2012). Además de los problemas agronómicos esta maleza puede traer también serios riesgos por el potencial de producir cuadros de ARGV (Government of Western Australia, 2017).

4.5 Anguina spp.

Las especies *A. agrostis*, *A. tritici* (Goodey, 1930) y *A. funesta* (Price y col., 1979) son consideradas plagas cuarentenarias en varios países, por las pérdidas económicas que potencialmente pueden originar de instaurarse en los sistemas

productivos tanto para la ganadería como para la agricultura (Chizov y Subbotin, 1990., Krall, 1991).

Anguina funesta es un parásito obligado de las plantas formador de "agallas" en los ovarios de *Festuca*, *Lolium* y especies de *Vulpia* (Price y col., 1979; Riley 1995). Cuando dichas agallas maduran contienen en su interior formas anhidrobióticas de larvas juveniles en segundo estadio (J2), que caen al suelo con las semillas y se mantienen viables en las mismas por años. El estadio J2 recién eclosionado no puede sobrevivir a la desecación, pero a medida que la planta huésped envejece, el parásito madura fisiológicamente y se convierte en la forma de supervivencia. En condiciones de suelo húmedo, el estadio J2 buscará activamente una planta huésped para invadir (Riley y Mckay, 1991). Las larvas J2 se dirigen al meristema de los tallos infestados y aguardan hasta que la inflorescencia se forme para producir la infección de la misma (Murray y col., 2014). Dentro de la agalla, la larva J2 atraviesa varias mudas hasta convertirse en adulto (machos y hembras), siendo la reproducción sexual un proceso esencial (Riley y Bertozzi, 2004).

A continuación, se ejemplifica el ciclo de vida del nematodo en relación a su hospedador (Fig 4), detallado anteriormente:

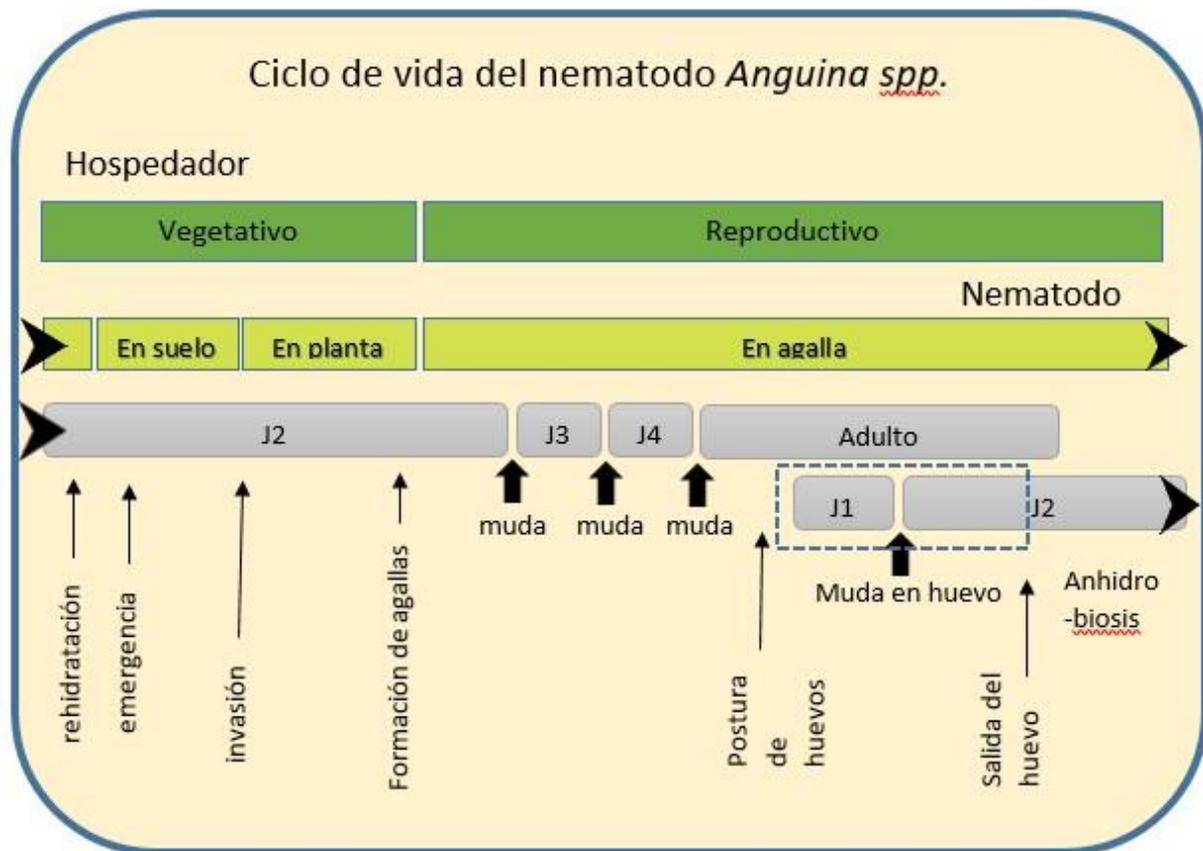


Figura 4. Ciclo de vida del género *Anguina spp.* Adaptado de Riley y Barbetti, 2008.

De manera de unificar el ciclo de la enfermedad, el siguiente cuadro (Fig. 5), ejemplifica el ciclo anual biológico de la bacteria en relación al nematodo: con las primeras lluvias otoñales la agalla formada por la bacteria y por el nematodo se rompe liberando así, las larvas J2 en el suelo. Las bacterias se unen a la cutícula del parásito y comienza la invasión de las plantas de raigrás en desarrollo. Los nematodos producen agallas antes de la emergencia de las espiguillas. La bacteria invade dichas agallas, convirtiéndolas en tóxicas para el ganado. Hacia fin de primavera y principio de verano se producen los brotes de ARGT. Las semillas y el heno cosechado mantienen la toxicidad una vez contaminados.

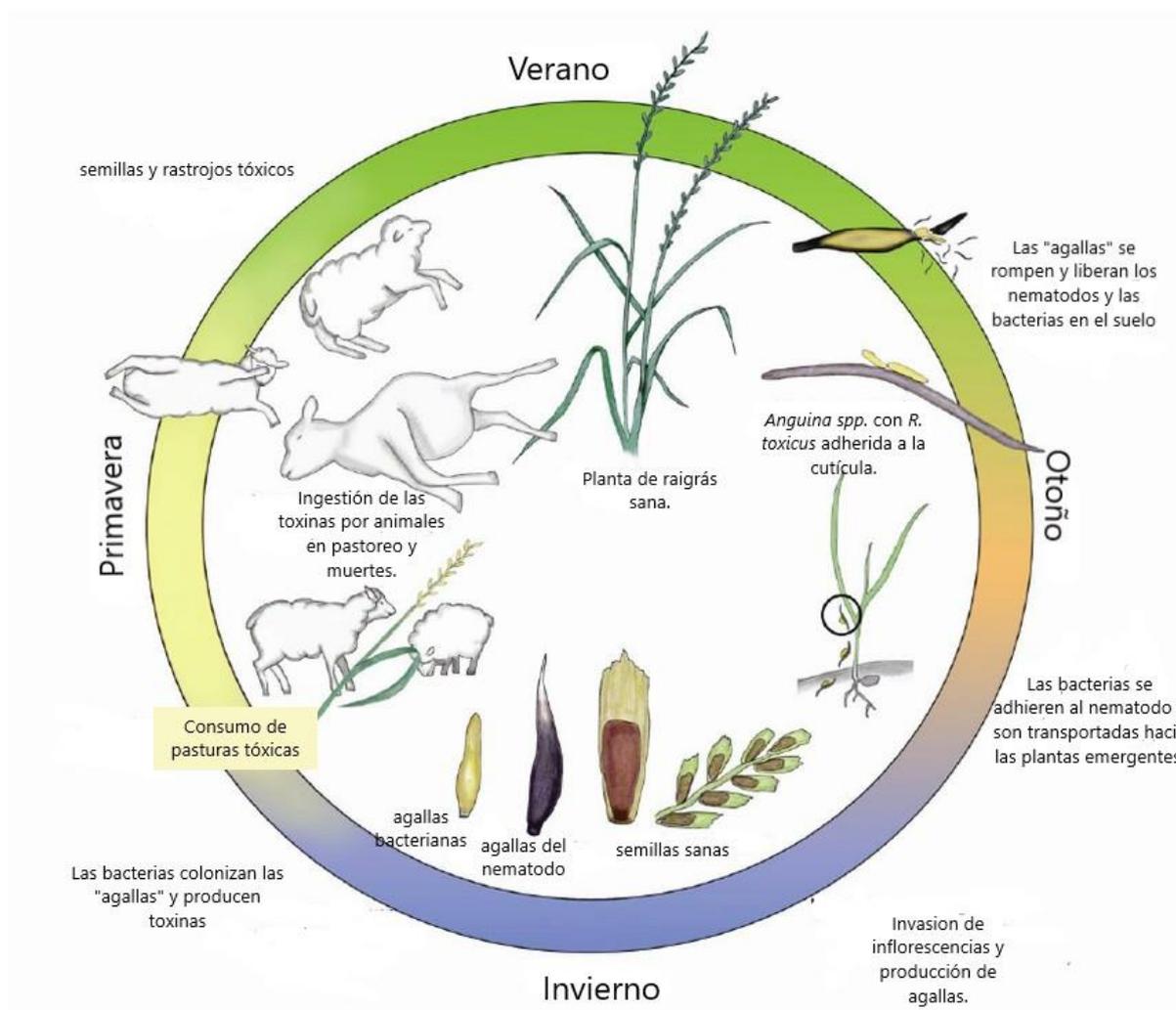


Figura 5: Ciclo anual biológico de la ARGT. Reproducido y editado de Murray y col., 2014.

Cuando los nematodos infectan una parte de la planta hospedadora, por ejemplo la raíz, afectan los procesos fisiológicos de toda la planta, ya sea directa o indirectamente, incluyendo la respiración, fotosíntesis, translocación y disponibilidad de nutrientes, relación de agua y balance fito-hormonal. Generalmente, estos procesos se encuentran muy relacionados entre sí, por lo que es muy difícil identificar la secuencia de eventos que lleva a las pérdidas en el cultivo (Eisenback y Triantaphyllou, 1991).

Las bacterias pueden ser transmitidas por el nematodo externamente en la superficie corporal o internamente dentro del tubo alimenticio. La transmisión externa de algunas bacterias para las plantas es significativa en el desarrollo de algunas

fitopatologías, tal es el caso de algunas especies de *Anguina* y *Aphelenchoides* que vectorizan bacterias hasta la parte aérea de la planta (Eisenback y Triantaphyllou, 1991).

Las espiguillas del raigrás se llenan de bacterias, y las glumas se cubren de una masa amarilla brillante de bacterias. En ausencia de bacteria el nematodo origina una agalla en la semilla de color marrón (Bird y col., 1980). En la siguiente figura (Fig. 6) se pueden observar tres tipos de semillas de raigrás, la primera (de izq. a der.) es una semilla de características normales, la segunda es una semilla con una agalla marrón perteneciente a *A. funesta* y la última corresponde a una semilla con una agalla bacteriana en su interior de coloración amarilla.



Figura 6: De izq. a der.: Semilla de raigrás normal, semilla con agalla de *A. funesta*, semilla con agalla bacteriana. Reproducido de Allen, 2012.

La conservación bajo forma anhidrobiótica de los nematodos juveniles y de las bacterias en agallas que permanecen en extremo contacto, juega un papel importante para la supervivencia de la bacteria en condiciones ambientales desfavorables (Bird y col., 1980).

4.6 *La enfermedad en el ganado*

Los animales que se encuentren pastoreando plantas infectadas pueden desarrollar AGRT, una enfermedad neurológica fatal caracterizada por convulsiones, con altas tasas de morbilidad y mortalidad (Berry y Wise, 1975; McKay y Ophel, 1993). Se ha corroborado intoxicación en diferentes especies que pastorean gramíneas tóxicas (bovinos, ovinos, equinos), a diferentes edades.

Los signos clínicos incluyen incoordinación, extensión de la cabeza manteniéndola alta y lomo arqueado; seguido por temblor muscular, bruxismo, nistagmo y episodios convulsivos. Inicialmente, las manifestaciones clínicas son intermitentes y episódicas con períodos de relativa normalidad. En la última etapa, los animales mantienen decúbito lateral y realizan movimientos de los miembros con la intención de desplazarse. El curso de la enfermedad puede ser tan corto como de 24 horas. Cuando se produce un brote de enfermedad, las muertes pueden continuar hasta 10 días después de la detección de los primeros signos clínicos. Asimismo, es posible que los animales preñados aborten inclusive cuando se los retira del potrero contaminado (Murray, 2014).

No existe un tratamiento para la enfermedad, por lo que los animales deben retirarse del potrero problema y proveerles alimento y agua de buena calidad. El cuadro convulsivo parece ser disparado por movimiento de la hacienda o frente a altas temperaturas ambientales, por lo que es vital evitar todo tipo de maniobras en días de mayores temperaturas ambiente (Bourke y col., 1992).

4.6.1 *Efectos a largo plazo de las toxinas*

Los brotes a campo usualmente se presentan 5 a 7 días luego de introducir el ganado al potrero contaminado. Sin embargo, se han identificado efectos a largo plazo tanto en exposiciones agudas y crónicas a las toxinas (Stewart, 1998).

Experimentalmente se ha demostrado que la administración de una sola dosis de tunicamicinas a razón de 200 µg/kg a ratas provocaron efectos reproductivos a largo plazo. Dicho tratamiento ocasionó una destrucción permanente de los túbulos seminíferos, debido a cambios degenerativos en el epitelio germinativo de ratas adultas (Peterson y col., 1996). Asimismo, se observó una reducción del peso

corporal en un 20%, no recuperándose a los valores iniciales hasta la octava semana post-tratamiento.

De manera similar, la administración experimental de 1µg/kg/día (3% de una dosis letal) de tunicamicinas resultó en la muerte de 3 ovejas de un total de 4 tratadas en un período comprendido entre 29-48 días (Jago y Culvenor, 1987). Esto demostraría el efecto crónico y acumulativo que podrían tener las corinetoxinas.

Otros efectos a largo plazo implican la reducción en la producción de lana. Con 2 dosis semanales administradas por 11 semanas, se observó una caída en el 22% en el crecimiento de la lana, sin observarse signos clínicos de ARGТ en las ovejas tratadas (Davies y col., 1996). La toxicidad acumulativa, en conjunto con los efectos biológicos a largo plazo de las toxinas y la depresión de los valores de la N-acetylglucosamina-1-fosfotransferasa, sugieren la permanencia de las toxinas en el hígado y posiblemente, en otros tejidos por tiempo considerable (Stewart, 1998).

4.6.2 Hallazgos de necropsia

Los hallazgos a la necropsia son variables y no específicos de la enfermedad. En la mayoría de los animales afectados es factible encontrar laceraciones, edema y hematomas en el subcutáneo y la musculatura del pecho, pelvis, hombros y cabeza; hemorragias petequiales y equimóticas de la superficie epicárdica y endocárdica (Davis y col., 1995; Finnie, 2006). Hígados grasos, de coloración que puede variar entre pálido a ocre, de consistencia friable (Finnie, 2006; Bourke y col., 1992; Davis y col., 1995). La mucosa abomasal con hemorragia petequial, edema y congestión. Congestión en vasos meníngeos (Bourke y col., 1992; Davis y col., 1995). Es común encontrar hemorragias en vesícula biliar, y en menor medida en rumen, intestino delgado, riñones y musculatura cervical (Finnie, 2006).

La figura siguiente (Fig. 7) muestra las lesiones macroscópicas comúnmente observadas en hígado



Figura 7. Hígado procedente de un ovino afectado, con vesícula biliar hemorrágica y marcada coloración amarillenta del hígado. Barra= 9 cm. Reproducido de Finnie, 2006.

4.6.3. Hallazgos histopatológicos:

Las principales lesiones halladas suelen ser hepáticas y de naturaleza inespecífica (Finnie, 2006). El análisis microscópico de cortes de hígado de animales afectados suele revelar una lipidosis y degeneración hidrópica difusa leve (Bourke, 1992). Los cambios se caracterizan por una vacuolización difusa de los hepatocitos debido a una marcada dilatación del retículo endoplásmico rugoso y acumulación de lípidos, focos diseminados de necrosis de hepatocitos, núcleos y cuerpos apoptóticos, además hay hiperplasia de ductos biliares (Finnie, 2006). Suelen hallarse numerosos neutrófilos en las sinusoides (Finnie y Jago, 1985; Berry y col., 1982). Pueden observarse concreciones en el RER, especialmente en ovejas intoxicadas en forma crónica, los cuales son más específicos de corinetoxinas (Finnie y O'Shea, 1990; Berry y col., 1982). Los mismos pueden encontrarse en las vacuolas de hepatocitos

que contienen un material eosinofílico en su interior, en la tinción de hematoxilina-eosina y son visibles como gránulos oscuros en los cortes teñidos con azul de toluidina (Fig. 7).

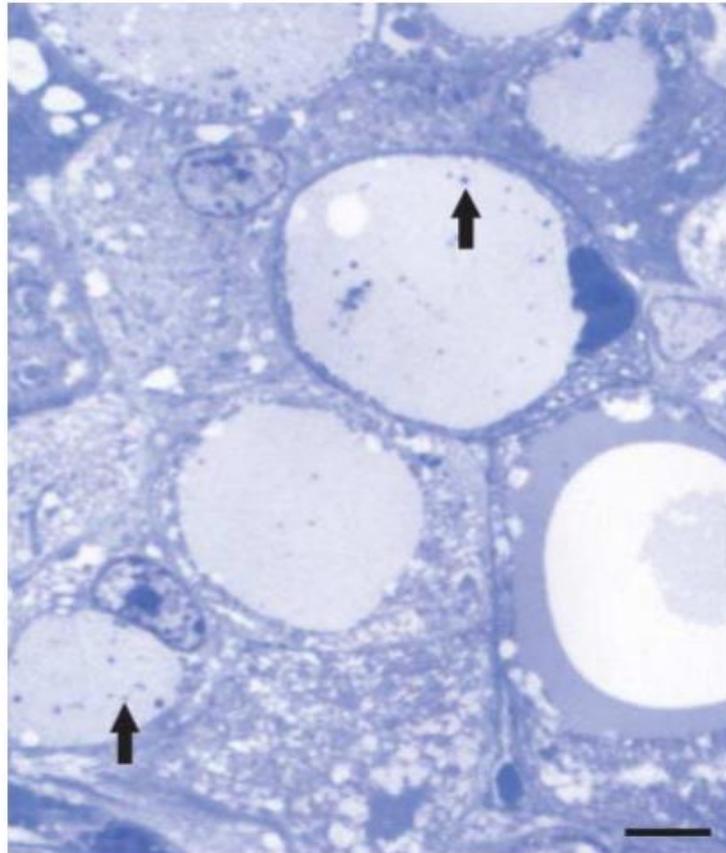


Figura 8. Hepatocitos de un ovino intoxicado crónicamente de manera natural con corinetoxinas. Vacuolas con múltiples gránulos oscuros visibles con azul de toluidina (flechas). Reproducido de Finnie, 2006. Barra= 35 μ m.

En cuanto al estudio de tejidos del SNC, las lesiones suelen confinarse a nivel del cerebelo. Los hallazgos más importantes corresponden a la deposición de un fluido eosinofílico, pálido, tipo-proteico en el espacio subaracnoideo, ocasionalmente asociado a hemorragias leves (Berry y col., 1980). Estos depósitos son usualmente encontrados en el espacio perivascular, siendo más extensivos en meninges. Este infiltrado no es patognomónico de la intoxicación con corinetoxinas; sin embargo,

suele ser de alto valor diagnóstico debido a la frecuencia en su presentación (Finnie, 2006).

En general, si bien se describen estos hallazgos, las lesiones suelen ser bastante inespecíficas, por lo que su interpretación debe hacerse en conjunto con aspectos clínicos y datos anamnésticos que permitan hacer sospechar de un cuadro de ARG (Berry y col., 1980).

4.6.4 *Bioquímica sanguínea*

Bourke y col., 1992 reportan un incremento en la actividad de las enzimas hepáticas AST (Aspartato aminotransferasa), CK (Creatinquinasa) y GGT (GammaGlutamil transferasa), en bovinos intoxicados con corinetoxinas naturalmente en un brote ocurrido en Australia en 1990. Estos hallazgos resultaron ser consistentes con la disfunción hepática, muscular y nerviosa propia de la intoxicación (Bourke y col., 1992). De nuevo, de la misma manera que los hallazgos histopatológicos, la interpretación debe hacerse en el contexto de otros hallazgos clínico-patológicos.

4.6.5 *Control y prevención*

Teniendo en cuenta la experiencia de los productores afectados en Australia, la evaluación del riesgo de padecer un brote de ARG se efectúa teniendo en consideración diferentes aspectos.

Por un lado, se evalúa el riesgo de presentación de ARG basados en la estimación de la cantidad de nematodos y agallas bacterianas presentes en el forraje del potrero a pastorear. Este test se realiza una vez que el raigrás se encuentra maduro, y permite establecer una planificación forrajera para la temporada siguiente, realizando la rotación de cultivos en aquellos potreros más infectados (Riley, 1992).

Por otro lado, se puede evaluar mediante un test de ELISA la concentración de bacterias en las espiguillas emergentes cuando las concentraciones de toxinas suelen ser bajas (Mckay, 1993; Riley, 1992). Este test permite mapear el establecimiento acorde al riesgo de presentación de la enfermedad por potrero, y tomar medidas de manejo para esa temporada de pastoreo. Asimismo, recientemente se desarrolló un ELISA semi-cuantitativo para procesar muestras de heno y pastura, con el propósito de categorizar las muestras según el riesgo de

presentación de brotes de ARG. Esta técnica se ha planteado para aquel material que no puede ser exportado pero que podría ser utilizado a nivel local si se logra identificar en que categoría de riesgo se encuentra (Masters y col., 2014).

Como alternativa, se ha planteado la incorporación del hongo *Dilophospora alopecuri*, que actúa como bio-pesticida sobre *R. toxicus*. La introducción de dicho microorganismo al cultivo suele ser parte de una estrategia a largo plazo para reducir la incidencia de la ARG. Esto se debe en parte, a que el éxito de su utilización es variable según la estación, lugar geográfico de aplicación y suele ser necesario utilizar una tasa de aplicación costosa en el primer año de incorporación (Barbetti y Riley, 2006).

A su vez, el desarrollo de vacunas aptas para la comercialización es una materia pendiente para los investigadores de CSIRO (Commonwealth Scientific and Industrial Research) (Paterson, 2003). Ellos han logrado desarrollar una vacuna para el ganado ovino con adecuada protección cuando se desafían animales con tunicamicinas vía subcutánea y corinetoxinas por vía oral. Sin embargo, el elevado costo relacionado a la producción de las mismas hace que su comercialización sea inviable en la actualidad (Paterson, 2003).

El control mediante herbicidas de *L. rigidum* como maleza de los rastrojos destinados a consumo animal, ha llevado a la preocupante aparición de resistencia al glifosato en Australia desde 1977 (Heap y Knight, 1986). Esta resistencia también ha sido reportada en Sudáfrica, Estados Unidos, Francia y España (Villaba, 2009) y en países de la región como Chile (Espinoza y Zapata, 2000; Espinoza y col., 2002).

En definitiva, el monitoreo regular del ganado y la pastura, en los periodos de mayor riesgo de presentación de brotes de la ARG es la opción más convincente.

4.7 Los agentes como Plaga cuarentenaria

El fenómeno de globalización trae consigo aparejado un gran movimiento e intercambio de materiales y especímenes, entre ellos, semillas incorporadas para la mejora de cultivos nacionales. El transporte de microorganismos no deseados como bacterias, parásitos, etc., se torna así inevitable. Es necesario que cada país

extreme cuidados en las estaciones cuarentenarias con el fin de identificar los nematodos que son capaces de sobrevivir en estado de anhidrobiosis como lo son los géneros *Ditylenchus*, *Anguina* y *Aphelenchoides* (Cares y col., 2008).

En este caso, se genera particular interés en la capacidad de *Anguina* de ser transportado con semillas de especies vegetales como ser *Lolium spp*, *Polygon spp* y *Agrostis spp*. (Mckay y Ophel, 1993; Purcell, 1983), entre otras.

Los métodos de detección deben encontrarse protocolizados y ser parte de una barrera cuarentenaria ante cualquier semilla que pueda vectorizar dicho estado de resistencia. Por lo que se vuelve indispensable el conocimiento e identificación de las especies involucradas en la ARGT. Acorde a las condiciones bajo las que se almacenen y conserven los granos, las formas bajo anhidrobiosis de *Anguina spp*. pueden permanecer hasta por más de una década viables (Norton, 1978., Preston y Bird, 1987., Tenente y Manso, 1987).

En Sudamérica existen reportes de detección de los nematodos en la Estación de Cuarentena Vegetal de Brasil. Se describen detecciones en germoplasma vegetal, trigo y avena procedentes de Estados Unidos y trigo procedente de Argentina (Mendes y Tenente, 1995; Tenente y col., 1998; Tenente y col., 2007). Al encontrarse el nematodo en estadio juvenil no pudieron reconocerse con veracidad a que especie de *Anguina* pertenecían.

Para regular en materia de sanidad vegetal existe un Convenio de Sanidad Vegetal que fue creado el 9 de marzo de 1989 entre los Gobiernos de Argentina, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay. Dentro de las plagas cuarentenarias reglamentadas establecido por dicho convenio se destacan *A. agrostis* y *A. tritici* declarándose “libre” a la región (COSAVE, 2016). Sin embargo, esta lista de plagas cuarentenarias excluye a *R. toxicus*, que puede ser hallada en las gramíneas que son hospedadoras de los nematodos del género *Anguina spp*. A continuación, se muestra el cuadro (Fig. 9) con los nematodos incluidos en la lista de plagas cuarentenarias de la región según CO.SA.VE., para marzo 2016.

NEMATODOS	
<i>Anguina agrostis</i>	Ausente Región
<i>Anguina tritici</i>	Ausente Región
<i>Aphelenchoides besseyi</i>	Ausente Región, excepto Brasil
<i>Aphelenchoides fragariae</i>	Ausente Región, excepto Uruguay
<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	Ausente Región
<i>Ditylenchus angustus</i>	Ausente Región
<i>Ditylenchus destructor</i>	Ausente Región, excepto Chile
<i>Ditylenchus dipsaci raza papa</i>	Ausente Región
<i>Ditylenchus dipsaci raza frutilla</i>	Ausente Región, excepto Argentina
<i>Globodera pallida</i>	Sólo presente en Chile (bajo control oficial) y Perú
<i>Globodera rostochiensis</i>	Sólo presente en Chile (bajo control oficial) y Perú
<i>Heterodera avenae</i>	Ausente región, excepto Perú
<i>Heterodera glycines</i>	Solo presente en Argentina, Brasil y Paraguay
<i>Heterodera zea</i>	Ausente Región
<i>Meloidogyne chitwoodii</i>	Ausente Región, excepto Argentina
<i>Meloidogyne fallax</i>	Ausente Región
<i>Pratylenchus fallax</i>	Ausente Región
<i>Pratylenchus scribneri</i>	Ausente Región
<i>Pratylenchus vulnus</i>	Solo presente en Argentina, Brasil y Chile
<i>Radopholus similis (R. citrophilus)</i>	Sólo presente en Brasil y Perú
<i>Xiphinema diversicaudatum</i>	Ausente Región
<i>Xiphinema italiae</i>	Ausente Región

Figura 9. Lista de nemátodos cuarentenarios para la región según COSAVE, marzo 2016. Reproducido de <http://www.cosave.org/pagina/listado-de-las-principales-plagas-reglamentadas-para-la-region-del-cosave>

En el caso de Uruguay particularmente, para identificar los requisitos fitosanitarios para materiales de propagación de determinado origen, el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca cuenta con un nomenclador donde consultar en la página web: (http://www.mgap.gub.uy/dgssaa_afidiWeb/consultanomenclator.aspx)

Para *L. multiflorum* procedente de Australia no se encuentran publicaciones, pudiendo deberse a que el análisis de riesgo de plagas (ARP) se encuentra en elaboración, o que existan requisitos, pero la Dirección de Servicios Agrícolas (DGSA) no ha emitido resolución formal o que no se haya solicitado.

En cuanto a la misma consulta sobre requisitos sanitarios, el Instituto Nacional de Semillas responde: "En lo que respecta a información sanitaria, INASE no ejecuta

controles fitosanitarios al momento de la importación excepto para la identificación de malezas. INASE muestrea toda la semilla que ingresa al país y la analiza en su Laboratorio Oficial de Análisis de Semillas (LOAS) controlando que la semilla, de acuerdo a la especie, cumpla con los Estándares para la producción y comercialización en nuestro país (entre estos análisis se encuentra el de determinación de "otras semillas"). Cuando se encuentran malezas prohibidas o que superen el límite de tolerancia, INASE inmoviliza y controla ese lote hasta que se determine el destino del mismo. No se cuenta con registro de análisis en donde se encontraran malezas de cuarentenarias. Para cada importación que se realiza de semillas, necesariamente se tramita un AFIDI (Autorización fitosanitaria de ingreso) en el MGAP (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca del Uruguay), en él se detallan los requisitos fitosanitarios con los que debe cumplir la mercadería para el ingreso a Uruguay. Una vez que la empresa importadora tramita el AFIDI (declarando la especie a importar y país de origen), lo que resta es la llegada de la mercadería con su correspondiente certificado de origen y certificado fitosanitario. Este último es el que certifica que la mercadería se encuentra libre de las plagas que Uruguay exige para su ingreso".

El cuadro a continuación detalla las importaciones de *L. multiflorum* desde el año 1998 al corriente año, procedentes de Australia y Nueva Zelanda aportado por INASE (Fig. 9)

Especie	Año	Origen de la importación	
		Nueva Zelanda	Australia
	1998	✓	
	1999	✓	✓
	2000	✓	✓
	2001	✓	
	2002	✓	
	2003	✓	
	2004	✓	✓
	2005	✓	
	2006	✓	
<i>Lolium</i>	2007	✓	
<i>multiflorum</i>	2008	✓	✓
	2009	✓	✓
	2010	✓	✓
	2011	✓	✓
	2012	✓	✓
	2013	✓	✓
	2014	✓	✓
	2015	✓	✓
	2016	✓	✓
	2017	✓	✓

Figura 10. Detalle de importaciones de *L. multiflorum* procedentes de Australia y Nueva Zelanda, para el período comprendido entre 1998-2017. Fuente: INASE, 2017.

Asimismo, los requisitos para el ingreso de *L. multiflorum* al territorio nacional, procedente de Australia se detalla a continuación según comunicación personal por parte del Departamento de Cuarentena vegetal, perteneciente al MGAP:

"Los requisitos fitosanitarios para la importación de semillas de raigrás (*Lolium multiflorum* = *L. italicum*) procedentes de Australia son:

A) La mercadería deberá venir acompañada por el Certificado Fitosanitario (o por el Certificado Fitosanitario de Re-exportación si corresponde) e incluya la siguiente Declaración Adicional:

- 1) El semillero fue oficialmente inspeccionado durante un ciclo completo de crecimiento y encontrado libre de *A. agrostis*. ó

El envío se encuentra libre de la plaga mencionada en el ítem 1), de acuerdo con el resultado del análisis oficial de laboratorio N° ().

B) Sujeto a Inspección Fitosanitaria al ingreso.

C) Sujeto a Análisis Oficial al ingreso".

Esto reafirma la necesidad de establecer protocolos de control en los cuales se incluya al vector, *A. funesta*, y también a *R. toxicus*, como agentes de riesgo para la producción ganadera del país, en las especies de gramíneas capaces de contener las formas anhidrobióticas de los vectores de la ARG. De igual manera, considerar que más allá de que *L. rigidum* sea considerada una maleza en el país, puede que su contaminación provenga de otras gramíneas como el propio *L. multiflorum* importado desde países como Australia. Además, es factible que la presentación de la enfermedad pueda generarse en rastrojos donde exista presencia de esta maleza.

Es necesario mencionar que a pesar de que las tasas de mortalidad son altas (pérdidas directas) los costos asociados a la toxicidad del raigrás anual se encuentran en su mayoría originados por la mano de obra extra para las recorridas diarias, el costo de tratamiento en pasturas y la reducción en la tasa de engorde (Mckay y Ophel, 1993).

5. CONCLUSIONES

Como toda enfermedad exótica, es necesario concientizar del riesgo que representa el potencial ingreso de los agentes etiológicos de la ARG para un país ganadero, como Uruguay. La vía de ingreso de la enfermedad al país es mediante materiales contaminados como ser, plantas y semillas. Es vital realizar una estandarización de protocolos tendientes a evitar la eventual presentación de la patología, mediante el control exhaustivo de materiales procedentes de países como Australia y Sudáfrica. Esto, representa un desafío interdisciplinario para las autoridades sanitarias del país y una responsabilidad para todos los profesionales asociados a la Producción Agropecuaria nacional.

6. BIBLIOGRAFÍA:

1. Allen JG and Gregory AR (2011). The diagnostic significance of detecting *Rathayibacter toxicus* in the rumen contents and faeces of sheep that may be affected by annual ryegrass toxicity. In *Poisoning by Plants, Mycotoxins and Related Toxins* (Riet-Correa, F., Pfister, J., Schild, A.L. and Wierenga, T., eds), pp. 325–330, CAB International.
2. Allen JG (2012). Annual ryegrass toxicity – an animal disease caused by toxins produced by a bacterial plant pathogen. *Microbiology Australia*: 18-21.
3. Barbetti MJ and Riley IT (2006). Field application of *Dilophospora alopecuri* to manage annual ryegrass toxicity caused by *Rathayibacter toxicus*. *Plant Dis.* 90:229-232.
4. Berry PH and Wise JL (1975). Wimmera rye grass toxicity in Western Australia. *Aust. Vet. J.* 51: 525.
5. Berry PH, Howell JMcC, Cook RD (1980). Morphological changes in the central nervous system of sheep affected with experimental annual ryegrass (*Lolium rigidum*) toxicity. *Journal of Comparative Pathology*; 90 (4): 603-617.
6. Berry PH, Richards RB, Howell J, McC Cook RD (1982). Hepatic damage in sheep fed annual ryegrass, *Lolium rigidum*, parasitised by *Anguina agrostis* and *Corynebacterium rathayi*. *Res Vet Sci* ; 32:148–156.
7. Bird AF, Stynes BA and Thomson WW (1980). A comparison of nematode and bacteria colonized galls induced by *Anguina agrostis* in *Lolium rigidum*. *Phytopathology* 70: 1104-1109.
8. Bird AF (1981). The *Anguina-Corynebacterium* association, in *Plant Parasitic Nematodes*, Vol. III (eds B.M. Zuckerman and R.A. Rohde), Academic Press, New York, pp. 303-22.
9. Bourke CA, Carrigan MJ, Love SCJ (1992). Floodplain staggers a tunicamyluracil Toxicosis of cattle in northern New South Wales. *Australian veterinary journal* 69: 228-229.
10. Cares JE, Santos JRP y Tenente RCV (2008). *Taxonomia de Nematoides de Sementes, bulbos y caules-parte II*. RAPP- Vol 16: 39-76.
11. Carslake T. (2006). ARGV attack fought on several fronts. *Farming Ahead*. 11: 62-63. (Australia).
12. Chang JY, Korolev VV (1996). Specific toxicity of tunicamycin in induction of programmed cell death of sympathetic neurons. *Exp Neurol*; 137:201–211.
13. Chang JY, Korolev VV, Wang J-Z. (1997). Neurotoxicity of tunicamycin on cultured cerebellar granule cells. *Neurotoxicology*; 18:129–136.

14. Cheeke PR, LR Shull (1985). Natural Toxicants in feeds and Poisonous Plants. AVI-Van Nostrand-Reinold, New York.
15. Cheeke PR (1995). Endogenous toxins and mycotoxins in forage grasses and their effects on livestock. J. Anim. Sci. 73: 909-918.
16. Chizhov VN, Subbotin SA (1990). Phytoparasitic nematodes of the subfamily Anguininae (Nematoda, Tylenchida). Morphology, trophic specialization, system. Zool. Zh. 69: 15-26.
17. Cockrum PA, Edgar JA (1985). Rapid estimation of corynetoxins in bacterial galls from Annual Ryegrass (*Lolium rigidum* Gaudin) by high-performance liquid chromatography. Aust J Agric Res 36: 35–41.
18. Culvenor CCJ, Frahn JL, Jago MV, Lanigan GW (1978). The toxin of *Lolium rigidum* (annual ryegrass) seedheads associated with nematode-bacterium infection. Effects of poisonous plants on livestock. Academic Press, New York: 349-352.
19. Culvenor CCJ, Jago MV (1985). Annual Ryegrass Toxicity. In: Trichothecenes and Other Mycotoxins. Pp. 159-269.
20. Davis EO, Curran GE, Hetherington WT, Norris DA, Wise GA, Roth IJ, Seawright A A, and Bryden WL (1995). Clinical, pathological and epidemiological aspects of flood plain staggers, a corynetoxicosis of livestock grazing *Agrostis avenacea*. Aust Vet J 72:187-190.
21. Davies SC, White CL, Williams IH, Allen JG, and Crocker KP (1996). Sublethal exposure to corynetoxins affects production of grazing sheep. Aust Jour Exp Agr 36: 649-655.
22. Delgado I (1996). Opción forrajera a los malos secanos cerealistas. Agricultura 765: 295-297.
23. Demanet Filippi R (2012). “Pastizales en el Sur de Chile”. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales Universidad de La Frontera.
24. Dirección de Estadísticas Agropecuarias (DIEA) (2011). Censo Nacional Agropecuario: “Uruguay rural en cifras” <http://www2.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,diea,diea-resumen-de-la-informacion,O,es,0>.
25. Dirección de Estadísticas Agropecuarias (DIEA) (2015). Anuario Estadístico Agropecuario. <http://www2.mgap.gub.uy/DieaAnterior/Anuario2015/DIEA-Anuario2015-01web.pdf>
26. División Contralor de Semovientes (DICOSE) (2011). Declaración Jurada ante DICOSE. <http://www.mgap.gub.uy/unidad-ejecutora/direccion-general-de-servicios-ganaderos/sanidad-animal/dicose/declaracion-jurada-ante-dicose>

27. División Contralor de Semovientes (DICOSE) (1990-2015). Declaración Jurada ante DICOSE. <http://www.mgap.gub.uy/unidad-ejecutora/direccion-general-de-servicios-ganaderos/sanidad-animal/dicose/declaracion-jurada-ante-dicose>
28. Edgar JA, Frahn JL, Cockrum PA (1982). Corynetoxins; causative agents of anual ryegrass toxicity; their identification as tunicamycin group antibiotics. J Chem Soc Chem Commun; 4:222–224
29. Eisenback JD and Triantaphyllou HH. (1991). Root-knot nematodes: Meloidogyne species and races. Pp. 191-274, In: Nickle WR., ed., Manual of Agricultural Nematology. Marcell Dekker: New York.
30. Espinoza N. y Zapata M (2000). Resistencia de ballica anual (*Lolium rigidum*) y avenilla (*Avena fatua*) a herbicidas gramínicos en las zonas centro-sur y sur de Chile. Agric. Téc. (Chile) 60 (1): 3-13.
31. Espinoza N, Seitz K, Mera M, Jobet C, Díaz J, y De Prado R (2002). Respuesta a herbicidas ACCasa y ALS de un biotipo de *L. rigidum* con antecedentes de resistencia a haloxyfop metil. Simiente 72(3-4): 133.
32. Finnie JW, Jago MV (1985). Experimental production of annual ryegrass toxicity with tunicamycin. Aust Vet J; 62:248–249.
33. Finnie JW, O’Shea JD (1988). Pathological and pathogenetic changes in the central nervous system of guinea pigs given tunicamycin. Acta Neuropathol; 75:411–421.
34. Finnie JW (2006). Review of corynetoxins poisoning of livestock, a neurological disorder produced by a nematode-bacterium complex. Aust Vet J; 84:271-277.
35. Fisher JM, Dube AJ and Watson CM (1979). Distribution in South Australia of *Anguina funesta*, the nematode associated with ryegrass toxicity. Aust J Exp Agric Anim Husb. 19: 48.52.
36. Formoso, FA. (1996). Bases morfológicas y fisiológicas del manejo de pasturas. En: Producción y manejo de pasturas. Serie técnica nº 80, INIA Tacuarembó. Editores técnicos: Risso DF, Berreta EJ, Morón A. <http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/111219240807135431.pdf>
37. Galloway JH (1961) Grass seed nematode poisoning in livestock. J Am Vet Med Assoc; 139:1212–1214.
38. Goodey T (1930). On *Tylenchus agrostis* (Steinbuch 1799). J. Helminthol: 8(4), 197-210. doi:10.1017/S0022149X00030108

39. Government of Western Australia (2017). Agriculture and food. "Annual Ryegrass Toxicity in livestock". <https://www.agric.wa.gov.au/livestock-biosecurity/annual-ryegrass-toxicity-livestock>
40. Haag JR (1945). Toxicity of nematode infested with Chewing's fescue seed. *Science*;102: 406–407.
41. Heap I, Knight R (1986). The occurrence of herbicide cross-resistance in a population of annual ryegrass, *Lolium rigidum*, resistant to diclofopmethyl. 1. *Aust Inst Agric Sci* 48: 156-57
42. Instituto Nacional de la Semilla (INASE) (2010). "Control de comercio y estadísticas" <http://www.inase.org.uy/Sitio/Estadisticas/Default.aspx>
43. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) (2005). "Manejo de poblaciones resistentes con herbicidas en los cultivos de cereales de invierno, maíz y arroz". http://www.inia.org.uy/estaciones/la_estanzuela/actividades/documentos/taberner.pdf
44. Jago MV, Payne AL, Peterson JE, Bagust TJ (1983). Inhibition of glycosylation by corynetoxin, the causative agent of annual ryegrass toxicity: a comparison with tunicamycin. *Chem-Biol Interact*; 45:223–234
45. Jago MV, Culvenor CCJ (1987). Tunicamycin and corynetoxin poisoning in sheep. *Aust Vet J* 64, 232–235.
46. Johnson DE, Borman MM, Ben-Ali MN, Ali-Ben MN (1992). Evaluation of plant species for land restoration in central Tunisia. *Journal of Arid Environments* 22(4): 305-322.
47. Kessell D (2010). Annual ryegrass toxicity - current situation. Farm note, 417, February. Government of Western Australia, Department of Agriculture and Food.
48. Kowalski MC, Cahill D, Dora TJ, Colegate SM (2007). Development and application of polymerase chain reaction-based assay for *Rathayibacter toxicus* and a bacteriophage associated with annual ryegrass (*Lolium rigidum*) toxicity. *Aust J Exo Agr* 47: 177-183.
49. Krall EL (1991). Wheat and grass nematodes: *Anguina*, *Subanguina* and related genera. In: Nickle W.R. (Ed), *Manual of Agriculture Nematology*. Marcel Dekker, Inc., New York, p. 721-60.
50. Lehle L, Tanner W (1976). The specific site of Tunicamycin inhibition in the formation of dolichol-bound *N*-acetylglucosamine derivatives. *FEBS Letters* 71, 167-170.
51. Lin T-Y, Wang S-M, Fu W-M, Chen Y-H, Yin H-S (1999). Toxicity of tunicamycin to cultured brain neurons: ultrastructure of the degenerating neurons. *J Cell Biochem*; 74:638–647.

52. Masters AM, Gregory AR, Evans RJ, Speijers JE, Sutherland SS (2006). An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Rathayibacter toxicus*, the bacterium involved in annual ryegrass toxicity, in hay. *Aust J Agr Res.* 57:731-742.
53. Masters AM, Samarasinghe B, Kalkhoven MJ, den Hollander GL, Palmer DG (2011). Improvements to the immunoassay for detection of *Rathayibacter toxicus* in hay. *Crop Past Sci* 62, 523–530.
54. Masters AM, Samarasinghe B, Kalkhoven M, den Hollander L, Palmer DG (2014). A semi-quantitative enzyme-linked immunosorbent assay for *Rathayibacter toxicus*, the bacterium involved in annual ryegrass toxicity, to assist in risk assessment of fodder for domestic use. *Crop and Pasture Science* 65(12):1329-1334.
55. Mendes MAS, Tenente RCV (1995) Detection of nematodes in plant germoplasm introduced into Brazil from 1986 to 1990. *Nemat.Bras.* 20(1): 67-72.
56. McIntosh GH, Rac R, Thomas MR (1967) Toxicity of parasitised Wimmera ryegrass, *Lolium rigidum*, for sheep and cattle. *Aust Vet J* 43: 349
57. McKay AC (1993) Development of annual ryegrass resistant to *Anguina funesta*, the vector in annual ryegrass toxicity. In 'Pests of pastures: weed, invertebrate and disease pests of Australian sheep pastures'. (Ed.ESDelfosse) pp.226--229. (CSIROInformationServices:Melbourne)
58. McKay AC, Ophel KM (1993) Toxigenic *Calvibacter*/*Anguina* associations infecting grass seedheads. *Annual Review of Phytopathology* 31:153-169.
59. McKay AC, Riley IT (1993). Sampling ryegrass to assess the risk of annual ryegrass toxicity. *Aust Vet J* 70: 241-243.
60. Murray TD, Agarkova I, Alderman S, Allen J, Bulluck R, Chitambar J, Divan C, Riley I, Schroeder B, Sechler A, Subbotin S (2014). Recovery Plan for *Rathayibacter* Poisoning caused by *Rathayibacter toxicus* (syn. *Clavibacter toxicus*) National Plant Disease Recovery System, a cooperative project of The American Phytopathological Society and The United States Department of Agriculture, posted at <http://www.ars.usda.gov/research/npdrs>.
61. Murray TD, Schroeder BK, Schneider WL, Luster DG, Sechler A, Rogers EE, Subbotin SA (2017). *Rathayibacter toxicus*, other *Rathayibacter* species inducing Bacterial Head Blight of Grasses, and the Potential for Livestock Poisonings. *Phytopathology*: doi: 10.1094/PHYTO-02-17-0047-RVW.
62. Norton DC (1978). *Ecology of Plant-Parasitic Nematodes*. John Wiley and Sons, New York.
63. Olden K, Bernard BA, White SL, Parent JB (1982). Function of the carbohydrate moieties of glycoproteins. *J Cell Biochem*;18: 313–335.

64. Paterson J (2003). Vaccine to alleviate costly ARGV losses. *Farming Ahead* No 138: 54-55.
65. Peterson JE, Jago MV, Stewart PL (1996). Permanent testicular damage induced in rats by a single dose of tunicamycin. *Reproductive Toxicology* 10: 61-69.
66. Preston CM, Bird AF (1987). Physiological and morphological changes associated with recovery from anabiosis in the dauer larvae of the nematode *Anguina agrostis*. *Parasitology*, v.95, p.125-33.
67. Price PC, Fisher JM, Kerr A (1979). On *Anguina funesta* N. SP. and its association with *Corynebacterium* sp., in infecting *Lolium rigidum*. *Nematologica* 25: 76-85.
68. Purcell DA (1983). Annual ryegrass toxicity: a perspective. *Toxicon*; 3: 357-361.
69. Putnam M (2009). *Rathayibacter toxicus*, select agent [Poster]. 2nd Annual meeting of the National Plant Diagnostic Network. Miami, FL, (December 6-10, 2009). http://plantclinic.bpp.oregonstate.edu/files/plant_clinic/R%20toxicus%20poster%20final%20for%20NPDN%20mtg%202009%20%282%29.pdf
70. Riley I (1992). "Paddock sampling for management of annual ryegrass toxicity," *Journal of the Department of Agriculture, Western Australia. Series 4: Vol. 33: No. 2, Article 4.*
71. Riley LT, McKay AC (1990). Specificity of the adhesion of some plant pathogenic microorganisms to the cuticle of nematodes in the genus *Anguina* (Nematoda: Anguinidae). *Nematologica* 35: 90-103.
72. Riley IT, McKay AC (1991). Inoculation of *Lolium rigidum* with *Clavibacter* sp., the bacterium responsible for toxicity of annual ryegrass. *J Appl Bact.* 71:302-306
73. Riley IT (1995). *Vulpia myuros* and the annual ryegrass toxicity organisms, *Anguina funesta*, and *Clavibacter toxicus*. *Fund. Appl. Nemat.* 18:595-598.
74. Riley IT, Barbetti MJ (2008). Australian anguinids: their agricultural impact and control. *Australasian Plant Pathology* 37: 289.
75. Riley IT, Bertozzi T (2004). Variation in sex ratios in four *Anguina* (Nematoda: Anguinidae) species. *Transaction of the Royal Society of South Australia* 128: 43-46.
76. Roberts WD, Mlodawski G, Macdonagh A, Gibson R, Bucat J (1994). The distribution of annual ryegrass toxicity in Western Australia. In "Plant associated toxins: agricultural, phytochemical and ecological aspects". (Eds SM Colegate, PR Dorling) pp. 51-56. (CAB International: Wallingford, UK).

77. Sasaki J, Chijimatsu M, Suzuki K (1998). Taxonomic significance of 2, 4-diaminobutyric acid isomers in the cell wall peptidoglycan of actinomycetes and reclassification of *Clavibacter toxicus* as *Rathayibacter toxicus* comb. nov. Intl. J Syst Bact. 48:403-410.
78. Schneider DJ (1981). First report of annual ryegrass toxicity in the Republic of South Africa. The Onderstepoort J. Vet. Res. 48:251-255.
79. Schwartz RT, Datema R (1982). The lipid pathway of protein glycosylation and its inhibitors: the biological significance of protein-bound carbohydrates. Adv Carbohydr Chem Biochem; 40:287–379.
80. Shaw JN, Muth OH(1949). Some types of forage poisoning in Oregon cattle and sheep. J Am Vet Med Assoc; 114:315–317.
81. Stewart PL (1998). Long-term effects of acute or chronic poisoning by tunicaminylluracil toxins. In: Toxic Plants and Other Natural Toxicants. 41: 201-204.
82. Stynes BA, Bird AF (1983). Development of annual ryegrass toxicity. Aust J Agric Res. 34: 653-660.
83. Takatsuki A, Tamura G (1982). Inhibition of glycoconjugate synthesis by tunicamycin. In: Tamura G, editor. Tunicamycin. Japan Scientific Societies Press, Tokyo :35–70.
84. Tenente RCV, Manso ESBC (1987). Nematoides de sementes. In: Patologia de sementes, Fundação Cargill, Campinas. S.P. p. 107- 45.
85. Tenente RCV, Prates M, Razuck RC (1998). Interceptação de fitonematoides de importância quarentenária e econômica em germoplasma importado. Fitopat. Bras. 23 (Supl.), p.308.
86. Tenente RCV, Cares JE, Sousa AIM, Marinho VLA (2007). Notificação da presença de *Anguina*, nematoide quarentenário para o Brasil, em sementes de trigo importado de Argentina. Fitopat. Bras. 32 (Supl.): p. 200.
87. Terrel E (1968). A taxonomic revision of the genus *Lolium*. Techn. Bull Us Dept. Agric. 1392, 65.
88. Than KA, Stevens V, Knill A, Gallagher PF, Gaul KL, Edgar JA, Colegate SM, (2005). Plant-associated toxins in animal feed: Screening and confirmation assay development. Animal Feed Science and Technology 121: 5–21
89. U.S Government Publishing office (2017). Code of Federal Regulations. Select Agents and Toxins list. <https://www.gpo.gov/fdsys/browse/collectionCfr.action?collectionCode=CFR>

90. Villalba A (2009). Resistencia a herbicidas. Glifosato*. Ciencia, Docencia y Tecnología N° 39, Año XX, Comunicaciones Ciencias Exactas y naturales (169-186).
91. Vogel P, Petterson DS, Berry PH, Frahn JL, Anderton N, Cockrum PA, Edgar JA, Jago MV, Lanigan GW, Payne AL, Culvenor CCJ (1981). Isolation of a group of glycolipid toxins from seedheads of annual ryegrass (*Lolium rigidum* Gaud.) infected by *Corynebacterium rathayi*. Aust J of Exp Biol and Med Sci 59, 455–467.
92. Vogel P, Stynes BA, Coackley W, Yeoh GT, Peet RL, Takatsuki A, Petterson DS (1983). Corynetoxins, the causal agents of annual ryegrass toxicity shown to be closely related to the antibiotic tunicamycin. Toxicon; 3: 477- 480.

7. GLOSARIO

AFIDI: Autorización Fitosanitaria De Importación.

Agallas: excrecencia de tejido vegetal que actúa como continente de nematodos y bacterias.

ARGT: del inglés “Annual ryegrass toxicity” y traducido al español como Toxicidad del raigrás annual.

Corinetoxinas: toxinas producidas por *Rathayibacter toxicus*.

COSAVE: Comité Regional de Sanidad Vegetal del Cono Sur.

CSIRO: “Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation”. Es la agencia de investigación oficial del gobierno de Australia.

FPS: “Flood Plain Staggers”; enfermedad reportada en Australia producida por la intoxicación con corinetoxinas, asociada al consumo de *Agrostis avenacea* (*Lachnagrostis filiformis*) y *Polypogon monspeliensis*

Gluma: vaina estéril, externa, basal y membranosa presente en plantas gramíneas o poáceas y ciperáceas.

INASE: Instituto Nacional de la Semilla.

INIA: Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria.

LOAS: Laboratorio Oficial de Análisis de Semillas.

Meristema: puntos de crecimiento de la planta; tejidos embrionarios capaces de diferenciarse o perpetuarse; es decir, se multiplican activamente para formar los tejidos adultos diferenciados.

MGAP: Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca.

RER: Retículo Endoplásmico Rugoso. Organelo celular que tiene como función principal la síntesis, y el transporte de proteínas.