



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**VARIABILIDAD GENÉTICA Y ALCALOIDES
PIRROLIZIDÍNICOS DE *Senecio* spp. ASOCIADOS A
INTOXICACIÓN EN BOVINOS EN LA REGIÓN ESTE DEL
URUGUAY**

Vet. García, Juan Agustín

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

URUGUAY

2017



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**VARIABILIDAD GENÉTICA Y ALCALOIDES
PIRROLIZIDÍNICOS DE *Senecio* SPP. ASOCIADOS A
INTOXICACIÓN EN BOVINOS EN LA REGIÓN ESTE DEL
URUGUAY**

Vet. Juan Agustín García

Dr. Fernando Dutra
Director

Dr. Juan Rosas
Co-director

**Dra. Carmen García
y Santos**
Co-directora

2017



FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Posgrados

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS
DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

**“VARIABILIDAD GENÉTICA Y ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS
DE *Senecio* SPP. ASOCIADOS A INTOXICACIÓN EN BOVINOS
EN LA REGIÓN ESTE DEL URUGUAY”**

Por: Dr. Juan Agustín García

Director de Tesis: Dr. Fernando Dutra

**Codirector de Tesis: Dr. Juan Rosas
Dra. Carmen García y Santos**

Tribunal

Presidente: Dr. José M. Verdes

Segundo Miembro: Dr. Ernesto Odriozola

Tercer Miembro: Dra. Mercedes Rivas

Fallo del Tribunal:

Aprobado con Mención

Montevideo
Miércoles 6 de diciembre de 2017



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA
Posgrados Académicos y Especializaciones

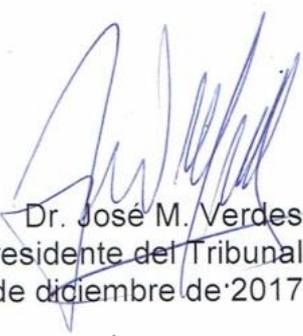
El tribunal considera que ha realizado un excelente trabajo de tesis con una adecuada redacción escrita y correcta revisión bibliográfica para sustentar la justificación e hipótesis del trabajo, además de los objetivos planteados.

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

Parte de los resultados obtenidos han sido publicados en una revista indexada de alcance internacional.

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

Por todo lo anterior, el Tribunal por unanimidad califica el trabajo de Tesis titulado "Variabilidad genética y alcaloides pirrolizidínicos de *Senecio* spp. asociados a intoxicación en bovinos en la región Este del Uruguay" del Dr Juan Agustín García, como APROBADA CON MENCIÓN.



Dr. José M. Verdes
Presidente del Tribunal
6 de diciembre de 2017

DEDICATORIAS

A mis padres, hermano y novia.

AGRADECIMIENTOS

Mi mayor agradecimiento a mis tutores Dr. Fernando Dutra, Dr. Juan Rosas y Dra. Carmen García y Santos por su continuo apoyo y guía durante este proceso.

A Carina, Machado, Leti y Stella del DILAVE Regional Este; a los colegas/amigos Gime, Fer, Lu y José, y Anita, Alejandra, Santiago, Dahiana, Colo y Carmen del Área Toxicología por su compañía y apoyo día a día.

Un especial agradecimiento a Juan Rosas y Luciana Gillman por su ayuda “molecular”.

A los colegas y productores como actores principales para permitirme llevar a cabo el estudio: José Aroztegui, Daniel Arrambillete, Carlos Casas, Álvaro Castro, Andrés Corradi, José Luis Ferrari, Gretel Koster, Federico Lanfranco, Gonzalo Macció, Vinay Martínez, Carolina Mayol, Aparicio Nocedo, Marcos Padilla, Norberto Paiva, Felipe Perdomo, Rubén Rivas, Marisa Rodríguez, Nicolás Rosas, Víctor Soria, Gerardo Sosa, Roberto Quadrelli.

Al Dr. Dale Gardner por participar y realizar estudios incluidos en el trabajo.

Al Centro Universitario Regional Este, DILAVE Regional Este, INIA Treinta y Tres e INIA Las Brujas que permitieron utilizará sus instalaciones para llevar a cabo el proyecto.

Finalmente, agradezco a mi novia, Gachi y a mi familia por su compañía y apoyo permanente en mis decisiones personales y profesionales.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	ix
SUMMARY	x
Trabajos publicados en el marco de la Tesis	xi
Glosario	xii
INTRODUCCIÓN	1
IDENTIFICACIÓN DEL PROBLEMA	2
Seneciosis en bovinos en la Región Este de Uruguay	2
Análisis espacio-temporal de los focos de seneciosis.....	6
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
Variación genética de las plantas.....	9
Variación genética de <i>Senecio</i>	10
Variación genética y alcaloides pirrolizidínicos	11
INVASIÓN, EVOLUCIÓN Y EXPANSIÓN DE LAS PLANTAS	13
Procesos evolutivos	13
Procesos ecológicos	14
<i>Senecio</i> como especie invasiva.....	15
Estructura y clasificación de los alcaloides pirrolizidínicos del género <i>Senecio</i>	16
Vía de biosíntesis.....	17
Toxicidad de los AP y mecanismo de acción.....	18
Toxicidad en bovinos	18
OBJETIVOS.....	21
Objetivo general.....	21
Objetivos específicos:.....	21
HIPÓTESIS	21
ESTRATEGIAS DE LA INVESTIGACIÓN	21
MATERIALES Y MÉTODOS	21
Recolección y acondicionamiento de muestras de <i>Senecio</i> spp.....	21
Identificación botánica.....	22
Análisis de perfil químico	22
Evaluación de la variación genética.....	23
Intoxicación experimental con <i>Senecio oxyphyllus</i>	25
RESULTADOS	26
Principales especies de <i>Senecio</i> identificadas	26
Alcaloides pirrolizidínicos en plantas de <i>Senecio</i>	31
Estudio molecular y evaluación de la variación genética	32
Análisis <i>post-mortem</i> de seneciosis en bovinos de predios visitados.....	34

Intoxicación experimental con <i>Senecio oxyphyllus</i> en bovinos	36
DISCUSIÓN	38
CONCLUSIÓN	43
Referencias bibliográficas.....	44

RESUMEN

Las intoxicaciones por consumo de especies del género *Senecio* representan la intoxicación asociada a plantas más frecuente en animales de producción en el mundo. En el Este de Uruguay es la principal causa tóxica de muerte en bovinos con un crecimiento exponencial en los últimos años en departamentos vecinos a la frontera con Brasil. Los objetivos del presente trabajo fueron identificar las principales especies de *Senecio* involucradas en los brotes de intoxicación en bovinos en la región Este del Uruguay, estudiar su variación genética y determinar perfiles de alcaloides pirrolizidínicos. Para ello se llevó a cabo un estudio en 28 predios ganaderos asociados a intoxicación en bovinos de pastoreo en el Este de Uruguay. Se recolectaron 50 poblaciones de *Senecio*, en 2015 y 2016, para identificación, análisis de alcaloides y estudio de variación genética. A su vez, se realizó examen *post-mortem* en bovinos de casos naturales y experimentales para confirmar la intoxicación. Se identificaron 4 especies de *Senecio*: *S. oxyphyllus* (46%), *S. madagascariensis* (22%), *S. selloi* (20%) y *S. brasiliensis* (12%). Los principales alcaloides identificados mediante HPLC-MS fueron: retrorsina en *S. oxyphyllus*; retrorsina, usaramina, senecivernina/senecionina en *S. selloi*; retrorsina, senecivernina/senecionina, integerrimina, usaramina en *S. madagascariensis*; e integerrimina, retrorsina y senecionina en *S. brasiliensis*. La concentración total media de alcaloides fue más alta en *S. brasiliensis* (17.6 mg/g) seguida por *S. oxyphyllus* (6.2 mg/g), *S. selloi* (1.8 mg/g) y *S. madagascariensis* (0.6 mg/g). La concentración de alcaloides resultó mayor en 2015 vs 2016, posiblemente asociada a un factor ambiental común. En el estudio genético se encontraron 489 marcadores moleculares de polimorfismos amplificados relacionados con secuencias (SRAP), asociados a especie y potrero, utilizados para los análisis de variación genética. No hubo asociación entre grupos determinados por marcadores moleculares y especies determinadas botánicamente, no permitiendo agrupar significativamente a individuos de la misma población, de la misma especie, ni del mismo departamento. La mayor variación genética fue debida a variación entre poblaciones (48,4%), seguida por variación entre especies (28.7%), y entre departamentos (22,9%). No se observó correlación entre las matrices de distancia genética y geográfica. Los resultados permitieron concluir que hubo un aumento en el riesgo de intoxicación para los bovinos de pastoreo asociado a una mayor infestación con especies emergentes y re-emergentes de *Senecio*, de alta toxicidad. Particularmente, *S. oxyphyllus* y *S. madagascariensis* no fueron previamente reconocidas como tóxicas en la región Este de Uruguay. Su alta densidad y mayor presencia, actuando como plantas invasoras y en expansión, demuestra el potencial de riesgo tóxico para el ganado, también generando alteración de las especies vegetales nativas deseables. Particularmente, *S. oxyphyllus* se encontraba en el 82% de los predios, en alta densidad y relativa alta toxicidad sugiriendo que sea la principal especie involucrada en los brotes de seneciosis. Los procesos de hibridación, múltiples introducciones y pre-adaptación, junto al mantenimiento de una alta variación genética durante la invasión, probablemente contribuyeron al éxito de expansión con supervivencia a largo plazo.

SUMMARY

The genus *Senecio* is one of the largest genera of angiosperm plants distributed, and recognized as the most frequent plant-related poisoning in livestock worldwide. In Eastern Uruguay there has been a significant increase of seneciosis in grazing livestock with most affected localities related to counties neighboring the Brazilian border. A survey in 28 farms associated with poisoning outbreaks in grazing cattle in Eastern Uruguay was carried out. Fifty populations of *Senecio* plants were collected species identification, alkaloid analysis and genetic variation studies. Also, *post-mortem* examination was carried out in cattle from natural and experimental cases to confirm intoxication. Four species of *Senecio* were identified: *S. oxyphyllus* (46%), *S. madagascariensis* (22%), *S. selloi* (29%), and *S. brasiliensis* (12%). Alkaloids were identified by HPLC-MS analysis and included: retrorsine in *S. oxyphyllus*; retrorsine, usaramine, and senecivernine/senecionine in *S. selloi*; retrorsine, senecivernine/senecionine, integerrimine, and usaramine in *S. madagascariensis*; and integerrimine, retrorsine and senecionine in *S. brasiliensis*. Total mean alkaloid concentration was found to be highest in *S. brasiliensis* (17.6 mg/g) followed by *S. oxyphyllus* (6.2 mg/g), *S. selloi* (1.81 mg/g) and *S. madagascariensis* (0.6 mg/g). Alkaloid concentrations were also found to be higher in 2015 vs. 2016 probably due to a common environmental factor. In the genetic study 489 molecular markers of SRAP were found, associated to species and paddock, used for genetic variation analyzes. There was no association between groups determined by molecular markers and botanically determined species, not allowing significant grouping of individuals from the same population, from the same species, or from the same department. The greatest genetic variation was due to variation between populations (48.4%), followed by variation between species (28.7%), and between departments (22.9%). No correlation was observed between genetic and geographic distance matrices. The results allowed to conclude that there was an increase in the risk of intoxication for grazing cattle associated to a higher infestation with emergent and re-emergent *Senecio* species of high toxicity. The species *S. oxyphyllus* and *S. madagascariensis* were not previously recognized as toxic plants in the Eastern Uruguay. In turn, the higher presence and density, acting as invasive and expansive plants, demonstrates the potential of risk for livestock, also generating alteration of desirable native plant species. Particularly, *S. oxyphyllus* was present in 82% of the farms surveyed and occurred in high density with relative high concentrations of pyrrolizidine alkaloids suggesting it may be the main species involved in the outbreaks of seneciosis. Hybridization, multiple introductions and pre-adaptation with the maintenance of high genetic variation during invasion, probably contributed to successful expansion with long-term survival.

Trabajos publicados en el marco de la Tesis

1. Juan A García, Carmen García y Santos, Juan Rosas, Fernando Dutra, Dale R. Gardner. A Survey of *Senecio* spp. affecting livestock in Uruguay and the associated Pyrrolizidine Alkaloid Content. Aceptado, octubre 2017. Ciencia Rural (CR-2017-0621).
2. Estudio de Seneciosis afectando al ganado en el Este del Uruguay asociado al contenido de alcaloides pirrolizidínicos. Autores: García, Juan Agustín; García y Santos, Carmen; Rosas, Juan, Dutra, Fernando; Gardner, Dale. X Jornadas Técnicas Veterinarias 2017, en Facultad de Veterinaria, UdelaR, Montevideo, Uruguay. 15 y 16 de noviembre del 2017.
3. “Análisis retrospectivo de intoxicaciones asociadas a plantas tóxicas, micotoxinas y otros compuestos en bovinos de la Región Este de Uruguay (1994-2015).” García JA, Romero A, Quinteros C, Dutra F. XLIV Jornadas Uruguayas de Buiatría – Paysandú 2016. Paysandú, Uruguay. Publicado en manual del congreso (ISSN 1688-6674). 9 y 10 de junio del 2016:
4. Dutra F, García JA, Romero A, Quinteros C. Intoxicación por *Senecio oxyphyllus* en vaquillonas. Boletín Veterinario: Archivos veterinarios del Este n19, 2016, p.5-7. Publicación del Laboratorio Regional Este de DILAVE “Miguel C Rubino”, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP).
5. Dutra F, García JA, Romero A, Quinteros C. Intoxicación por *Senecio madagascariensis* en vacas. Boletín Veterinario: Archivos veterinarios del Este n18, 2015, p.4-5. Publicación del Laboratorio Regional Este de DILAVE “Miguel C Rubino”, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP).

Tutoría de las siguientes tesis de grado:

1. “Caracterización histopatológica de casos de intoxicación por *Senecio* en bovinos en la región Este”, Bachiller Natalie Beguerie. Facultad de Veterinaria, Universidad de la República. Tutor: Juan Agustín García. Co-tutores: Fernando Dutra y Carmen García y Santos.
2. “Intoxicación experimental por *Senecio oxyphyllus* en bovinos”. Bachilleres Camila Rezk, Matías De León y Rodrigo Giro. Facultad de Veterinaria, Universidad de la República. Tutor: Juan Agustín García. Co-tutores: Fernando Dutra y Carmen García y Santos.

Proyectos:

1. Enmarcado en el Polo de Desarrollo Universitario del CURE Treinta y Tres: “Patogenicidad, Toxicidad y Genética de Plantas Tóxicas en los Ecosistemas Pastoriles de la Región Este de Uruguay”. Propuesta en alianza entre DILAVE Regional Este, FVet, UdelaR e INIA.
2. “Seneciosis en bovinos en la región Este de Uruguay: aspectos patológicos y estudio experimental con *Senecio oxyphyllus*”. Proyecto CSIC-PAIE 2017-2018 (categoría A). Estudiante responsable: Natalie Beguerie. Estudiantes co-responsables: Rodrigo Giro y Camila Rezk. Tutor responsable: Juan Agustín García. Co-tutora: Carmen García y Santos. Proyecto n°45.

Becas:

1. Beca de financiación de Maestría (POS_NAC_2016_1_130860). Agencia Nacional de Investigación e Innovación, 2017.

Glosario

Alelo: secuencia particular presente en un locus.

Estructura genética: diferencias en las frecuencias alélicas entre las poblaciones. Especies con alta estructura genética, son las que se pueden detectar fuertes diferencias en las frecuencias alélicas entre las poblaciones, y especies con baja estructura genética, son casi idénticas, con nulas o muy pocas diferencias en las frecuencias alélicas.

Conespecíficos: dos o más individuos, poblaciones o taxones pertenecen a la misma especie.

Corimbiforme: inflorescencia abierta, racemosa o racimosa en la que el eje es corto y los pedicelos de las flores son largos y salen a diferentes alturas del eje.

Deriva génica: fuerza evolutiva que actúa junto con la selección natural cambiando las frecuencias alélicas de las especies en el tiempo. Es un efecto estocástico que es consecuencia del muestreo aleatorio en la reproducción y de la pérdida de unos alelos por azar y no por selección natural. Se trata de un cambio aleatorio en la frecuencia de alelos de una generación a otra.

Ecotipos: subpoblación genéticamente diferenciada que está restringida a un hábitat específico, un ambiente particular o un ecosistema definido, con unos límites de tolerancia a los factores ambientales.

Flores dimorfas: Flores liguladas y tubulosas en un mismo capítulo.

Flujo génico: también conocido como migración, es la transferencia de alelos de genes de una población a otra. La migración hacia o desde una población puede ser responsable de importantes cambios en las frecuencias del acervo genético (el número de individuos con un rasgo particular).

Gen: segmento de ADN que lleva la información necesaria para producir una proteína, y en unos casos ARN.

Involucro: conjunto de brácteas que rodea o envuelve a un órgano de la planta, usualmente una flor o una inflorescencia.

Monocarpía: estrategia de reproducción vegetal que se caracteriza por un único episodio reproductivo antes de la muerte.

Pinnatisectas: hoja de nervadura pinnada, cuando está tan profundamente dividida, que los segmentos resultantes alcanzan el nervio medio.

Plasticidad fenotípica: cambio en las características de un organismo en respuesta a una señal ambiental. Es decir, la propiedad de un genotipo de producir más de un fenotipo cuando el organismo se halla en diferentes condiciones ambientales.

Policárpico: planta que florece y produce semillas varias veces a lo largo de su ciclo de vida, y que no muere después de fructificar.

Poliploidía: fenómeno por el cual se originan células, tejidos u organismos con tres o más juegos completos de cromosomas de la misma o distintas especies o con dos o más genomas de especies distintas.

Revoluto: hoja que se encorva por sus bordes sobre el envés o cara externa de la misma.

Sésiles: falta de un órgano que sirva de pie o soporte. En el caso de las hojas es sésil si carece de su unión con el tallo.

Variabilidad genética: variación en el material genético de una población o especie, e incluye los genomas.

Varianza genética aditiva: proporción de varianza genética en un carácter que se debe al componente aditivo de los efectos alélicos. La diversidad genética se utiliza con frecuencia para indicar el potencial de adaptación evolutiva, pero es la variación genética aditiva más que la diversidad genética *per se* que responde a la selección

natural. La diversidad genética abarca el polimorfismo en todos los marcadores, incluyendo los marcadores neutrales, mientras que la variación genética aditiva pertenece a la varianza de rasgos fenotípicos particulares.

Propágulo: parte o estructura de la planta, producido sexual o asexualmente, capaz de desarrollarse de manera separada para dar lugar a un nuevo organismo idéntico al que le formó. Es decir, es cualquier estructura de reproducción y propagación biológica. Por ejemplo, estolones o rizomas.

INTRODUCCIÓN

Las especies vegetales producen numerosos metabolitos secundarios caracterizados por gran diversidad de estructuras químicas y una alta variabilidad intra-específica (Hartmann, 1996). Estos metabolitos son requeridos para la interacción del organismo con su ambiente, aunque no son esenciales para el crecimiento y desarrollo de la especie (Hartmann et al. 2005). Su composición y concentración depende de la constitución genética de la planta como así también de diferentes circunstancias bióticas y abióticas (Hol, 2011). La capacidad de producción de estos fitoquímicos depende de la evolución y la inclusión de nuevos genes lo que resulta en una mayor diversificación genética de la planta (Hartmann et al. 2005).

Los alcaloides pirrolizidínicos (AP) corresponden a una típica clase de metabolitos secundarios, especialmente numerosos y diversos (Hartmann & Witte, 1995). Estos son característicos de varios géneros de plantas dentro de las familias *Asteraceae*, *Boraginaceae* y *Fabaceae*, con una distribución mundial en casi todos los ecosistemas existentes (Hartmann, 1999; Boppre, 2011). Ocurren en más de 6000 especies vegetales, productoras de más de 660 estructuras químicas de AP identificadas, de las cuales más de la mitad se consideran tóxicas (Stegelmeier, 1999; Langel et al. 2011). Entre las plantas con AP más conocidas por su toxicidad, se citan *Senecio* spp., *Echium* spp., *Amsinckia* spp., *Crotalaria* spp. y *Cynoglossum officinale* (Stegelmeier, 2011). La concentración y tipos de AP varían intra- e inter-especie vegetal, determinado por una base genética además de los factores ambientales (Vrieling et al. 1993; Macel et al. 2004; Kirk et al. 2010; Langel et al. 2011).

El género *Senecio* (tribu Senecioneae), de la familia Asteraceae, es uno de los más grandes géneros de plantas angiospermas distribuidos en todo el mundo con más de 1500 especies, principalmente en Sud América y Sud África (Pelser et al. 2007; Yang et al. 2011). Su consumo es reconocido como la intoxicación asociada a plantas más frecuente en animales de producción en el mundo (Bull et al. 1968; Cheeke 1988; Stegelmeier, 1999). Exhiben una excepcional diversidad ambiental, encontrándose dentro de una gran variedad de comunidades de plantas, hábitats y condiciones de suelo (Burrows & Tyrl, 2013). Los AP son el principal compuesto anti-herbívoros en este género, actuando como químico de defensa de conocida gran variedad de AP tanto intra- como inter-especies (Mattocks, 1986; Hartmann & Witte, 1995; Boppre, 2011). Se caracterizan por su efecto hepatotóxico crónico, letal, afectando principalmente bovinos, equinos y ovinos, entre otras especies, existiendo diferencias significativas de susceptibilidad (Stegelmeier, 2011). También hay reportes esporádicos en humanos (Prakash et al. 1999). Se registran 190 AP en 300 especies de la tribu Senecioneae (Hartmann & Witte, 1995; Mroczek & Glowniak, 2002; Langel et al. 2011). Las concentraciones y tipos de AP pueden ser especie-específicas, siendo parcialmente regulados genéticamente (Vrieling et al. 1993, Hartmann & Dierich, 1998).

La enfermedad en bovinos es crónica y generalmente ocurre semanas o meses luego de un consumo repetitivo de la planta, usualmente en invierno, cuando el forraje es escaso. Los signos clínicos son variables, caracterizándose por pérdida progresiva de peso, diarrea intermitente, tenesmo, sin respuesta al tratamiento (Riet-Correa et al. 2009; Panziera et al. 2017). A medida que progresa el cuadro clínico,

pueden aparecer signos nerviosos asociados a encefalopatía hepática, con depresión central marcada, apoyo de la cabeza contra objetos, incoordinación, principalmente de tren posterior, o agresividad marcada (Lucena et al. 2010; Wouters et al. 2013). Patológicamente, se caracteriza por fibrosis y atrofia del hígado, que aparece de consistencia firme y con numerosos nódulos de regeneración (Méndez et al. 1990; Riet- Correa et al. 1993; Cullen & Stalker, 2016). El parénquima hepático puede presentar variaciones de color según grado de fibrosis y eficiencia de drenaje biliar (Grecco et al. 2010). En cavidad abdominal se observa edema seroso de mesenterio y ascitis, edema con múltiples quistes serosos en la mucosa de la vesícula biliar, y petequias y sufusiones en las serosas de las vísceras (Riet-Correa et al. 2009; Cullen & Stalker, 2016). Microscópicamente, el hígado presenta lesiones características de intoxicación por AP caracterizada por fibrosis difusa invasiva, hepatomegalocitosis y proliferación de ductos biliares (Cullen & Stalker, 2016). La extensión y distribución de las lesiones presenta variabilidad según dosis y evolución (Grecco et al. 2010). El sistema nervioso central, en animales con signos nerviosos, presenta degeneración esponjiforme de la sustancia blanca en la unión con la sustancia gris (Wouters et al. 2013).

IDENTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

Seneciosis en bovinos en la Región Este de Uruguay

A nivel regional, en Uruguay, Argentina y sur de Brasil, el consumo de *Senecio* spp. es la principal causa de intoxicación en bovinos a pastoreo, siendo responsable de hasta el 50% de las muertes, con grandes pérdidas económicas (Riet-Correa & Medeiros, 2001; Rissi et al. 2007). Particularmente en Uruguay, según datos registrados por DILAVE Regional Este durante el período 1988 a 2016, la intoxicación por *Senecio* es una de las principales patologías en sistemas extensivos de cría -solo superada por la Tristeza parasitaria- y la más importante de las etiologías tóxicas alcanzando el 25% de las causas de este origen (Dutra et al. 2015; García et al. 2016). También, es la principal planta tóxica de la región litoral Oeste (Dr. Rodolfo Rivero, comunicación personal, 2017).

La región Este cuenta con el 38,3% de la población bovina total de Uruguay, con más de 4.300.000 millones de bovinos de carne, principalmente vacas de cría, terneros y novillitos de recría, denotando la gran importancia para la industria pecuaria del país. La región se caracteriza por tener limitaciones para el uso agrícola de sus suelos, debido a su topografía ondulada a quebrada y suelos con problemas en el drenaje. De aquí que su principal actividad sea ganadera de tipo extensivo, donde predominan los pastizales naturales con gran diversidad de especies vegetales (Más, 1978; Brazeiro et al. 2012), estando los animales en continua exposición a plantas tóxicas. En la región, la intoxicación por *Senecio* spp. ha crecido exponencialmente en los últimos años, siendo que de 91 focos de seneciosis registrados en bovinos en la Base de Datos 33 del DILAVE Regional Este entre 1988 y 2016 (28 años), el 76% de los mismos ocurrieron entre el 2010 y el 2016 (Figura 1).

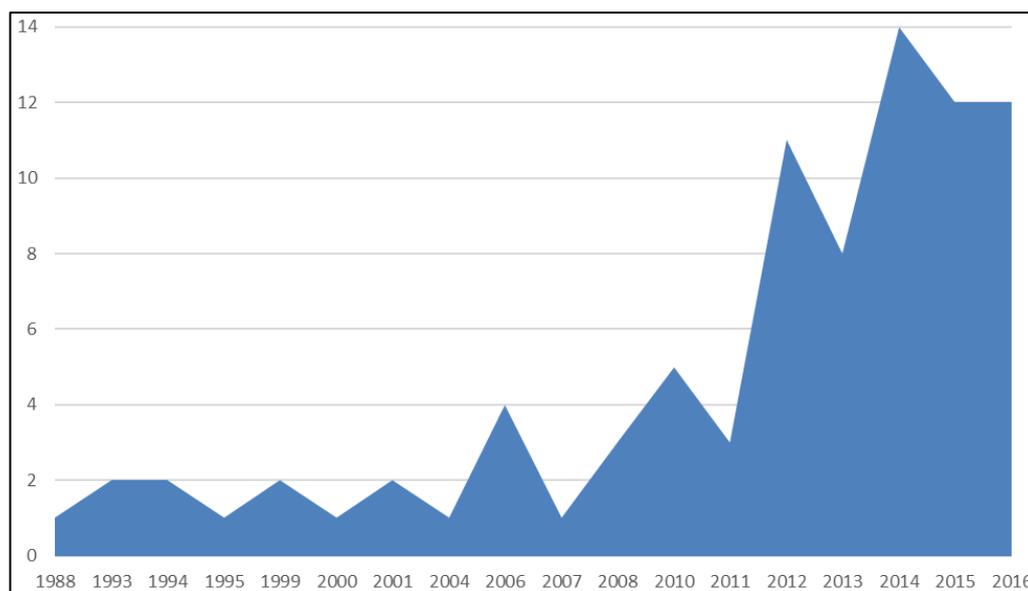


Figura 1. Frecuencia anual acumulada de focos de seneciosis en bovinos en la región Este del Uruguay registrados por el DILAVE Regional Este durante el período 1988 a 2016 (n=91).

Aunque ocurren durante todo el año, los focos presentan un patrón estacional muy marcado, con un pico principal en primavera, entre setiembre y noviembre, (46%), y otro pico secundario en febrero-marzo (13%) (Figura 2). El marcado patrón estacional de primavera, sumado al período de incubación medio de 1 a 3 meses de la seneciosis (Méndez et al. 1990; Bersane et al. 2008; Preliasco et al. 2017), indica que los animales consumen la planta principalmente en invierno, cuando el único forraje verde disponible son los rebrotes de *Senecio* spp.

En cuanto a la edad, la mayoría de los focos ocurren en bovinos adultos, mayores a 2 años, generalmente vacas de cría (Figura 3), debido a su mayor estada en los predios, por lo tanto, mayor exposición a la planta, sumado al carácter acumulativo-crónico de los AP. La enfermedad es rara en terneros destetados (2%). En novillitos y vaquillonas de sobreño, el 85% de los focos ocurren en el pico de primavera y son raros en el resto del año (Figura 4). Esto puede ser debido al manejo con altas cargas instantáneas en invierno de estas categorías lo que favorece el consumo de *Senecio* por parte de los animales (Riet-Correa et al. 2009; Karam et al. 2011). A su vez, las categorías más jóvenes son más susceptibles (Karam et al. 2004).

En cuanto al sexo, globalmente, el 64% de los focos ocurren en las hembras, lo que es debido a la mayor cantidad de vacas de cría en los rodeos del Este (DICOSE 2016). Sin embargo, al comparar las categorías jóvenes, de 1 a 3 años de edad, se constata que 31 focos ocurrieron en novillos y 14 en vaquillonas (Chi cuadrado: 6,42, $P < 0.05$), lo que muestra una mayor susceptibilidad de los machos, como ha sido reportado por otros (Maclachan & Cullen, 1998; Karam et al. 2004).

Epidemiológicamente, la morbilidad global de los focos varía de 1 a 30% y la letalidad 44 a 100% (Cuadro I). Sin embargo, debido a la característica progresiva y letal de la enfermedad, probablemente la letalidad media general sea mayor a los datos de laboratorio.

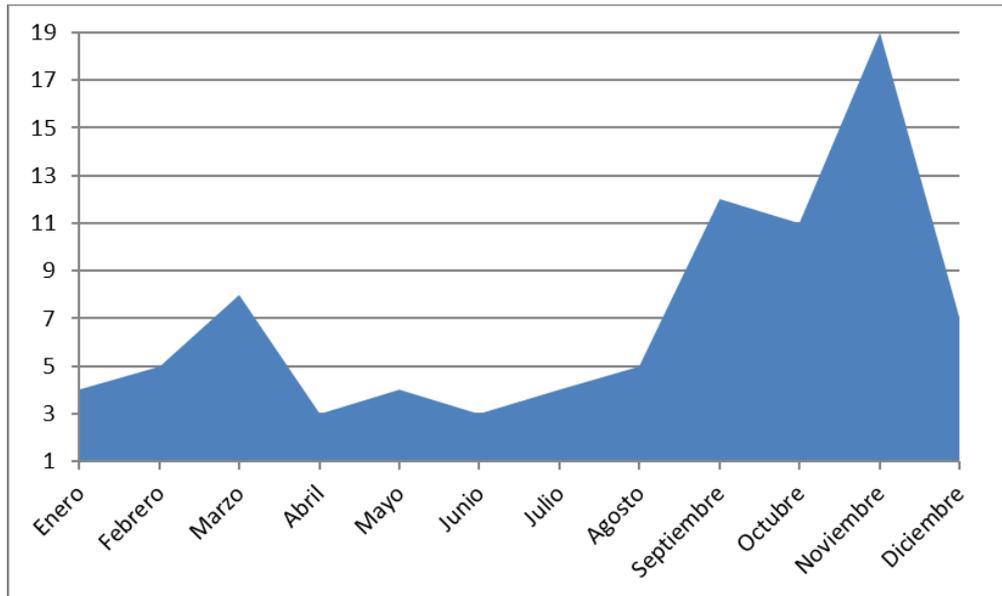


Figura 2. Frecuencia mensual acumulada de los focos de seneciosis en bovinos en la región Este del Uruguay registrados por el DILAVE Regional Este (1988 a 2016) (n=91)

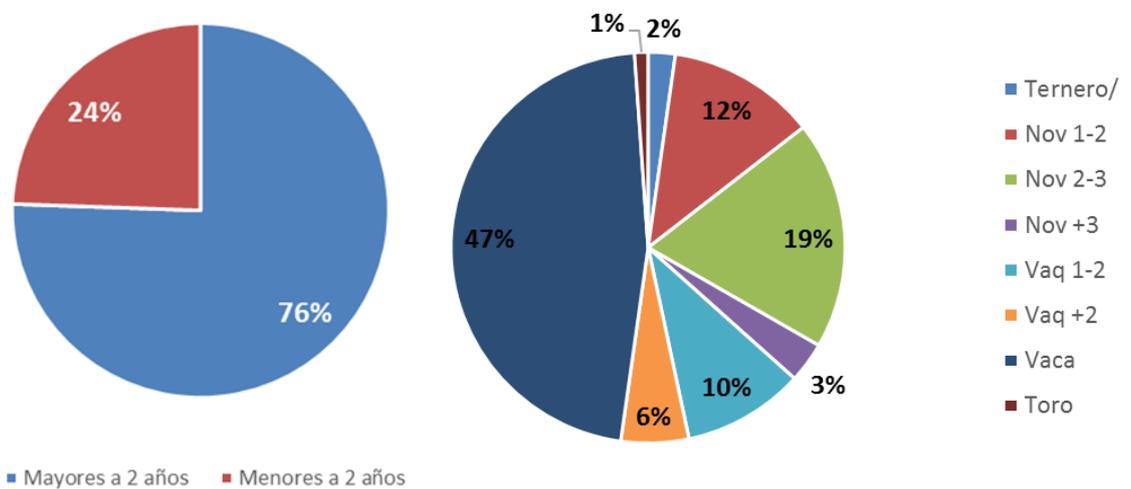


Figura 3. Distribución de seneciosis en bovinos en la región Este según edad (arriba) y categoría (abajo).

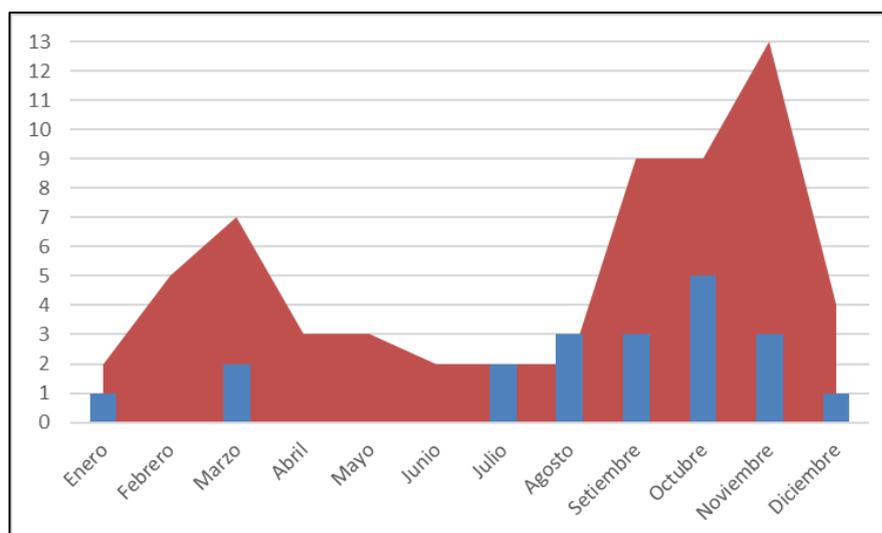


Figura 4. Frecuencia mensual acumulada según edad de 91 focos registrados de seneciosis en bovinos (área roja: bovinos mayores a 2 años; columnas azules: bovinos menores a 2 años)

Cuadro I. Tasas de morbilidad, mortalidad y letalidad de establecimientos asociados a focos de intoxicación por *Senecio* en bovinos registrado por el DILAVE Regional Este (n=85) (1988-2016).

	Enfermos (%)	Muertos (%)	Enfermos/Muertos (%)	Total de animales
Establecimientos				
muestreados (n=28)	129 (2,2%)	120 (2%)	120/129 (93%)	5885
Restantes				
establecimientos (n=57)	314 (3%)	244 (2,4%)	244/314 (77,7%)	10131
Total de establecimientos (n=85)*				
	443 (2,8%)	364 (2,3%)	364/443 (82,2%)	16016

*Seis brotes no presentaban información suficiente por lo que no fueron incluidos en el presente cuadro

La incidencia de morbilidad y mortalidad fueron bajas (media de 5,5 enfermos/foco y media de 4,5 muertos/foco, respectivamente) presentándose los brotes de primavera con muertes en goteo, y casos esporádicos individuales durante el año.

El diagnóstico de la enfermedad se basa en la epidemiología, los signos clínicos, principalmente el desmejoramiento con diarrea intermitente, la falta de respuesta a los tratamientos y a veces signos nerviosos asociados a encefalopatía hepática. La patología macroscópica es muy característica, el hígado aparece de

consistencia firme, con un reticulado fibroso en la superficie de corte, casi siempre hay edema marcado del mesenterio, vesícula biliar y abomaso. Microscópicamente, las lesiones son características de intoxicación por alcaloides pirrolizidínicos, caracterizada por fibrosis difusa invasiva, hepatomegalocitosis y reacción ductal.

Análisis espacio-temporal de los focos de seneciosis

Hasta el año 2007 aproximadamente, la seneciosis en el Este se presentaba como una intoxicación esporádica, en la cual la especie *S. selloi* era la causa predominante, ocurriendo también algunos focos por *S. brasiliensis* en las serranías de la Cuchilla Grande (Dutra et al. 2010). El análisis de la serie histórica temporal de los focos entre 1990 y 2016, muestra un crecimiento exponencial de la patología de proporciones epidémicas a partir del 2010 (Dutra et al. 2016). El análisis estadístico espacial, (GeoDa™ 1.12) muestra un coeficiente de autocorrelación global positiva altamente significativo (Moran I = 0.24, P<0.01), indicando que los brotes de seneciosis están espacialmente correlacionados. El mapa LISA (Figura 5) muestra que el clúster espacial de alta incidencia (alto-alto) está localizado en el noreste de la región incluyendo las seccionales policiales 4ª, 5ª, 11ª, 12ª y 14ª de Cerro Largo, en estrecha proximidad con la frontera con Brasil, y en marcado contraste con el sur y este de la región, donde hay una baja incidencia de la enfermedad (bajo-bajo).

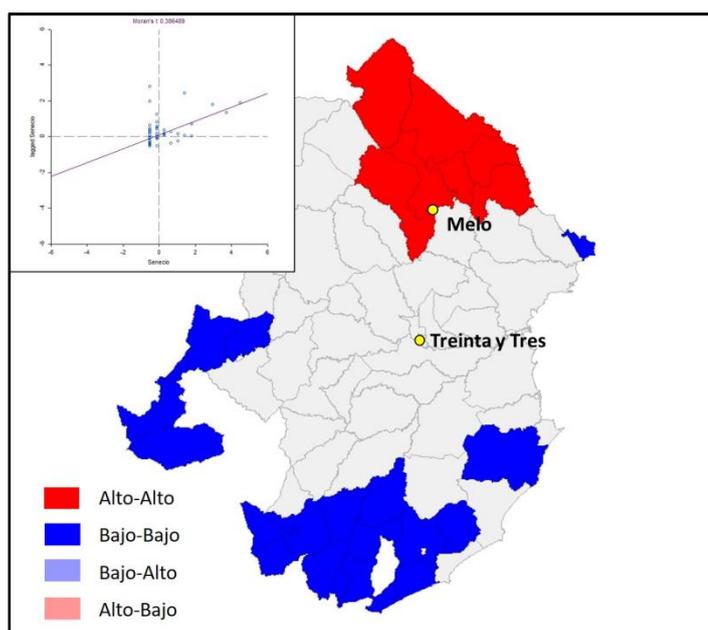


Figura 5. Mapa LISA mostrando el clúster de autocorrelación espacial (Morán I = 0.24, P<0.01) entre los brotes de seneciosis.

A su vez, el análisis espacio-temporal de los focos (SatScan v9.4.2) permite identificar 2 clústeres altamente significativos dentro de la misma zona caliente. El clúster 1 involucra la seccional policial 5ª del departamento de Cerro Largo y el clúster 2 ocurre en las seccionales policiales 11ª y 14ª de Cerro Largo, todas vecinas a la frontera con Brasil (Figura 6) (Dutra et al. 2015). Ambos clústeres son de alto riesgo relativo y larga duración (8 y 7 años, respectivamente). El clúster 1 se inició en el 2007 en la seccional 5ª contra la frontera con Rio Grande do Sul (RS), Brasil,

mientras que el clúster 2 aparece en el 2010 en seccionales más alejadas de la frontera. Esto sugiere un fenómeno de desplazamiento espacio-temporal descendente (Norte-Sur) de los clústeres a punto de partida de la frontera con Brasil (Figura 6). El aumento significativo de la intoxicación en estas zonas se ha asociado a una disminución en la población ovina en los sistemas ganaderos de la zona problema (Figura 7), y también a la aparición o expansión de especies de *Senecio* que anteriormente eran poco prevalentes o inexistentes, tales como *S. madagascariensis*, *S. heterotrichus* y *S. oxyphyllus* (Dutra et al. 2016). Actualmente estas especies emergentes se registran aparentemente con frecuencia creciente en la zona epidémica superando al *S. selloi*, de mayor frecuencia histórica en focos de intoxicación en bovinos en la región Este de Uruguay (Dutra et al. 2010). Significativamente, estos eventos de aparición o expansión creciente de especies emergente potencialmente invasoras de *Senecio* también se han registrado recientemente en municipios de RS, Brasil, próximos a la frontera con Uruguay (Stigger et al. 2014).



Figura 6. Mapa político de Uruguay con sombreado en gris señalando la región este del país (izq.), y mapa amplificado de la región Este con círculos proporcionales al área de los clústeres con ubicación aproximada (der.). En la tabla (abajo) se detallan los datos estadísticos espacio-temporales activos de los brotes de seneciosis durante el período 1988-2016, mediante el análisis estadístico SatScan de Kulldorff.

Cluste	Localizació	Períod	Área	Predio	Foco	Riesgo	Odds	P-
r	n	o	(ha)	s	s	Relativo	Ratio	value
1°	5° C. Largo	2007- 2015	17348 7	403	10	9.93	13.5	<0.00 1
2°	11° y 14° C. Largo	2010- 2017	12541 1	634	18	9.21	22.3	<0.00 0

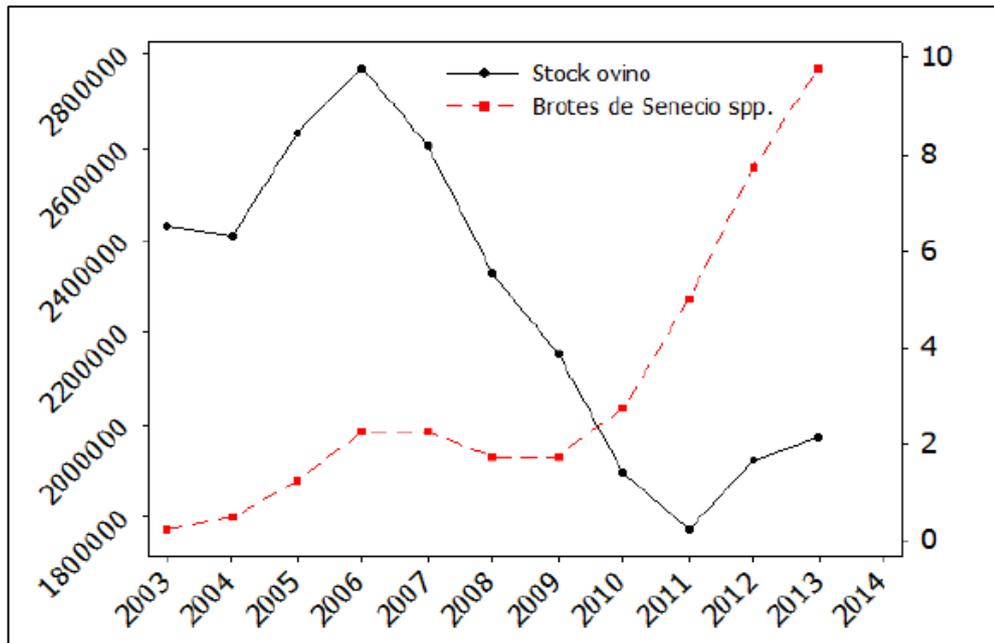


Figura 7. Relación inversa entre focos de Senecio (línea roja; media móvil bianual) y stock ovino en la región Este de Uruguay (línea negra; datos de DICOSE para los Departamentos de Cerro Largo, Rocha, Maldonado, Lavalleja y Treinta y Tres). Adaptado de Archivo Veterinario del Este, 22-23, p9, año 2014 (Dutra et al. 2014). Eje “x”: años; eje “y”: número de ovinos; eje “z”: número de brotes.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Variación genética de las plantas

La variación genética es un pre-requisito importante para la evolución de las plantas, sobre la cual actúan las fuerzas de selección, permitiendo su adaptación, y defensa frente a patógenos o depredadores (Silvertown & Lovett Doust, 1993; Hartmann & Dierich, 1998). La estructura genética de una población tiene un profundo impacto en su capacidad de invasión o expansión ambiental, siendo esencial la diferenciación genética en los nuevos ambientes para lograr las características requeridas que permitan su éxito (Sakai et al. 2001; Lee, 2002; Richardson & Pysek, 2006; Lacmuth et al. 2010).

La adaptación de las especies exóticas a los ambientes o expansión de especies nativas se da principalmente por medio del mecanismo de selección natural, generándose en tiempo evolutivo un ajuste entre los genotipos y sus fenotipos expresados y el ambiente. De este modo, la existencia de diferenciación genética de la población contribuye en la evolución de ecotipos adaptados a los microhábitats particulares (Barret, 1982; Bennington & McGraw 1995, Linhart & Grant, 1996). Sin embargo, el ajuste de los fenotipos expresados, denominado plasticidad fenotípica, y la diferenciación genética no constituyen alternativas mutuamente excluyentes para la adaptación a la heterogeneidad ambiental (Andersson & Shaw, 1994, Black-Samuelsson & Andersson, 1997). Por lo tanto, para que una planta introducida sea exitosa, requiere de niveles suficientemente altos de tolerancia fisiológica y plasticidad fenotípica, y/o lograr diferenciación genética que permita cumplir los niveles de aptitud requeridos (Richardson & Pysek, 2006). Por eso el tiempo de latencia que normalmente precede a invasiones exitosas resulta de la necesidad de acumular niveles adecuados de variación genética (Ellstrand & Schierenback, 2000; Lee, 2002).

Plasticidad fenotípica y variación genética: características que contribuyen a la adaptación de ecosistemas.

Una alta variación genética en especies introducidas permite un mayor ritmo de evolución en respuesta a cambios ambientales, teniendo un alto impacto en las comunidades nativas y ecosistemas futuros a largo plazo (Lavergne & Molofsky, 2007). Durante la introducción y supervivencia, las especies nativas deseables están amenazadas debido a la competencia pudiendo ser reemplazadas por las especies invasoras o en expansión alterando la estructura de la comunidad de plantas y procesos del ecosistema (D'Antonio & Vitousek, 1992; Pimentel et al. 2005; Gardner et al. 2006; Lavergne & Molofsky, 2007). La diferenciación genética puede ocurrir bajo cualquier rasgo ecológico que sea beneficioso ante las nuevas condiciones de selección, siempre que haya variación genética para el mismo (Bossdorf et al. 2005). Se espera que la variación genética aumente el potencial adaptativo de poblaciones introducidas en nuevos ambientes y expansivo de especies nativas no deseables permitiendo mayor aprovechamiento de los ecosistemas en el mediano a largo plazo (Sakai et al. 2001; Lavergne & Molofsky, 2007; Lacmuth et al. 2010).

Particularmente varias especies de *Senecio*, comportándose como invasoras, son un problema para el sector agropecuario, asociado a su capacidad de adaptación

por su alta variación genética y plasticidad fenotípica, además de su capacidad reproductiva (Mattocks, 1986; Wardle et al. 1995; Caño et al. 2009). El estudio de la variación genética de las especies invasoras o en expansión brinda la oportunidad de un mejor conocimiento de la dinámica de la invasión biológica desde una perspectiva ecológica (Le Roux et al. 2010). Este conocimiento permite predecir el comportamiento invasivo y expansivo, para así buscar medidas biológicas efectivas para prevenir o reducir la introducción y dispersión de especies peligrosas para el ecosistema (Bossdorf et al. 2005; Pimentel et al. 2005).

Respecto a la plasticidad fenotípica, considerada la capacidad de un organismo de alterar su fisiología y morfología para producir fenotipos diferentes en respuesta a cambios ambientales, ésta favorece la invasión y adaptación ambiental (Schmalhausen, 1949; Schlichting, 1986; Richardson & Pysek, 2006) permitiendo la naturalización de especies introducidas en distintos rangos geográficos y expansión de especies nativas en nuevos rangos geográficos (Bossdorf et al. 2005).

Tanto la variación genética y/o la plasticidad fenotípica son importantes para la capacidad de dispersión hacia nuevos rangos (Lambrinos, 2004). La variación en tamaño y expresión de los caracteres morfológicos que exhiben las poblaciones es debida en gran parte a la plasticidad fenotípica dada por la capacidad de genotipos individuales de alterar su crecimiento y desarrollo en respuesta a cambios ambientales (Baker, 1974; Barret, 1982).

En cuanto al potencial evolutivo post-invasión, se ve influenciado por la variación genética introducida necesaria para la supervivencia a largo plazo al permitir una mayor plasticidad, la que favorece la adaptación y expansión ante cambios del ambiente en respuesta a presiones de selección (Widen & Andersson, 1993; Lee, 2002; Bossdorf et al. 2005).

Variación genética de *Senecio*

La capacidad de dispersión del *Senecio* en distintas locaciones expresando alta diferenciación genética favorece la adaptación y diversificación en los ambientes, con una gran variación morfológica inter- e intra-especies (Ashton & Abbott, 1992; Pelser et al. 2004; Matzenbacher & Schneider, 2008; Le Roux et al. 2010). En *Senecio* la invasión exitosa ha resultado, tras cambios evolutivos rápidos, mostrando mayores defensas por aumento de las concentraciones de AP y mayor vigor comparado con especies de *Senecio* nativas (Macel et al. 2004; Caño et al. 2008; Caño et al. 2009; Kirk et al. 2010; Pelser et al. 2012; Castells et al. 2014). Particularmente en plantas de *S. pterophorus* introducidas en Europa se observa que presentan mejor performance que las nativas, resultado de la diferenciación genética ante altos niveles de alteración ecológica (Caño et al. 2008). Otro trabajo con *S. pterophorus* y *S. inaequidens* encuentra mayor crecimiento y concentración de AP en las poblaciones introducidas comparadas con las nativas, sugiriendo una alta influencia por diferenciación genética, favoreciendo genotipos con mayores defensas (Caño et al. 2009). Una alta variación genética se observa también en poblaciones introducidas de *S. inaequidens*, *S. madagascariensis*, *S. cambrensis* y *S. integrifolius*, facilitando adaptación y dispersión ambiental (Ashton & Abbott, 1992; Widen & Andersson, 1993; Radford et al. 2000; Le Roux et al. 2010; Lachmuth et al. 2010; Pelser et al. 2012).

Variación genética y alcaloides pirrolizidínicos

La presencia de fitoquímicos como defensa es común en las plantas tras una rápida evolución en áreas invadidas, dependiendo de su estructura genética y factores ambientales para desarrollar el fenotipo defensivo que permita la supervivencia (Berenbaum, 1996; Rasmann & Agrawal, 2009). Esto se observa en general con todos los compuestos tóxicos, y en particular con los AP al presentar aumento de su concentración en las áreas nuevas para actuar como mecanismo de defensa ante predación (Doorduyn & Vrieling, 2011; Castells et al. 2014).

En la tribu Senecioneae se evidencia un fuerte componente de base genética (Witte et al. 1992; Vrieling et al. 1993; Macel et al. 2004) resultando en diversidad de AP especie-específica (Hartman & Dierich, 1998; Witte, 1995) sugerida como una adaptación ante interacciones con patógenos micóticos, insectos y mamíferos (Hol, 2011). Los primeros pasos de la síntesis de AP en la raíz son conservadores, mientras que la diversificación de AP secundarios en las partes aéreas son altamente plásticos, sugiriendo que los diversos perfiles de AP son controlados por procesos específicos de base genética que evolucionaron bajo presión de selección (Hartman & Dierich, 1998). Los grupos de AP de las especies de *Senecio* se transforman en productos únicos resultado de procesos específicos regulados genéticamente (Hartmann & Dierich, 1998), con plasticidad ocurrida en las partes aéreas que genera la diversidad de perfiles y concentraciones, que son dependientes de factores ambientales bajo la influencia de la selección natural (Kirk et al. 2010). Así, la concentración y perfiles de AP varían intra- e inter-especie vegetal, determinado por una base genética además de los factores ambientales (Boppre, 2011).

La evolución asociada a mayor síntesis de AP es continua como un escape de la herbivoría, siendo una resistencia inducida como rol ecológico básico, resultando en diversidad de AP (Hartmann & Dierich, 1998; Hol et al. 2004; Rasmann & Agrawal, 2009; Kirk et al. 2010; Boppre, 2011). La base genética provee la base sobre la cual la selección natural puede actuar (Macel et al. 2004). Al contrario, ante escasa o nula herbivoría, la planta retiene energía no produciendo compuestos de defensa, y resguardando para el metabolismo primario esencial de crecimiento y desarrollo (Blossey & Nötzold, 1995; Hartmann, 2005; Doorduyn & Vrieling, 2011). La variación genética entre poblaciones, factores bióticos y la plasticidad fenotípica causada por factores abióticos estresantes (clima, suelo, etc.) también llevan a esa variación de AP (Macel et al. 2004; Boppre, 2011; Hol, et al. 2011).

Variación inter-especies

La concentración total de AP no es dependiente de las especies pero si determinan la diversidad de perfiles de AP de tal manera que el conjunto de AP dentro de una especie de planta es generalmente único (Pelser et al. 2005; Kirk et al. 2010). El número de tipos de AP encontrados en la tribu Senecioneae muestra sustancial variación inter-especies, no siguiendo un patrón filogenético y con grandes diferencias entre especies cercanas (Pelser et al. 2004; Langel et al. 2011). La plasticidad implicada en la diversificación química AP en las partes aéreas causa esa variación inter-especies (Von Borstel et al. 1989; Witte et al. 1992; Hartmann &

Dierich, 1998). A su vez, la hibridación entre especies de *Senecio* produce nuevos AP que se conservan (Kirk et al. 2010; Cheng et al. 2011).

Variación intra-especies

Los componentes de la variación intra-especie del metabolismo secundario de las plantas están bajo cierto control genético, con perfiles AP especie específicos (Zangerl & Berenbaum, 1990; Berenbaum & Zangerl, 1992; Vrieling et al. 1993; van Dam & Vrieling, 1994; Hartmann & Dierich, 1998). Esto genera similitud en perfiles de AP en las especies, aunque ante distintas condiciones bióticas y abióticas puede generar variación en tipo y concentración de AP (Castells et al. 2014), resultando en diversidad de perfiles de AP con distintos genotipos mostrando diferente respuesta (van Dam & Vrieling, 1994; Kirk et al. 2010; Cheng et al. 2011). Se han observado especies de *Senecio* que poseen una mezcla única de productos químicos de defensa específicos (Macel et al. 2004; Kirk et al. 2004; Kirk et al. 2010). Sin embargo, otros trabajos muestran marcada variación intra-específica de AP asociada a la habilidad de combinar al azar perfiles de AP de un “pool genético”, explicado como una desconexión o activación transitoria de la expresión de genes que codifican las enzimas específicas de los AP (Witte et al. 1992; Pelsner et al. 2005) dependientes de factores ambientales (Kirk et al. 2010). A pesar de la variación con múltiples tipos de AP presentes en una planta, uno de esos tipos es dominante respecto a concentración, siendo específico de especie (Macel et al. 2004; Langel et al. 2010).

Métodos para medir la variación genética en las plantas

Los métodos para medir la variación genética en plantas abarcan desde caracterizaciones morfológicas hasta marcadores genéticos moleculares. Las primeras son características fenotípicas influenciadas por variables ambientales, lo que difiere entre distintos sitios, siendo posible que un mismo genotipo presente diferentes fenotipos (Furnier, 2004; Gianoli, 2004). En cambio, los marcadores moleculares no se ven afectados por el ambiente, midiéndose directamente la variación a nivel del ADN (Becerra & Paredes, 2000; Furnier, 2004; Delgado, 2006). Esto permite el análisis de variación genética inter- y intra-especies y la cuantificación de la variación genética introducida (Barrett & Husband, 1990; Bossdorf et al. 2005). Dentro de las técnicas para análisis con marcadores moleculares, en los últimos 20 años se incluyen el análisis de la variación en la longitud de fragmentos de restricción del ADN (RFLP), variación en fragmentos de ADN amplificados al azar (RAPD) y longitud de fragmentos polimórficos amplificados del ADN (AFLP) entre otras (Furnier, 2004; Li et al. 2013). A partir del 2001 se desarrolla otra técnica basada en PCR llamada polimorfismos amplificados relacionados con secuencias (SRAP, “*Sequence Related Amplified Polymorphism*”) la cual presenta como ventajas la simplificación en el proceso de amplificación sin requerir digestión enzimática, y aumenta el rendimiento y mejora la reproducibilidad comparado con el RAPD (Li & Quiros, 2001; Li et al. 2013). Esta técnica resulta adecuada para el análisis de variación genética en diversas especies vegetales (Li et al. 2013).

INVASIÓN, EVOLUCIÓN Y EXPANSIÓN DE LAS PLANTAS

La invasión y expansión biológica es un fenómeno natural que constituye una de las principales causas de pérdida de biodiversidad, con una tasa de ocurrencia en crecimiento en el curso de la historia tras la expansión del rango de distribución de especies en hábitats donde no estaban presentes (Vitousek et al. 1996; Mack et al. 2000). La capacidad de invasión es una propiedad emergente de los ecosistemas afectada por factores como los atributos de las especies invasoras y la habilidad competitiva de las especies residentes (Lonsdale, 1999). Las especies introducidas deben sortear una secuencia de barreras bióticas y ambientales para convertirse en invasoras y naturalizadas (Richardson & Pysek, 2006). La mayoría de las especies invasoras crecen en un amplio rango de condiciones ambientales en respuesta a un nuevo set de presiones de selección, consecuencia en parte de su plasticidad fenotípica y resultado de la diferenciación genética (Mattocks, 1986; Wardle et al. 1995; Mooney & Cleland, 2001; Caño et al. 2009), existiendo divergencia genética entre poblaciones invasoras y nativas, con cambios evolutivos rápidos para las primeras que llevan al éxito (Bossdorf et al. 2005). Esto se ve influenciado en gran parte por la estructura genética de la población fuente sobre la cual la selección natural actúa llevando a las rápidas adaptaciones en los nuevos ambientes (Lee, 2002).

Existen 3 fases principales para el desarrollo de invasiones exitosas: 1) introducción, donde la planta debe diseminarse en una nueva región geográfica; 2) adaptación o naturalización, donde se produce la formación de poblaciones persistentes en ese nuevo ambiente; y 3) dispersión o expansión, mediante diseminación exitosa (Richardson et al. 2000; Sakai et al. 2001). La progresión de estas fases implica una serie de interacciones dependiente de procesos ecológicos y evolutivos que influyen sobre la estructura genética (Lee, 2002; Barrett, 1982; Lambrinos, 2004; Lavergne & Molofsky, 2007; Le Roux et al. 2010).

Procesos evolutivos

Los procesos evolutivos promueven el éxito de invasión y expansión de las especies con potencial evolutivo en los nuevos ambientes influyendo sobre su estructura genética mediante: cuello de botella, efecto fundador, deriva génica, poliploidía e hibridación (Barrett, 1982; Lambrinos, 2004; Lavergne & Molofsky, 2007).

Estos procesos afectan la variación genética pudiendo resultar en disminución de los niveles de variación genética por reducción drástica en número (cuello de botella) (Nei et al. 1975; Prentis et al. 2008) o formación de una nueva población (efecto fundador) con material genético limitado a los escasos individuos introducidos (Schwaegerle Schaal 1979; Prentis et al. 2008). A su vez, la deriva génica mediante el cambio aleatorio en la frecuencia de alelos en una población produce un aumento de la homocigosidad y un incremento de la varianza entre poblaciones (Nei et al. 1975; Furnier, 2004; Eguiarte et al. 2010). La poliploidización es un proceso principalmente de las plantas angiospermas las cuales mantienen mayores niveles de variación genética (Barrett, 1982; Soltis & Soltis, 1999; Richardson & Pysek, 2006).

La hibridación entre especies en numerosos casos precede al éxito invasivo de las poblaciones, donde la progenie cuenta con beneficios genéticos potenciales (Ellstrand & Schierenbeck, 2000). La hibridación entre las poblaciones que tienen estructuras genéticas muy diferentes puede conducir a nuevos sistemas adaptativos, adaptados a nuevos nichos ecológicos (Anderson & Stebbins, 1954; Ellstrand & Schierenbeck, 2000; Richardson & Pysek, 2006). Usualmente sirve como estímulo para la evolución de especies nuevas e invasoras, creando nuevos genotipos (Abbott, 1992; Ellstrand & Schierenbeck, 2000). La misma puede actuar en poblaciones introducidas en escalas cortas de tiempo (Lambrinos, 2004). La hibridación puede ser una amenaza a la integridad de las especies nativas mediante asimilación genética, y una fuente de nueva variación y nuevas especies (Mooney & Cleland, 2000; Pelsler et al. 2012).

Otra forma por la que las plantas invasoras pueden evolucionar en las áreas introducidas se da por cambios drásticos en los regímenes de selección impuestos por los nuevos ambientes (Bossdorf et al. 2005; Richardson & Pysek, 2006). Al igual que la hibridación, tiene la capacidad de actuar en escalas de corto tiempo sobre las poblaciones introducidas (Lambrinos, 2004). Esto también se presenta ante los cambios climáticos al provocar alteraciones en la biodiversidad influyendo en las pautas de introducción y éxito de establecimiento de especies (Bradley et al. 2009; Bradley et al. 2010; Hodar et al. 2012).

El potencial de cambios evolutivos para la adaptación es en respuesta a la interacción con el nuevo ambiente (Barrett & Husband, 1990; Richardson & Pysek, 2006; Lavergne & Molofsky, 2007; Karakas et al. 2011). Los procesos evolutivos que favorecen la expansión geográfica e invasividad se ven acentuados en especies con mayor variación genética (Richardson & Pysek, 2006; Lavergne & Molofsky, 2007; Karakas et al. 2011). Las especies en expansión o introducidas pueden superar a las nativas, y cambiar la estructura y funcionamiento de las comunidades y ecosistemas (Mack et al. 2000; Levine et al. 2004) o permanecer en poblaciones bajas por años y luego tener un crecimiento exponencial conocido como efecto lag, necesarios para acumular niveles necesarios de variación genética (Mooney & Cleland, 2001; Lee, 2002). Aquellas especies vegetales con baja variación genética suelen ser más vulnerables a la extinción en el mediano a largo plazo (Mooney & Cleland, 2001; Huang et al. 2014).

Aunque muchas de las invasiones biológicas predisponen a las plantas invasoras a la variación genética y a los procesos evolutivos, estos no son exclusivos (Barrett & Husband, 1990; Ellstrand & Elam, 1993; Ellstrand & Schierenbeck, 2000; Mooney & Cleland, 2001; Lee, 2002; Prentis et al. 2008).

Procesos ecológicos

Diversos factores ecológicos también están implicados en el éxito de las invasiones y expansiones, siendo los principales: múltiples introducciones, pre-adaptación ambiental, grado de heterogeneidad de ambiente y flujo génico, que contribuyen a la variación genética y por lo tanto al éxito de invasión y expansión (Barrett, 1982; Lambrinos 2004; Lavergne & Molofsky, 2007; Lacmuth et al. 2010; Le Roux et al. 2010).

Las múltiples introducciones permiten la emergencia de nuevas combinaciones genéticas al incrementar la probabilidad de recombinación entre especies introducidas de distintos orígenes (García et al. 1989; Ellstrand & Schierenbeck 2000), generando invasores perjudiciales con alto potencial adaptativo y teniendo alto impacto en comunidades nativas y ecosistemas futuros (Lavergne & Molofsky, 2007). A su vez, la plasticidad fenotípica y la variación genética resultante de introducciones múltiples tienen una influencia complementaria sobre la dispersión (Lambrinos, 2004).

La introducción de especies exóticas o expansión de especies nativas de regiones climáticamente similares al rango nuevo, conocido como pre-adaptación, permite una adaptación más rápida al ambiente el cual suele ser un pre-requisito importante para el éxito en la invasión y naturalización, y para la expansión de especies nativas (Monty y Mahy, 2009; Lacmuth et al. 2010).

El flujo génico resulta en homogeneización de la estructura genética mediante movimiento de genes de una población a otra (Linhart & Grant, 1996; Eguiarte et al. 2010). Poblaciones de especies con una alta estructura genética indica que probablemente ha existido poco flujo génico entre estas poblaciones por mucho tiempo (Eguiarte et al. 2010). Ante heterogeneidad ambiental, generalmente hay barreras para el flujo génico, realizando la diferenciación genética en poblaciones parcial o totalmente aisladas por diferentes presiones de selección (Linhart & Grant, 1996).

***Senecio* como especie invasiva**

El problema de las plantas del género *Senecio* está dado por su toxicidad para el ganado de pastoreo y el reemplazo de especies nativas deseables (Mattocks, 1986; Hol, 2011). Estas plantas extendieron y siguen extendiendo su rango geográfico por introducción incidental o accidental a nuevos hábitats, con significativo daño ecológico y de salud animal (Boppre, 2011).

Las especies exóticas introducidas y las nativas en expansión han mostrado alta capacidad de colonización, presentando mejor performance, mayor plasticidad que otras especies vegetales nativas (Caño et al. 2008; Mattocks, 1986; Wardle et al. 1995, Carvalho et al. 2013), con mayores niveles de toxicidad en las áreas invadidas, asociado a mayor concentración de AP (Hol et al. 2004; Castells et al. 2014). Distintas especies de *Senecio* son consideradas plagas en países como Australia, Nueva Zelanda y Norte América asociado a intoxicación en ganado (Craig et al. 1986; Coombs et al. 2004).

La alta capacidad de invasión y expansión está influenciada por su alta variación genética con rápidos cambios evolutivos (Holm et al. 1997; Böhmer, 2001; Jeanmonod, 2002), como así también por su capacidad adaptativa plástica en distintos ambientes respecto de las poblaciones originales y su alta tasa reproductiva (Caño et al. 2008; Caño et al. 2009). Junto a procesos ecológicos como múltiples introducciones contribuyen al éxito de su dispersión y establecimiento (Lacmuth et al. 2010). El *S. madagascariensis* es de las más estudiadas siendo considerada altamente invasiva con dispersión cosmopolita, teniendo mayor presencia en zonas del hemisferio sur (Le Roux et al. 2006; Le Roux et al. 2010). Un ejemplo fue su

introducción accidental en islas aisladas como Hawaii donde se naturalizó (Motooka et al. 1999; Le Roux et al. 2006), siendo una especie nativa de Madagascar y Sudáfrica (Scott et al. 1998; Sindel et al. 2009). Otras especies del género han mostrado variación fenotípica y genotípica en áreas introducidas, mediante diferenciación adaptativa promoviendo el establecimiento y posterior invasión (Abbot & Lowe, 2004; Caño et al. 2008; Monty & Mahy, 2009).

A su vez, el género presenta alta capacidad competitiva por luz, humedad y nutrientes del suelo, llevando al deterioro de las pasturas nativas (Watson et al. 1994). Su capacidad de desarrollo invernal es otro factor que permite adaptación ambiental y climática, al igual que su alta diversidad y capacidad reproductiva (Matzenbacher & Schneider, 2008).

También poseen una alta capacidad de hibridación entre especies, creando nuevos genotipos y/o nuevas especies, con características defensivas nuevas (Kirk et al. 2004; Le Roux et al. 2006; Pelsner et al. 2007; Pelsner et al. 2012). A su vez la característica poliploide en algunas de las especies les permite mantener mayores niveles de variación genética (Abbott & Lowe, 2004; Richardson & Pysek, 2006).

Estructura y clasificación de los alcaloides pirrolizidínicos del género *Senecio*

Los alcaloides pirrolizidínicos son metabolitos secundarios de las plantas (fitoquímicos), no esenciales para el organismo, pero necesarios para la interacción con otros organismos en el ambiente, por ejemplo, como defensa ante predación por herbívoros (Mattocks 1986; Boppre 2011). Son ésteres que consisten de una base de necina (alcohol amino) y un ácido néxico con una estructura central de 2 anillos de 5 miembros fusionados que comparten un átomo de nitrógeno en la posición 4 (Mattocks 1986; Crews et al. 2010). Según la estructura de la base de necina (esqueleto básico) existen principalmente 4 grupos de AP: retronecina, heliotridina, otonecina y platynecina (Fu et al. 2004). Los AP del grupo retronecina, heliotridina y otonecina contienen una base de necina insaturada siendo altamente tóxicos, mientras los de tipo platynecina con base de necina saturada no son tóxicos (Boppre 2011; Yang et al. 2011; Zhu et al. 2015). A su vez según el éster que se le agrega, se incrementa la toxicidad (Romo de Vivar et al. 2007). El tipo de esterificación puede diferenciarse en 3 clases: monoésteres, diésteres no cíclicos y diésteres macrocíclicos (Hartmann & Witte 1995; Gottschalk et al. 2015). Los diésteres macrocíclicos son los ésteres más tóxicos, seguido por los diésteres no cíclicos moderadamente tóxicos y los monoésteres los menos tóxicos (Cheeke 1988). Para esta característica de toxicidad es necesario la desaturación de la posición 1,2 y la esterificación de por lo menos un grupo hidroxilo con un ácido néxico teniendo una cadena ramificada (Mattocks 1986; Crews et al. 2010).

La gran diversidad de estas estructuras químicas identificadas como AP corresponde a 660 aproximadamente, formados por unas pocas bases de necina y numerosos ácidos néxicos (Bull et al. 1968; Zhu et al. 2015). Como se mencionó, los AP son alcaloides de ésteres, esterificados con ácido néxico, que basándose en la taxonomía e implicancias biogenéticas se distinguen 5 clases principales, donde el tipo senecionina es la principal de la tribu *Senecioneae* (Hartmann 1999). Estos comprenden una clase de más de 190 estructuras dentro de la tribu *Senecioneae*, donde principalmente las especies asignadas son del género *Senecio* (Pelsner et al.

2005; Yang et al. 2011). A partir de la senecionina se generan la mayoría de los AP derivados, que se obtienen a través de transformaciones metabólicas simples, como intergerrimina, retrorsina, usaramina, erucifolina, senecifilina y jacobina (Yaber et al. 2009). En el Cuadro II se enumeran los principales alcaloides encontrados según especie de *Senecio* en la región, asociados a seneciosis en bovinos.

Cuadro II. Principales alcaloides pirrolizidínicos en especies de *Senecio* asociados a seneciosis en bovinos en la región.

Especie de <i>Senecio</i>	Alcaloide pirrolizidínico	País registrado	Referencia
<i>S. brasiliensis</i>	Retrorsina, intergerrimina	Brasil	Méndez et al. 1990
<i>S. selloi</i>	Retrorsina, senecionina	Brasil	Méndez et al. 1990
<i>S. madagascariensis</i>	Retrorsina, intergerrimina, senecionina	Uruguay	Arrospide et al. 2010
<i>S. oxyphyllus</i>	Retrorsina	Brasil	Liddell et al. 1992
<i>S. heterotrichus</i>	Retrorsina, intergerrimina	Brasil	Méndez et al. 1990
<i>S. grisebachii</i>	Seneciophylina, Senecionina, retrorsina	Uruguay	Preliasco et al. 2017
<i>S. cisplantus</i>	Retrorsina, senecionina	Brasil	Méndez et al. 1990
<i>S. leptolobus</i>	Neoserikikina, florosenina	Brasil	Méndez et al. 1990

Vía de biosíntesis

A partir de una estructura química que actúa como precursora, se produce la biosíntesis con diversificación de los AP mediante distintas reacciones resultando en un grupo complejo de estructuras relacionadas (Hartmann, 1985; Langel et al. 2011). Los AP ocurren en las plantas como base libre/AP terciarios y *N-óxidos* con diferente reactividad, solubilidad, etc., siendo ambas formas intercambiables y pudiendo ocurrir al mismo tiempo (Johnson et al. 1985; Boppre, 2011).

La biosíntesis de los *N-óxido* de los *Senecio* se da exclusivamente en las raíces siendo el órgano sintetizador (Hartmann & Toppel, 1987; Hartmann, 1989; Langel et al. 2011). El *N-óxido* senecionina fue identificado como el producto primario de biosíntesis de las especies de *Senecio*, siendo la columna vertebral de la mayoría de los AP (Hartmann & Toppel, 1987; Pelser et al. 2005). La translocación posterior desde las raíces hacia sitios de acumulación, en la partes aéreas, es vía floema donde son transformados en los tipos de AP específicos (Hartmann, 1989; Hartmann & Dierich, 1998; Langel et al. 2011). Un transportador específico cataliza

la traslocación de los AP *N-óxido* hacia vacuolas que son los sitios celulares de acumulación (Ehmke et al. 1988; Hartmann, 1989; Hartmann & Dierich, 1998). Estos AP efectivamente retenidos no sufren retorno o cambio metabólico y la transformación a los distintos tipos difiere entre las especies de *Senecio* (Ehmke et al. 1988; Hartmann, 1989; Hartmann & Dierich, 1998). Hay diferencias entre plantas en cuanto a perfil y concentración de alcaloides, como así dentro de la misma planta en los distintos órganos vegetales (Hartmann & Dierich 1998).

Toxicidad de los AP y mecanismo de acción

La toxicidad de los AP se descubrió por primera vez en episodios de mortandad en ganado (Willmot & Robertson, 1920), mucho antes que los compuestos químicos fuesen caracterizados y se conociera su mecanismo de acción (Bull et al. 1968). Estos alcaloides son considerados los fitoquímicos más nocivos en el contexto de la salud animal y pública (Prakash et al. 1999; Boppre, 2011). Los AP senecionina macrocíclicos son los más comunes en el género *Senecio* (Hartmann, 1995; Stegelmeier, 1999; Wiedenfeld & Edgar, 2011). Estos AP no son tóxicos por sí mismos en las plantas, sino que son pro-toxinas que requieren de bioactivación por enzimas microsomales (citocromo monooxigenasas P450), principalmente en hígado, para formar pirroles reactivos *in situ* (dehidroalcaloides pirrolizidínicos). Esto ocurre luego de la ingestión donde en rumen e intestino son reducidos a aminas terciarias y vía vena porta, son transportados al hígado, donde son bioactivados, generando metabolitos reactivos que actúan principalmente en este órgano (Prakash et al. 1999; Fu et al. 2004; Stegelmeier, 2011; Castells et al. 2014). De los pirroles tóxicos bioactivados, los ésteres pirroles son los considerados más hepatotóxicos por su alta reactividad, mientras que los pirroles alcohólicos de larga vida, producidos por la hidrólisis de los ésteres pirroles, son menos reactivos, pero tienen efecto antimitótico y son mutagénicos y carcinogénicos (Prakash et al. 1999). Los pirroles químicamente reactivos son agentes electrofílicos que reaccionan con sustancias celulares de carácter nucleofílico, principalmente formando aductos con ácidos nucleicos, aminoácidos y proteínas, resultando en daño citotóxico y antimitótico, con disfunción y necrosis celular. También se forman aductos de pirroles con proteínas que circulan por sangre y persisten meses a años, pudiendo reciclarse en el hígado y generar daño adicional (Mattocks, 1986; Stegelmeier, 2011; Burrow & Tyrl, 2013).

Toxicidad en bovinos

El efecto hepatotóxico de los AP por consumo de *Senecio* spp. asociado a mortandades en bovinos es bien conocido, caracterizándose por daño irreversible de los hepatocitos (Riet-Correa, 1993; Stegelmeier, 2011; Wiedenfeld, 2011). Las especies de *Senecio* son poco palatables, siendo consumidas bajo determinadas condiciones, principalmente en el período invernal, cuando la mayoría de las especies de *Senecio* están en brotación con alta concentración de AP y la disponibilidad de forraje está disminuida (Riet-Correa, 1993). Otra condición es la alta carga animal en potreros con alta infestación de la especie vegetal (Karam et al. 2011).

Los bovinos poseen susceptibilidad intermedia junto a los equinos, mientras los cerdos y aves son las especies más susceptibles, y los ovinos y caprinos los

menos susceptibles pudiendo consumir cantidades que serían tóxicos para bovinos, al adquirir resistencia (Stegelmeier, 2011; Cullen & Stalker, 2016).

Las categoría joven de animales es más susceptibles que los adultos, aunque estas últimas resultan afectadas con mayor frecuencia al permanecer por tiempo más prolongado en los establecimientos, consumiendo mayor cantidad de *Senecio* (Karam et al. 2004; Panziera et al. 2017). A su vez, los machos son más susceptibles que las hembras, asociado a mayor actividad de enzimas que activan los AP en el hígado (Karam et al. 2004). Otros factores como las situaciones estresantes con mayor demanda fisiológica como parición, transporte, entre otras, pueden desencadenar la intoxicación latente (Karam et al. 2011).

Hay 3 presentaciones clínico-patológicas comunes a la intoxicación por AP. La primera es una necrosis centrolobulillar a masiva aguda cuando se ingiere una gran cantidad de alcaloides en una dosis, la cual resulta infrecuente por su baja palatabilidad. La segunda, es la exposición repetitiva o en fases a los AP en dosis bajas (generalmente estacional), que lleva a atrofia hepática con formación de nódulos de regeneración. Esta es la forma más común en los bovinos a pastoreo, de carácter crónico, donde los hígados afectados muestran un patrón característico de poliploidía hepatocelular conocido como megalocitosis. Y la última es la exposición prolongada exclusivamente a plantas del género *Heliotropium* dando un hígado firme, fibrótico, atrófico, sin nódulos de regeneración (Cullen & Stalker, 2016).

Signos clínicos

Los signos de intoxicación crónica se presentan cuando los animales han ingerido una cantidad considerable de plantas (>5% del peso vivo) en un período de varias semanas (Stegelmeier, 2011). Los signos clínicos en bovinos son variables siendo el cuadro más característico la falta de apetito, deambulación, con o sin diarrea y pérdida progresiva de peso (Riet-Correa et al. 2009; Wiedenfeld, 2011). En fases terminales se caracteriza por encefalopatía hepática con signos neurológicos de apatía o hiperexcitabilidad, incoordinación y agresión (Wouters et al. 2013; Giaretta et al. 2014). Otros signos menos frecuentes son fotosensibilización e ictericia (Giaretta et al. 2014; Panziera et al. 2017).

Los animales intoxicados se caracterizan por niveles elevados séricos de aspartato amino-transferasa y gamma-glutamil transferasa (GGT), los cuales indican daño hepatocelular y colestásis o hiperplasia biliar, respectivamente (Bain, 2011). La determinación de GGT, es una enzima inducida, siendo el mejor parámetro por mantenerse elevado durante el transcurso de la enfermedad (Giaretta et al. 2014; Panziera et al. 2017).

Patología macroscópica

Macroscópicamente el hígado presenta patrones morfológicos variables dependiendo de la evolución y dosis ingerida, siempre encontrándose firme al tacto o corte del órgano (Riet-Correa et al. 2009; Grecco et al. 2010, Cullen & Stalker, 2016). En estadios terminales se caracteriza por fibrosis difusa y nódulos hiperplásicos en parénquima desde unos pocos a numerosos, con coloración y tamaño variable, provocando distorsión de la arquitectura normal del hígado (Grecco et al. 2010). La presencia de un reticulado fibroso puede ser desde sutil hasta un

patrón marmorizado (Grecco et al. 2010). También se puede volver atrófico ya que la pérdida de hepatocitos es más rápida que su reemplazo (Cullen & Stalker, 2016; Preliasco et al. 2017). La coloración varía con patrones desde amarillo, hasta verde y marrón, dependiendo de la variable eficiencia de drenaje biliar que presentan los lobulillos hepáticos afectados (Cullen & Stalker, 2016; Panziera et al. 2017). A su vez, la fibrosis hepática puede causar hipertensión portal con ascitis y severo edema de mesenterios (Cullen & Stalker 2016). Puede también ocurrir ictericia y fotosensibilización por excreción insuficiente (Riet-Correa 1993; Giaretta et al. 2014; Panziera et al. 2017). Otro hallazgo ocasional es el edema de la pared de la vesícula biliar, en algunos casos con múltiples nódulos de 2-3 mm en la mucosa (Riet-Correa et al. 1993; Riet-Correa et al. 2009).

Patología microscópica

Histológicamente las lesiones en hígado características de la intoxicación por AP son la presencia de megalocitosis, fibrosis difusa y proliferación de células de los conductos biliares (reacción ductal) (Grecco et al. 2010; Riet-Correa et al. 2009). La pérdida de hepatocitos se compensa por distintos grados de megalocitosis y regeneración de hepatocitos normales menos inhibidos que forman nódulos de regeneración (Riet-Correa et al. 2009; Cullen & Stalker, 2016). Al mismo tiempo ocurre la reacción ductal en las tríadas portales como respuesta al estímulo regenerativo cuando la masa hepática es inadecuada (Cullen & Stalker, 2016). La fibroplasia en el bovino es marcada, siendo que el tejido fibroso puede infiltrar a través de los sinusoides separando los hepatocitos en pequeños grupos o individualmente (Grecco et al. 2010; Cullen & Stalker, 2016). En algunos casos puede ocurrir el patrón de fibrosis “veno-oclusiva” más común en humanos, con fibrosis y obliteración de las vénulas hepáticas (Cullen & Stalker, 2016; Panziera et al. 2017). Se observan diferentes grados y patrones de degeneración y necrosis de hepatocitos (Riet-Correa et al. 2009). A nivel del sistema nervioso central hay degeneración esponjosa (*status spongiosus*) atribuida a edema intramielínico, caracterizada por vacuolización de la sustancia blanca en el borde con la unión de la sustancia gris, principalmente en capa subcortical de la sustancia blanca, cápsula interna y tálamo (Méndez et al. 1990; Riet-Correa et al. 2009; Wouters et al. 2013).

OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar las principales especies de *Senecio* involucradas en brotes de intoxicación en bovinos en la región Este del Uruguay entre el 2010 y 2016, estudiando su variabilidad genética y determinando los tipos y concentraciones de AP.

Objetivos específicos:

1. Recolectar e identificar las especies de *Senecio* spp. de predios con registro de seneciosis entre el 2010 y 2016 en la región Este de Uruguay.
2. Estudiar la variabilidad genética de las plantas de *Senecio* involucradas, utilizando polimorfismos amplificados relacionados con secuencias, mediante la técnica de PCR-SRAP.
3. Determinar tipos y concentraciones totales en mg/g en base seca mediante HPLC-MS de AP de plantas de *Senecio* spp. asociados a brotes en bovinos.
4. Comprobar experimentalmente la capacidad tóxica de las nuevas especies identificadas.

HIPÓTESIS

La mayor incidencia de intoxicación por *Senecio* spp. en bovinos en la región Este se debe a especies emergentes de *Senecio* spp. con mayor variabilidad genética, y diferentes tipos y concentraciones de AP.

ESTRATEGIAS DE LA INVESTIGACIÓN

El trabajo se desarrolló dentro del PDU “Patogenicidad, toxicidad y genética de plantas tóxicas en los sistemas pastoriles de la región Este del Uruguay” (CURE-UdelaR), que involucra varias entidades (DILAVE Regional Este, INIA, Facultad de Veterinaria y CURE-UdelaR) permitiendo el intercambio y la unificación de información. El estudio retrospectivo de los focos de intoxicación en bovinos asociados a consumo de *Senecio* spp. se realizó con la Base de Datos 33 del DILAVE Regional Este, identificando los predios de la región Este con brotes de Seneciosis en bovinos durante los últimos 5 años. Se visitaron los predios y recolectaron muestras de planta entera de *Senecio*. Se identificaron las especies recolectadas, y se registró su disposición espacial. Se acondicionaron y conservaron en forma adecuada para su estudio genético, químico y botánico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección y acondicionamiento de muestras de *Senecio* spp

Se visitaron 28 predios ganaderos de la región Este del Uruguay con diagnóstico de intoxicación por *Senecio* entre el 2010 y 2015, según registros de la Base de Datos 33, DILAVE Regional Este. Todos los focos tenían confirmación histopatológica de la intoxicación. Las visitas se realizaron durante los meses de octubre a diciembre de 2015 y 2016. Para la recolección de planta entera, se utilizó la técnica descrita por Verschave et al. (2015), modificada de Taylor (1939), con el fin de que las muestras fueran representativas de los predios en cuestión. En cada predio

se caminó a lo largo de dos transrectas en forma de “W” a través de la zona con presencia de *Senecio* spp. (Figura 8). Cada 10 pasos, se recolectaron 4 plantas de cada especie vegetal identificada como *Senecio*, de alrededor del operador, tomadas desde 5 cm (un puño) sobre el nivel del suelo. La distribución espacial de las distintas especies de *Senecio* se clasificaron como al azar, uniforme, y agregada o contagiosa, siguiendo los criterios de Larson et al. (2001) Las muestras se identificaron y acondicionaron en bolsas individuales para su identificación y análisis químico.

Para el análisis genético, de cada predio visitado se guardaron en bolsas selladas con sílica gel, 3 fragmentos de hojas verdes de 3 plantas de cada especie de *Senecio* spp. recolectada. Las muestras se liofilizaron en tubos Eppendorf individuales hasta la realización de los análisis correspondientes.

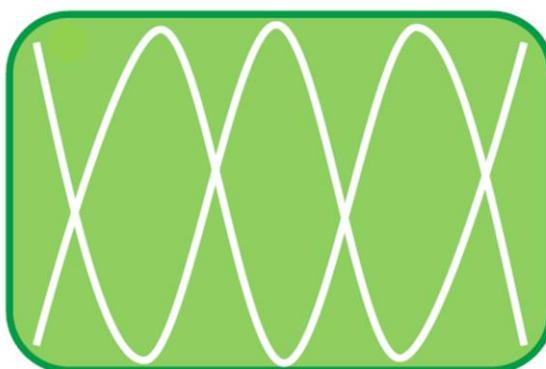


Figura 8. Método de muestreo de los potreros infestados caminando dos transrectas en forma de “W”. Adaptado de Verschave et al. (2015).

En 4 de los predios visitados se realizó además el examen *post-mortem* de un bovino con signos clínicos de seneciosis. Todas las muestras, incluyendo sistema nervioso central, se fijaron en formol bufferado al 4% y se procesaron de rutina para el estudio histológico mediante cortes de secciones de órganos de 5 μ m y coloreados con Hematoxilina de Mayer y Eosina (H&E).

Identificación botánica

Para la identificación botánica, las muestras de planta entera se secaron durante 72 horas a temperatura ambiente en estación estival, prensadas entre papel diario. La identificación se realizó en la cátedra de Botánica de la Facultad de Agronomía, a cargo del Ing. Agr. Mauricio Bonifacino, donde se integraron las muestras al herbario MVFA, con la siguiente identificación del voucher por especie: MVFA Garcia 1 (*S. brasiliensis*), MVFA Garcia 2 (*S. oxyphyllus*), MVFA Garcia 3 (*S. madagascariensis*) y MVFA Garcia 4 (*S. selloi*).

Análisis de perfil químico

Para el análisis químico, las muestras de planta entera se secaron a temperatura ambiente durante 72 horas, y luego en estufa a 60°C por 24 horas, y se molieron hasta consistencia de polvo con una criba de 1mm en el laboratorio de Pasturas de INIA Treinta y Tres. De las muestras se pesaron 15 gr y se dispusieron

en tubos Falcon de 50 mL para su envío al Laboratorio de Investigación de Plantas Tóxicas de ARS-USDA (Utah, Estados Unidos) donde se realizó la determinación de AP mediante la técnica de GC-MS y HPLC-MS, a cargo del Dr. Dale Gardner. La extracción de AP, análisis cualitativo por GC-MS y HPLC-MS e identificación de los alcaloides se realizó según la técnica descrita por Gardner et al. (2006).

Análisis estadístico

Los datos de los alcaloides fueron comparados para diferencias inter- e intra-especies, y para diferencias inter-especies entre años mediante análisis de varianza (ANOVA). Se llevó a cabo el Test de Tukey-Kramer para determinar diferencias entre las medias de los contenidos de AP inter- e intra-especies. Se aceptó en el análisis como diferencia significativa un $p < 0.05$. Para los análisis se utilizó el programa SAS 9.3 (2005).

Evaluación de la variación genética

Para el análisis de marcadores moleculares, se realizó extracción de ADN con el método CTAB (Vanijajiva, 2012)/DNeasy Plant (Qiagen, 2004) y estudio molecular mediante polimorfismos amplificados relacionados con secuencia (Sequense Related Amplified Polymorphism, SRAP). Esta es una técnica de marcadores moleculares basados en PCR (Li y Quiros, 2001). Se ensayaron un total de 12 pares de *primers*: F02R01, F02R02, F02R03, F02R07, F02R08, F02R10, F02R12, F02R13, F03R01, F03R02, F03R03, F03R07 (**Cuadro III**), sintetizados por Alpha DNA (Montreal, Quebec, Canada). Los *primers forward* fueron marcados en el extremo 5' con fluorocromos. Se analizaron tres plantas por triplicado (tres hojas por planta) de cada especie de *Senecio* spp. estudiada, con el fin de identificar los pares de primers con mayor número de bandas consistentes entre repeticiones. Los *primers* que presentaron mayor consistencia fueron: F02R10 y F02R12. Estos se utilizaron para el análisis total de las poblaciones recolectadas.

Cuadro III. SRAP primers utilizados en el presente estudio

Forward primer*	Secuencia (5'-3')	Reverse primer	Secuencia (5'-3')
F02	TGAGTCCAAACCGGAGC	R01	GACTGCGTACGAATTAAT
F03	TGAGTCCAAACCGGAAT	R02	GACTGCGTACGAATTTGC
		R03	GACTGCGTACGAATTGAC
		R07	GACTGCGTACGAATTCAA
		R08	GACTGCGTACGAATTCAC
		R10	GACTGCGTACGAATTCAT
		R12	GACTGCGTACGAATTGTT
		R13	GACTGCGTACGAATTCTG

* *marcado con fluoróforo*

Las técnicas se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de INIA Las Brujas e INIA Treinta y Tres.

Extracción de ADN

Método CTAB: cada hoja (0,2 gr) fue molida en mortero al cual se le vertía nitrógeno líquido (-180°C) para facilitar la disolución y colocaba en un tubo de

1,5mL. El protocolo es en base a 6 muestras. Se agregó 700 µL de buffer de extracción (4,8 µL β-mercaptoetanol a 4,2 mL de CTAB 1,5%) por tubo y se incubaba a 65°C por 20 min. El homogeneizado se mezcló con 700 µL de cloroformo:isoamílico (4mL de cloroformo con 200 µL de alcohol isoamílico) mediante suave inversión. Luego de centrifugar a 12.000 rpm por 15 min, se transfería la fase acuosa (aprox. 500 µL) a un nuevo tubo de 1,5 mL. El ADN se precipitaba luego del agregado de 2/3 del volumen de isopropanol puro frío, con mezcla cuidadosa. Los tubos se incubaron en heladera (4°C) por 30 min para mejorar precipitación. Se centrifugó a 5.000 rpm por 20 min, descartando el sobrenadante. Se lavó el pellet con 500 µL de etanol 70%. Se centrifugó a 5.000 rpm por 5 min y volviendo a descartar el sobrenadante. Luego se repitió el lavado, centrifugado y descarte de sobrenadante. Se dejó secar el etanol a temperatura ambiente “*overnight*”. Finalmente, se resuspendió el pellet en 100 µL de agua desionizada (MilliQ) estéril.

Método DNeasy Plant Mini Kit: cada hoja (0,2gr) fue molida mediante un equipo automático (Geno/Grinder SPEX SamplePrep 2010) a 1000rpm por 1 min, realizándose 2 veces. A la muestra molida se le agregó 400 µL Buffer AP1 y 4 µL RNase A. Se agitó mediante vortex e incubó por 10 min a 65°C, invirtiendo los tubos 2 a 3 veces en ese período. Se le agregaron 130 µL Buffer P3, y se mezcló para luego incubarse por 5 min entre hielo. Se centrifugaron las muestras por 5 min a 14000 rpm y se extrajo el material lisado hacia las columnas QIAshredder dentro de un tubo de colección de 2ml. Se repitió el centrifugado por 2 min a 14000 rpm y transfirió el fluido a un nuevo tubo sin tocar el pellet presente. Se le agregó 1,5 del volumen de Buffer AW1 a cada muestra, y mezcló. Del mismo se transfirieron 650 µL de la mezcla a una columna DNeasy mini dentro de un tubo de colección de 2 mL y se centrifugó a 8000 rpm por 1 min. Se descartó el fluido y repitió el último procedimiento con el remanente de las muestras. La columna se colocó en un nuevo tubo de 2 mL y se le agregó 500 µL de Buffer AW2, con posterior centrifugado a 8000 rpm por 1 min. Se descartó el fluido y se le volvió a agregar 500 µL de Buffer AW2. Luego se centrifugó por 2 min a 14000 rpm y transfirió la columna a un nuevo tubo de microcentrifuga de 2 ml, agregándose 100 µL de Buffer AE para eluir. Después se incubó 5 min a temperatura ambiente (15 a 25°C) y se centrifugó por 1 min a 8000 rpm. Se agregó nuevamente 100 µL de Buffer AE, incubó 5 min a temperatura ambiente y centrifugó por 1 min a 8000 rpm.

Estudio molecular por SRAP

El PCR se realizó con los siguientes pares de primers: F02R10 y F02R12. El mix para las reacciones de PCR (25 µL volumen total) consistía de buffer de reacción (10x), ADN templado (25 ng), mezcla de dNTPs (10mM), MgCl₂ (25mM), Taq polymerase (1 unidad) y los pares de *primers* (0,5 mM de cada uno). Las condiciones de amplificación para SRAP fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 3 min, y 5 ciclos que consistían de 1 min de desnaturalización a 94°C, 1 min de annealing a 35°C, y 1 min de extensión a 72°C. En los siguientes 35 ciclos, la temperatura de annealing se aumentó a 50°C, y una extensión final a 72°C por 5 min, usándose un termociclador estándar para 96 pocillos (BIOER, Hangzhou, China).

Los productos de amplificación SRAP se remitieron a la Universidad de Yale para análisis de tamaño de fragmentos en electroforesis capilar. Los resultados del

análisis de fragmentos se formatearon mediante Peak Scanner Software 2.0 (Applied Biosystems, 2012) para su posterior estudio.

Análisis estadístico

Las bandas generadas en la reacción de SRAP con los primers F02R10 y F02R12 fueron codificadas en “1” como presencia de la banda y “0” como ausencia. Los análisis estadísticos se efectuaron con el software estadístico RStudio (R version 3.4.0). Se estudió la asociación entre los marcadores SRAP y la especie y el predio de donde se recolectaron las muestras mediante regresión logística usando el paquete MASS version 7.3-47 (Venables & Ripley, 2002). Los marcadores SRAP consistieron en bandas individuales y en combinaciones de dos o tres bandas. Los marcadores asociados a especie y predio con un P valor < 0.001 fueron seleccionados para los análisis posteriores. Se estudiaron las relaciones genótípicas entre las plantas mediante un análisis de componentes principales (ACP) (Rohlf, 2000). También se construyó un dendrograma en base a las distancias genéticas determinadas por los marcadores de SRAP seleccionados. Las distancias geográficas entre los puntos muestreados se calcularon a partir de las coordenadas de GPS utilizando el paquete SpatialTools. Se calculó la correlación entre matrices de distancias genéticas y distancias geográficas utilizando el paquete APE 4.1, y se obtuvo su significación estadística mediante el test de Mantel (1967). Se realizó un análisis molecular de varianza (AMOVA) para evaluar la distribución de la variación genética inter- e intra-especies mediante el paquete PEGAS 0.1 (Wright, 1965; Excoffier et al. 1992).

Intoxicación experimental con *Senecio oxyphyllus*

Para confirmar por primera vez en Uruguay la toxicidad de *Senecio oxyphyllus*, se realizó un estudio experimental en mayo de 2017 en las instalaciones del DILAVE Regional Este “Miguel C. Rubino”, Treinta y Tres.

Se utilizaron 2 terneros, raza Holando de entre 100 y 150 kg de 4 a 6 meses de edad clínicamente sanos. Un animal fue el control y el otro el animal tratado. Se utilizó en el animal tratado una dosis alta de administración de *Senecio oxyphyllus*, de 4 g de MS por kg/PV por día.

Al día 24 se realizó la eutanasia del animal *in extremis*, de acuerdo con las recomendaciones de la CHEA (Protocolo: Ceuafvet-455) mediante tiopentona intravenosa como anestésico y posteriormente exsanguinados para posterior estudio patológico macro y microscópico. Las muestras de hígado se procesaron por inmunohistoquímica (IHQ), para identificación de células epiteliales de origen ductal mediante anticuerpo anti-citoqueratina 19 según la técnica descrita por Jain et al. (2010) en el Laboratorio de Patología Especial Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Para el mismo se utilizó un kit comercial de DAKO en una dilución 1:100 del anticuerpo monoclonal ratón anti-CK19, clone BA017 (Denmark), con el fin de confirmar proliferación ductal.

RESULTADOS

Principales especies de *Senecio* identificadas

Se recolectaron un total de 50 poblaciones de *Senecio* de 28 predios ganaderos. Las especies identificadas fueron: *S. oxyphyllus* DC, *S. madagascariensis* Poir, *S. brasiliensis* (Spreng.) Less., y *S. selloi* DC. (Cuadro IV).

Cuadro IV. Especies de <i>Senecio</i> de poblaciones identificadas en 28 predios de departamentos del Este de Uruguay durante 2015 y 2016.					
	Predio	Especie identificada	Año		
Departamento	(n)		2015	2016	Total
Cerro Largo	16	<i>S. oxyphyllus</i>	8	8	16
		<i>S. selloi</i>	4	5	9
		<i>S. madagascariensis</i>	2	3	5
		<i>S. brasiliensis</i>	1	4	5
Treinta y Tres	10	<i>S. madagascariensis</i>	4	2	6
		<i>S. oxyphyllus</i>	1	4	5
		<i>S. selloi</i>	1	-	1
		<i>S. brasiliensis</i>	-	1	1
Tacuarembó	2	<i>S. oxyphyllus</i>	-	2	2
Totales	28		21	29	50

Se detallan las características morfológicas para la clasificación de cada una de las especies identificadas:

S. oxyphyllus DC: hierba anual, bianual o perenne, endémica de América del Sur, 50 cm de alto, cortamente glanduloso pubescentes; tallos erectos, ramificados en la base, densamente hojosos en la parte inferior y laxamente en la superior. Hojas alternas, sésiles, las inferiores oblanceoladas, de 6-10 cm × 4-10 mm, largamente atenuadas en pseudopecíolo, agudas en el ápice, aserradas y algo revolutas en el margen, lanuginosas o glabrescentes en la cara superior y densamente griseo-tomentosas en la inferior; hojas superiores linear-lanceoladas, auriculadas en la base, largamente atenuadas en el ápice, aserradas y notablemente revolutas en el margen, gradualmente menores. Capítulos radiados, numerosos, dispuestos en cimas corimbiformes laxas; pedúnculos glanduloso-pubescentes de 1,5-5 cm de largo. Flores dimorfas. Aquenios cilíndricos, costados, glabros. Pappus blanco (Figura 9) (Freire et al. 2015).

S. madagascariensis Poir: plantas perennes, nativa de Madagascar y Sudáfrica, altura de 30 a 60 cm, glabra, erecta, tallos muy ramosos, copiosamente hojosos. Hojas alargadas verde brillantes oblanceoladas, de 4-8 cm × 3-12 mm, largamente atenuadas en la base, agudas en el ápice, con bordes irregulares dentados y revolutas en el margen. Capítulos radiados, numerosos, en extremos de las ramas,

dispuestos en inflorescencias corimbosas laxas, largamente pedunculados, con flores amarillas. Involucro acampanado, con brácteas lineales, ciliadas en el ápice. Flores dimorfas. Aquenios cilíndricos, cortamente papiloso-pubescentes, 2 mm de largo, brevísimamente pilosos. Papus blanco 3 mm de largo (Figura 10) (Freire et al. 2015).

Senecio brasiliensis Lessing: plantas perennes, endémica de América del Sur, altura hasta 1,5 m, tallos erguidos y ramosos, especialmente arriba, glabros, densamente hojosos, de base leñosa. Hojas alternas, sésiles, pinnatisectas, aserradas, glabras o levemente pubescentes solo en el envés. con raquis linear de 8-14 cm × 1-2 mm y 2-4 pares de segmentos lanceolados, de 3-6 cm × 1,5-5 mm, de margen aserrado, glabros en el haz y albo-tomentosos en el envés o laxamente tomentosos o casi glabros en ambas caras. Como particularidad el extremo final de las ramas termina tripartita, presentando tres hojas con forma de “tridente”. Capítulos radiados, muy numerosos, pedunculados, dispuestos en cimas corimbos amplios muy densos. Involucro cilíndrico-acampanado, con brácteas lineales, glabras. Flores dimorfas. Aquenios cilíndricos, 3 mm de largo, densamente pubescentes. Papus blanco 7 mm de largo (Figura 11) (Freire et al. 2015).

S. selloi DC.: subarbusto o mata arbustiva, bianual a perenne, endémica de América del Sur, ramosa, altura de 40 a 100 cm, densamente pubescente-glandulosos, hojosos hasta la inflorescencia. Hojas oblanceolado-espátuladas, anchas, verde claro, obtusas en el ápice, aserrado-dentadas en el margen, densamente glanduloso-pubescentes en ambas caras (“carnosas y pegajosas”). Flores amarillas dispuestas en capítulos radiados grandes, largamente pedunculados, dispuestos en inflorescencias corimbosas laxas. Involucro acampanado, brácteas pubescentes. Flores dimorfas. Aquenios glabros. Papus blanco 11 mm de largo (Figura 12) (Freire et al. 2015).



Figura 9. *Senecio oxyphyllus*, Treinta y Tres, seccional policial 6^a



Figura 10. *Senecio madagascariensis*, Cerro Largo, seccional policial 7^a.



Figura 11. *Senecio brasiliensis*, Cerro Largo, seccional policial 4^a.



Figura 12. *Senecio selloi*, Cerro Largo, seccional policial 14^a.

Se identificaron distintos patrones de distribución espacial según especies de *Senecio*. El *S. oxyphyllus* tenía una distribución agregada y al azar ya que se observaba la presencia de agrupamientos densos en las distintas partes del potrero y que coalescían abarcando a veces grandes espacios. *S. madagascariensis* presentaba una distribución al azar, ocupando cualquier punto en el espacio de forma generalizada, con una disposición no uniforme de plantas individuales. *S. brasiliensis* presentaba una distribución agregada donde había proximidad de los individuos con agrupamientos densos en patrones focales extensos. *S. selloi* presentaba una disposición al azar, pero de muy baja densidad donde se observaban pocas plantas individuales dispersas en el espacio (Figura 13-15).



Figura 13. *S. oxyphyllus*, distribución multifocal coalescente extensa.



Figura 14. *S. madagascariensis*, distribución multifocal individual extensa.



Figura 15. *S. brasiliensis*, agrupamiento focal denso de las plantas.

La especie más identificada resultó *S. oxyphyllus* (46%, 23/50), seguida por *S. madagascariensis* (22%, 11/50), *S. selloi* (20%, 10/50) y *S. brasiliensis* (12%, 6/50).

Al considerar los predios (n=28), la ocurrencia relativa de las especies de *Senecio* fue: *S. oxyphyllus* (82%, 23/28), *S. madagascariensis* (39%, 11/28), *S. selloi* (36%, 10/28) y *S. brasiliensis* (21%, 6/28). En 17 predios (60%), se identificó infestación por más de una especie de *Senecio*. Cinco predios (29.5%) tuvieron una infestación mixta incluyendo tres especies, y los restantes 12 predios (70.5%) presentaron una infestación mixta de dos especies. Se identificó *S. oxyphyllus* en los 17 predios.

Alcaloides pirrolizidínicos en plantas de *Senecio*

Los principales alcaloides identificados por HPLC-MS para cada especie fueron: retrorsina en *S. oxyphyllus*; retrorsina, usaramina, senecivernina/senecionina en *S. selloi*; retrorsina, senecivernina/senecionina, integerrimina, usaramina en *S. madagascariensis*; e integerrimina, retrorsina y senecionina en *S. brasiliensis*. Los alcaloides ocurrían principalmente como *N*-óxidos en la planta, pero fueron convertidos a base libre durante el proceso de extracción para simplificar los análisis. Los perfiles del HPLC-MS para los AP de las cuatro especies de *Senecio* mencionadas se muestran en la Figura 16. La identificación de los alcaloides fue confirmada por comparación de estándares disponibles y también ayudado por análisis de GC-MS.

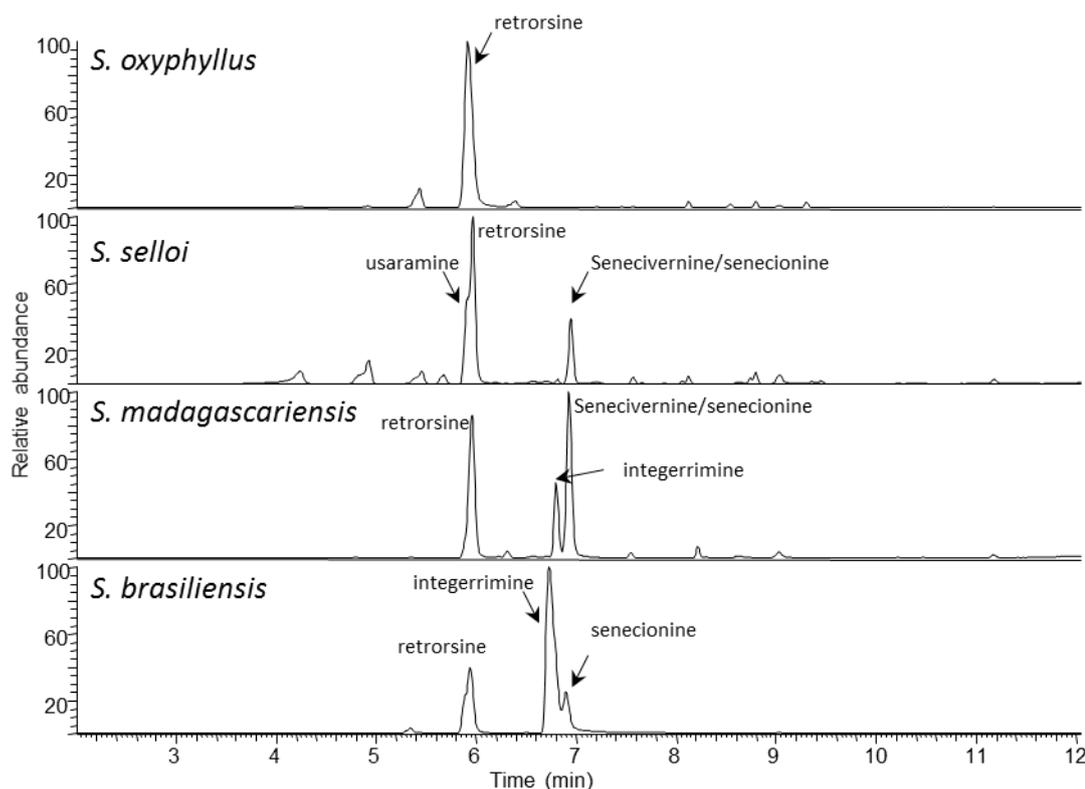


Figura 16. Cromatograma del HPLC-MS de una muestra representativa de cada una de las cuatro especies de *Senecio* recolectadas de predios del Este de Uruguay.

La concentración total media de alcaloides fue más alta en *S. brasiliensis* (17.6 mg/g) seguida por *S. oxyphyllus* (6.2 mg/g), *S. selloi* (1.8 mg/g), mientras *S. madagascariensis* resultó con la más baja concentración (0.6 mg/g) (Cuadro V). La concentración de alcaloides resultó más elevada en 2015 que en 2016 (Cuadro VI).

Cuadro V. Media, desviación estándar (DE) y rango de amplitud (valor mínimo y máximo) de la concentración total de alcaloides pirrolizidínicos, expresados en mg/g MS en cuatro especies de *Senecio*.

Especies	Media± DE (mg/g)	Rango (mg/g)	n
<i>S. brasiliensis</i>	17.6 ^a ± 7.8	11.2 – 32.3	6
<i>S. madagascariensis</i>	0.6 ^c ± 0.2	0.20 – 0.80	11
<i>S. oxyphyllus</i>	6.2 ^b ± 3.9	2.2 – 15.0	23
<i>S. selloi</i>	1.8 ^c ± 1.3	0.6 – 4.6	10

Diferentes letras corresponden a diferencia significativa (p <= 0.05) en concentración de AP entre especies de Senecio.

Cuadro VI. Media y desviación estándar (DE) de la concentración total de alcaloides pirrolizidínicos, expresado en mg/g MS, entre 2015 y 2016 en las cuatro especies de *Senecio*.

Especies	2015	2016
	Media ± DE	Media ± DE
<i>S. brasiliensis</i>	32.3 (n=1)	14.7 ± 3.3
<i>S. madagascariensis</i>	0.5 ^a ± 0.2	0.7 ^a ± 0.04
<i>S. oxyphyllus</i>	10.5 ^b ± 2.6	3.5 ^c ± 1.2
<i>S. selloi</i>	2.7 ^d ± 1.2	0.9 ^e ± 0.2

Diferentes letras corresponden a diferencia significativa (p <= 0.05) en concentración de AP entre especies de Senecio entre años.

Estudio molecular y evaluación de la variación genética

Se encontraron 489 marcadores, consistentes en combinaciones de dos y tres bandas de SRAP, asociados a especie y potrero ($P < 0.001$), los cuales se utilizaron para los siguientes análisis. En el ACP de los marcadores moleculares los primeros dos componentes principales (PC1 y PC2) explicaron el 43,9 % de la varianza total. El PC1 explica el 37% de la variación genética, y el PC2 explica el 6,9% de la variación genética. El PC1 separó dos grupos, uno homogéneo sin variación en el PC2, y el otro heterogéneo distribuido a lo largo del PC2. No se encontró correspondencia entre estos grupos y las especies determinadas botánicamente, encontrándose individuos de las cuatro especies identificadas indistintamente en los grupos de APC (Figura 17). En el dendrograma (Figura 18) se observa la diversidad genética de las poblaciones donde a una distancia de 40 se identifican tres grupos, sin observarse concordancia entre grupos y especies (Cuadro VII). El AMOVA mostró que los marcadores moleculares no permiten agrupar significativamente a individuos de la misma población, de la misma especie, ni del mismo departamento ($p < 0,05$). La mayor variación genética fue debida a variación entre poblaciones (48,4%), seguida por variación entre especies (28.7%), y entre departamentos (22,9%) (Cuadro VIII).

No se observó correlación entre las matrices de distancia genética y geográfica (Mantel- $P=0.541$). En base a la proporción de polimorfismo y de riqueza de combinaciones de bandas se observó la mayor variación genética en *S. madagascariensis*, seguido de *S. oxyphyllus*, *S. brasiliensis* y por último *S. selloi* (Cuadro IX).

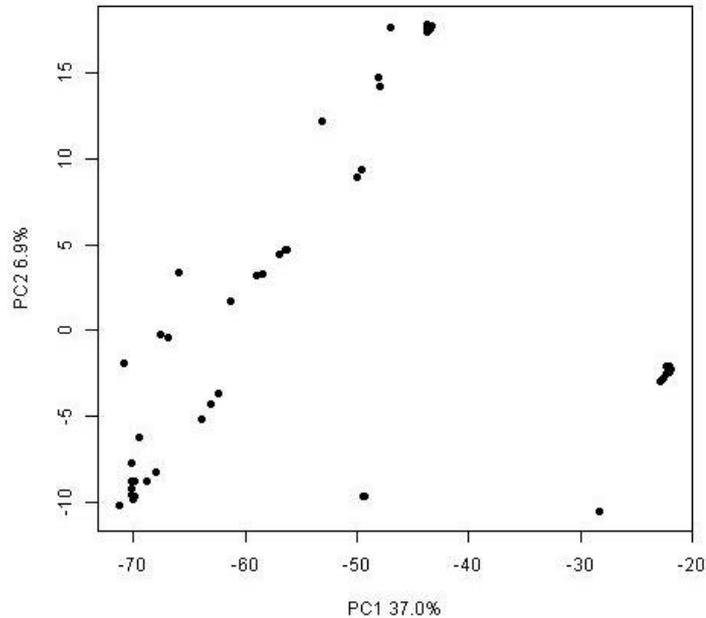


Figura 17. Gráfica bidimensional del análisis de componentes principales de los 489 marcadores moleculares, mostrando la dispersión de los 150 individuos de especies de *Senecio* (50 poblaciones) en los dos primeros componentes principales (PC1 y PC2).

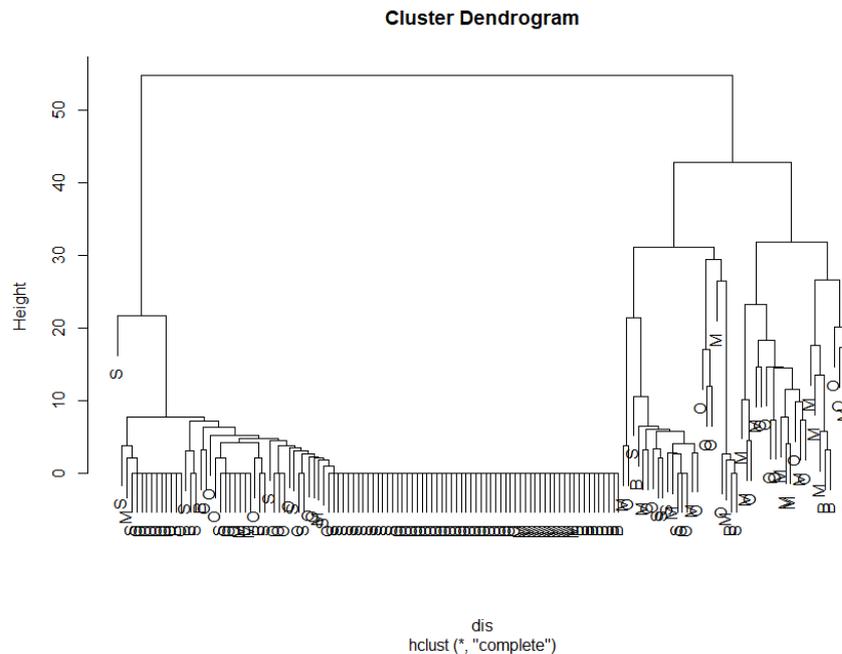


Figura 18. Dendrograma a partir de 489 marcadores moleculares de los 150 individuos. A una distancia de 40, se observan tres grupos. Las letras indican la especie determinada botánicamente: S = *S. selloi*; M = *S. madagascariensis*; O: *S. oxyphyllus*, B: *S. brasiliensis*.

Cuadro VII. Análisis de concordancia entre grupo del dendrograma (altura= 40) basado en marcadores moleculares y la especie determinada botánicamente.

Especie	B	M	O	S
Grupo				
1	2	11	10	0
2	14	16	49	24
3	2	6	10	6

Cuadro VIII. Análisis de varianza molecular (AMOVA) mostrando la varianza genética basada en marcadores moleculares SRAP entre poblaciones, entre especies y entre departamentos. El test de significancia se basó en 1000 permutaciones.

Fuentes de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Varianza estimada	Porcentaje de variación	<i>P</i>
Entre poblaciones	23	118.02468	10.8	48.4	0.1389
Entre especies	2	12.83643	6.4	28.7	0.5275
Entre departamentos	1	10.79222	5.1	22.9	0.2448

Cuadro IX. Media y mediana del contenido de polimorfismo (CP), y porcentaje de riqueza de bandas (*Porc.*) en cada especie de *Senecio* a partir de los 489 marcadores moleculares.

Especie	Media CP	Mediana CP	<i>Porc.</i> (%)
<i>S. madagascariensis</i>	0.94	0.19	24
<i>S. oxyphyllus</i>	0.38	0.05	15
<i>S. brasiliensis</i>	0.37	0.24	11
<i>S. selloi</i>	0.24	0.14	10

Análisis *post-mortem* de Seneciosis en bovinos de predios visitados

Los datos de los animales necropsiados durante las visitas se muestran en el Cuadro X.

Cuadro X. Identificación de los 4 predios en los que se llevó a cabo examen *post-mortem* durante la recolección de especies vegetales de bovinos con seneciosis.

N° ficha DILAVE	Departamento	Seccional	Categoría animal	Especie Vegetal identificada
15645	Treinta y Tres	5	Nov. 2-3 años	<i>S. oxyphyllus</i> y <i>S. madagascariensis</i>
16257	Tacuarembó	15	Vaq 1-2 años	<i>S. oxyphyllus</i>
16310	Cerro Largo	11	Nov 1-2 años	<i>S. oxyphyllus</i> y <i>S. selloi</i>
16360	Cerro Largo	5	Vaq 1-2 años	<i>S. oxyphyllus</i> , <i>S. brasiliensis</i> y <i>S. madagascariensis</i>

Los animales presentaban desmejoramiento, diarrea intermitente, tenesmo, depresión o agresividad marcada, y muerte al cabo de 5 a 7 días. Una vaquillona (Ficha 16360) sobrevivió durante 10 meses con signos de desmejoramiento progresivo y diarrea intermitente antes de la necropsia (Figura 19).



Figura 19. Vaquillona Hereford. Note estado corporal bajo y cola y miembros posteriores “manchados” con materia fecal indicando diarrea.

Al examen *post-mortem* se observó en todos los casos el hígado de consistencia firme, bordes redondeados, grados variables de coloración, y un reticulado fibroso marcado en la superficie de corte del parénquima (Figura 20). Había ascitis, edema severo de mesenterios y presencia de nódulos serosos multifocales en vesícula biliar con pared edematosa (Figura 21). Los hallazgos se confirmaron mediante patología microscópica observando las lesiones características de intoxicación por alcaloides pirrolizidínicos: hepatomegalocitosis, fibrosis difusa invasiva y reacción ductal marcada (Figura 22).



Figura 20. Vaquillona 1-2 años. Hígado, reticulado fibroso difuso en parénquima.



Figura 21. Vaquillona 1-2 años. Cavity abdominal, severo edema de mesenterio (izq.). Vesícula biliar, múltiples quistes serosos en mucosa y edema marcado (der.)

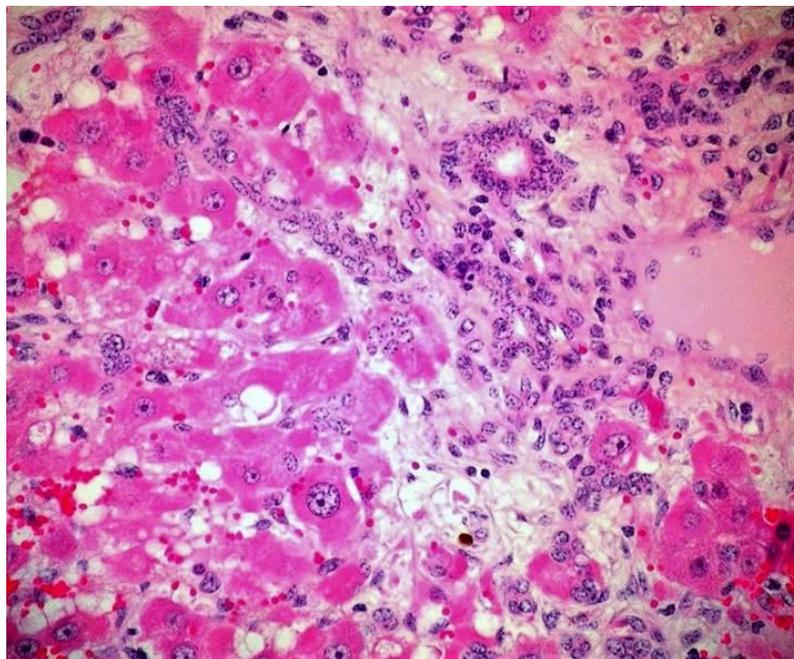


Figura 22. Vaquillona 1-2 años. Hígado con lesiones características de intoxicación por alcaloides pirrolizidínicos: fibrosis difusa invasiva, megalocitosis y proliferación de ductos biliares.

Intoxicación experimental con *Senecio oxyphyllus* en bovinos

El animal tratado presentó decaimiento y adelgazamiento progresivo con distensión abdominal a partir de los 8 días del tratamiento. Al día 24 se procedió a la eutanasia debido al estado *in extremis*. A la necropsia el animal presentaba ascitis, edema de mesenterio e hígado de consistencia moderadamente firme y superficie capsular blanquecina. Al corte, en el parénquima se observaba discreto reticulado blanco. Microscópicamente, se observó megalocitosis, leve fibrosis invasiva principalmente periportal y peri centrolobulillar, y reacción ductal moderada con células epiteliales ductales formando nidos múltiples con distribución aleatoria. La IHQ presentó inmunomarcación positiva con anti-CK 19 de los nidos de células de

distribución aleatoria confirmando su origen ductal, lo que corresponde a presencia de reacción ductal (Figura 23). La concentración de alcaloides pirrolizidínicos en el *S. oxyphyllus* utilizado fue de 2,6 mg/g, siendo el principal alcaloide identificado retrorsina.

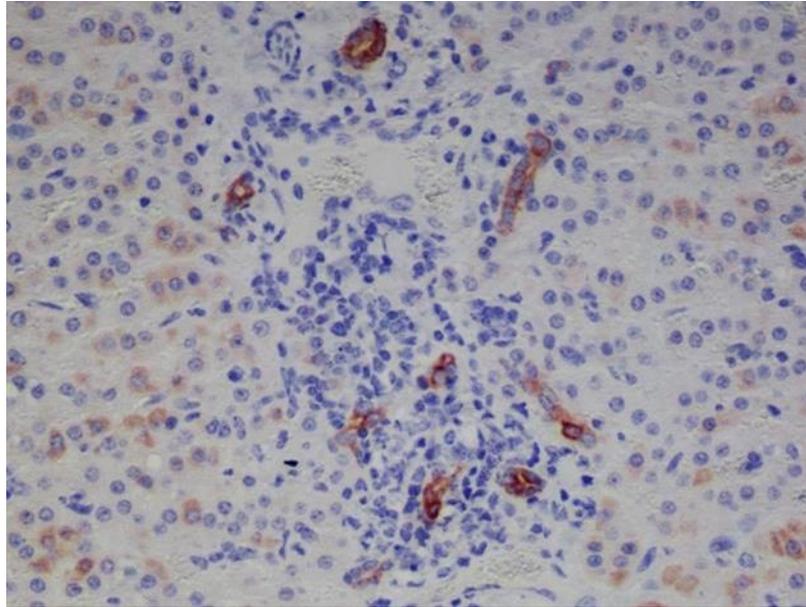


Figura 23. Ternera, hígado. Inmunomarcación intensa de células epiteliales formando múltiples nidos, confirmando reacción ductal. 20x. IHQ (anti-citoqueratina 19, dilución 1:100), cromógeno diaminobencidina, contracoloración de hematoxilina.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio sugieren que la epidemia activa de seneciosis bovina que ocurre desde el año 2007 en la región Este de Uruguay, se debe a la invasión y expansión de poblaciones de *Senecio* spp con mayor capacidad tóxica y que podrían tener mayor capacidad competitiva, reproductiva y de dispersión por sobre las especies nativas deseables. Las seccionales policiales del departamento de Cerro Largo donde ocurre la enfermedad, es una de las zonas con mayor riqueza vegetal del país, caracterizada por un alto porcentaje de pastizales naturales (Brazeiro et al. 2012; Bresciano et al. 2014) y suelos con bajos niveles de fósforo y pH (Bermudez & Ayala, 2008; Brazeiro et al. 2012). Esto favorece la emergencia y expansión de las especies de *Senecio* (Karam et al. 2011). A su vez, disturbios del ecosistema mediados por el hombre como la expansión agrícola registrada en la región problema en los últimos años dejó suelos descubiertos de cobertura vegetal quedando susceptible a invasiones (Brazeiro et al. 2012) también favorecen. Otros factores pueden haber sido el menor stock ovino, la intensificación con sobrepastoreo de la cría bovina constatada en la zona epidémica, y los cambios climáticos llevando a un aumento en el riesgo de invasión y expansión de las especies vegetales.

Hasta el momento, las especies de *Senecio* de Uruguay asociados a brotes de seneciosis eran: *S. grisebachii*, *S. selloi*, *S. brasiliensis*, *S. heterotrichus* y *S. madagascariensis* (Marzocca, 1992; Villalba & Fernández, 2000; Dutra et al. 2011; Preliasco et al. 2017), con la particularidad que esta última especie no había sido aún reconocida en el Este. En el presente estudio se registró la presencia de *S. madagascariensis* y *S. oxyphyllus* como nuevas especies de importancia creciente en la región, además de *S. brasiliensis* y *S. selloi*, especies ya reconocidas anteriormente (Dutra et al. 2010).

La presencia de estas dos especies de *Senecio*, nuevas en la región Este, podrían haber desplazado al *S. selloi*, el cual era la principal causa de intoxicación en la región (Dutra et al. 2010). La reciente aparición de *S. oxyphyllus* y *S. madagascariensis* en los predios estudiados demuestra la capacidad adaptativa de las plantas de *Senecio* y su fácil dispersión hacia áreas geográficas nuevas (Carvalho et al. 2013; Le Roux et al. 2006). La presencia de *S. madagascariensis* también fue registrada como un evento reciente en Rio Grande del Sur (Stigger et al. 2014). En nuestra investigación, *S. oxyphyllus* resultó la especie dominante en todos los predios con infestaciones mixtas, registrada desde hace años en Rio Grande del Sur (Driemeier & Barros, 1992; Karam et al. 2004), lo que sugiere su posible expansión desde el país vecino, ya que no estaba identificada como causante de intoxicación previamente en el Este de Uruguay. Esto explicaría el desplazamiento Norte-Sur de los clústeres en las seccionales policiales limítrofes con Brasil, ya sea por traslado de semillas contaminadas con semillas de *Senecio*, pasaje de animales diseminadores mediante materia fecal, diseminación por viento, alta capacidad reproductiva, o por la alta capacidad invasiva de la especie asociada a un proceso pre-adaptativo (Beskow, 1995; Monty & Mahy, 2009; Wiedenfeld, 2011; Sindel & Coleman, 2012; Karam et al. 2013).

La mayor presencia de *S. oxyphyllus* en los predios visitados, y la alta concentración en AP sugiere que ésta es actualmente la principal responsable de la actual epidemia de intoxicación por *Senecio* en bovinos en la región Este.

Los casos naturales y la intoxicación experimental permiten confirmar la toxicidad de *S. oxyphyllus*, y demuestra que la epidemia de seneciosis se mantiene activa.

Alcaloides pirrolizidínicos

Las grandes variaciones en la concentración de los AP de *Senecio* spp. están asociadas a su estructura genética y a varios factores ambientales como condiciones de estrés, sequías, condiciones del suelo, altas temperaturas e interacción con herbívoros (Kirk et al. 2010; Johnson et al. 1985; Tokarnia et al. 2000; Karam et al. 2004). Del presente estudio, *S. brasiliensis* mostró la mayor concentración total de AP, seguido por *S. oxyphyllus*, mientras no hubo diferencias entre *S. madagascariensis* y *S. selloi* con baja toxicidad. Las concentraciones de alcaloides determinadas fueron consistentes con la de otros reportes previos en distintas especies de *Senecio*. La concentración de AP en *S. madagascariensis* varió entre plantas individuales con rangos de 0.22 a 1.99 mg/g MS para muestras recolectadas en Hawaii (Gardner et al. 2006) y de 0.50 a 4.0 mg/g MS para muestras de Brasil (Stigger et al. 2014). Karam et al. (2004) también reportó variaciones en la concentración total de AP para *S. brasiliensis* (1.7 a 2.5 mg/g MS), *S. oxyphyllus* (0.25 a 1.96 mg/g MS) y *S. selloi* (0.08 a 0.21 mg/g MS). Otros trabajos observaron concentraciones similares de *S. oxyphyllus* (4.0 mg/g DW) (Liddell et al. 1992) y *S. selloi* (1.0 mg/g MS) (Méndez et al. 1990). La alta variación en la concentración de AP está bien documentada, y se ha atribuido a etapas de crecimiento de la planta, estación del año como así también a condiciones ambientales (Karam et al. 2004; Grecco et al. 2010; Langel, 2011; Castells et al. 2014). La alta toxicidad de *S. brasiliensis* acuerda con estudios de Brasil resultando la más tóxica (Karam et al. 2004). Respecto a *S. oxyphyllus* donde se observó alto potencial tóxico, difiere con los estudios de Brasil que la consideran con niveles de toxicidad drásticamente menores (Karam et al. 2004; Karam et al. 2011).

Una diferencia significativa en la concentración de AP intra-especies entre años, sugiere fuertemente un factor ambiental común de estrés para la población vegetal. Así, durante la primera mitad del año 2015, la precipitación acumulada fue menor a la del 2016, siendo 339 mm y 912 mm respectivamente (datos del sitio Portal Grass INIA). Este escenario de sequía pudo ser un factor influyente en el aumento de la concentración de AP para las plantas del 2015 (Karam et al. 2004; Grecco et al. 2010). Otros factores como baja disponibilidad de nutrientes (Hol, 2011) o la interacción con enemigos naturales (Hol et al. 2004), pueden también haber afectado las concentraciones inter-anales. Sin embargo, las muestras en este estudio fueron recolectadas de predios de áreas geográficas y sistemas de producción de cría similares, no debiendo influir en la diferencia inter anual. Otra alternativa, menos probable, es la mayor concentración de AP que ocurre en la etapa expansiva de la planta (Doorduyn & Vrieling, 2011) considerando que la introducción de *S. oxyphyllus* en la región Este de Uruguay ocurrió en años recientes.

La comparación de los AP en los *Senecio* del presente trabajo con otros previamente reportados, mostraron esencialmente los mismos alcaloides. En muestras de *S. oxyphyllus* de Brasil el principal alcaloide resultó retrorsina (Liddell et al. 1992), mientras en *S. brasiliensis* fueron intergerrimina y retrorsina (Méndez et al. 1990; Trigo et al. 2003), todos consistentes con los principales alcaloides identificados en el presente trabajo con el agregado de senecionina en *S. brasiliensis*. Previamente en *S. selloi* los 2 principales alcaloides identificados fueron senecionina y retrorsina (Méndez et al. 1990), al igual que nuestro trabajo como así también senecivernina y usaramina. En la comparación con muestras de *S. madagascariensis* de las islas de Hawaii y Australia (Gardner et al. 2006) se reportaron los alcaloides retrorsina, intergerrimina, usaramina y senecivernina al igual que nuestro trabajo. Sin embargo, los autores reportan una mayor concentración de alcaloides de base otonecina (doronina, florosenina, desacetyldoronina) que las muestras recolectadas de Uruguay donde solo se detectaron pequeñas trazas.

Variación genética

No hubo asociación entre grupos determinados por marcadores moleculares y especies. Los marcadores moleculares mostraron sin embargo alta variación genética, correspondiendo la mayor proporción de la variación genética a la variación entre poblaciones, a diferencia de otros autores que observaron baja variación entre poblaciones (Abbott et al. 2007; Lacmuth et al. 2010; Le Roux et al. 2010). Esto se podría corresponder a un proceso de la alta variación genética con pérdida de heterogeneidad, debido al alto flujo génico o hibridación inter-específica (Lambrinos, 2004; Richardson & Pysek, 2006). La similitud en los rangos genéticos entre especies, podría deberse a un fenómeno de hibridación entre especies de *Senecio* (Abbott, 1992; Ellstrand & Schierenbeck, 2000). La hibridación interespecífica es un proceso evolutivo conocido en *Senecio* (Abbott & Lowe, 2004; Kirk et al. 2004; Kirk et al. 2010; Pelsner et al. 2012) que beneficia la capacidad invasora/expansiva, resultando en gran dispersión geográfica, como se observó en las especies en el presente estudio (Mooney & Cleland, 2001; Lambrinos, 2004; Pelsner et al. 2012). Esto se pudo ver favorecido por el incremento de los procesos mediados por humanos como forestación y cultivos agrícolas, ocurridos a partir del 2010 (Ellstrand & Schierenbeck, 2000; Lambrinos, 2004; Brazeiro et al. 2012) o por la característica poliploide de algunas de las especies (Lee, 2002; Abbott et al. 2004; Pelsner et al. 2012). A su vez la observación de variación morfológica de las hojas para una misma especie se puede ver asociada a hibridación o a una alta plasticidad fenotípica (Le Roux et al. 2006; Pelsner et al. 2010). Es necesario continuar el estudio mediante otras pruebas moleculares o utilización de distintas combinaciones de *primers* que permitan confirmar con mayor certidumbre si este posible proceso de alta hibridación entre especies ocurre.

De las especies identificadas, *S. oxyphyllus* y *S. madagascariensis* presentaron altos niveles de polimorfismo y de riqueza alélica, asociado a alta variación genética vinculada posiblemente con la aptitud para invadir o expandirse y establecerse en nuevos rangos geográficos (Fernández y Verona 1984; Le Roux 2006; Le Roux 2010; Pelsner et al. 2012). Esto que concuerda con lo observado, donde estas dos especies presentaron mayor presencia en predios y mayor dispersión espacial en los lotes problemas. La alta variación en *S. madagascariensis* está bien documentada (Radford et al. 2000; Le Roux et al. 2006; Le Roux et al. 2010), a diferencia de *S.*

oxyphyllus donde hasta la fecha no había información al respecto. Por otro lado, en *S. selloi* se observó una baja variación genética que se corresponde con una menor capacidad adaptativa y competitiva (Mooney & Cleland, 2001; Lee, 2002; Richardson & Pysek, 2006; Huang et al. 2014), llevando a menor supervivencia con reducción en número y reemplazo por otras especies de *Senecio*, como *S. madagascariensis* y *S. oxyphyllus*.

Un factor que podría haber tenido un rol importante en la adaptación del género, particularmente de *S. oxyphyllus*, es el de las múltiples introducciones por dispersión de semilla por viento, por animales o alimento de animales -mediado por el hombre- actuando como vectores de dispersión (Sindel et al. 1998) o intercambio agrícola contaminado con semillas importadas (Gardner et al. 2006; Wilson et al. 2009; Le Roux et al. 2010). Esto podría haber llevado a la introducción y expansión de distintos focos actuando como nuevas fuentes de dispersión difusa, resultando en un incremento en la variación genética de las plantas invasoras y facilitando así su adaptación (Ellstrand & Schierenbeck, 2000; Bossdorf et al. 2005; Le Roux et al. 2010), generando mayor variación genética entre poblaciones. Este proceso también lleva a la formación de híbridos (Ellstrand & Schierenbeck, 2000; Lambrinos, 2004). La múltiple introducción de *S. oxyphyllus* muy probablemente provenga desde Rio Grande del Sur, con posible invasión de los departamentos vecinos a la frontera con Brasil (Driemeier & Barros, 1992), lo que explicaría el descenso Noreste-Sureste de los clústeres de seneciosis identificados en la zona (ver Figura 6).

La similitud climática con la región sur de Brasil, permitió posiblemente una adaptación más rápida de la especie en el noreste de Uruguay, mediante el proceso de pre-adaptación (Monty & Mahy, 2009; Lacmuth et al. 2010). Esto posiblemente permitió una rápida adaptación y expansión sin necesidad de una fase de latencia extensa, a diferencia de especies de *Senecio* de rangos geográficos no preadaptados que tardaron 80 años para diseminarse (Bossdorf et al. 2008).

La falta de correlación entre las distancias genética y geográfica concuerda con la regla general de que no hay correlación entre poblaciones locales de especies (Fahima et al. 1999; Haldimann et al. 2003; Le Roux et al. 2010). La falta de asociación entre distancia geográfica y genética se puede presentar por falta de heterogeneidad ambiental al no existir barrera física o altos niveles de flujo génico (Linhart & Grant, 1996; Haldimann et al. 2003). Los seccionales problemas de Cerro Largo se encuentran sobre lomadas y serranías de hasta 380m de altitud correspondiente a la Cuenca Sedimentaria del Este, y las de Treinta y Tres se encuentran sobre lomadas correspondientes a la región Colinas y Lomadas del Este (Brazeiro et al. 2012). A pesar de existir una separación por zona de serranías, estas no superan los 500m, no creando una barrera física para el flujo génico ni heterogeneidad ambiental (Brazeiro et al. 2012).

Las especies de *Senecio* identificadas no presentaron diferencia en los tipos de alcaloides entre poblaciones, y a su vez todas las especies compartían los derivados de senecionina resultando en diversidad AP específica (Witte et al. 1992; Vrieling et al. 1993; Hartman & Dierich, 1998; Macel et al. 2004). Las diferencias de tipos de alcaloides presentadas entre especies y los cambios de concentración de AP pueden asociarse tanto a factores bióticos o abióticos estresantes que supongan cambios

ambientales, como a tipos de AP especie-específicos regulados en parte por una base genética (Macel et al. 2004; Boppre, 2011; Hol et al. 2011).

Los mayores niveles de concentración de AP en *S. oxyphyllus* respecto a otros autores (Liddell et al.1992; Karam et al. 2004) puede ser a que la especie se encontrara en fase expansiva en el nuevo rango geográfico (Kirk et al. 2004; Caño et al. 2009; Castells et al. 2014).

CONCLUSIÓN

Los resultados del presente trabajo permiten concluir que hay un aumento en el riesgo de intoxicación para los bovinos de pastoreo asociado a una mayor densidad de infestación con especies de *Senecio*, y emergencia de especies con alto potencial tóxico.

Las especies *S. oxyphyllus* y *S. madagascariensis* no estaban previamente reconocidas como plantas tóxicas por productores y veterinarios en la región Este de Uruguay. Estas dos especies se encontraban en alta densidad y con mayor presencia en los predios estudiados que demás especies, actuando como plantas invasoras siendo de mayor potencial de riesgo para el ganado, y también causando pérdida del valor de las tierras y alteración de la comunidad vegetal nativa deseable con pérdida de biodiversidad.

Particularmente, la observación de un alto porcentaje de predios con *S. oxyphyllus*, la alta densidad que presentó, la rápida dinámica de expansión y la relativa alta toxicidad, sugiere que sea la principal especie involucrada en los reportes de seneciosis registrados durante el período 2010 a 2016. Su reciente identificación sugiere que su aparición es un evento contemporáneo.

Los procesos de hibridación, y principalmente la múltiple introducción y pre-adaptación, junto al mantenimiento de una alta diversidad genética durante la invasión probablemente contribuyeron al éxito de invasión y expansión, con supervivencia a largo plazo.

Los casos espontáneos de intoxicación demuestran que la epidemia se encuentra aún activa, como así también la intoxicación experimental confirma la toxicidad de *S. oxyphyllus*. Este aumento de plantas de *Senecio* con carácter invasivo y expansivo enfatiza la necesidad de implementar medidas de manejo y de control biológico y químico que minimicen las pérdidas del ganado y permitan la eliminación de las plantas.

Referencias bibliográficas

1. Abbott RJ. (1992). Plant invasions, interspecific hybridization and the evolution of new plant taxa. *TREE* 7:12.
2. Abbott RJ, Lowe A. (2004). Origins, establishment and evolution of new polyploid species: *Senecio cambrensis* and *S. eboracensis* in the British Isles. *Biol. J. Linn. Soc.*, 82, 467–74.
3. Andersson S, Shaw RG. (1994). Phenotypic plasticity in *Crepis tectorum* (Asteraceae): genetic correlations across light regimens. *Heredity* 72:113–125.
4. Anderson E, Stebbins GL (1954) Hybridization as an evolutionary stimulus. *Evolution* 8, 378–388
5. Ashton P, Abbott RJ. (1992). Multiple origins and genetic diversity in the newly arisen allopolyploid species, *Seneclo cambrensis* rosser (compositae). *Heredity* 68:25—32.
6. Bain PJ. (2011). Liver. En: Duncan & Prasse's (2011). *Veterinary laboratory medicine: clinical pathology*. 5ed, Latimer, cap. 7, pp.211-231.
7. Baker HG (1974). The evolution of weeds. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst*, 5:1–24.
8. Barrett SCH. (1982). Genetic variation in weeds. En: *Biological control of weeds with plant pathogens*. Ed. Charudattan R, Lynn Walker H, John Wiley, New York, cap. 6, pp.73–98.
9. Barrett SCH, Husband BC. (1990). The genetics of plant migration and colonization. En: Brown AHD (1990) *Plant population genetics, breeding, and genetic resources*. Eds. Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS. Sinauer, Sunderland, pp.254–278.
10. Bennington CC, Mcgraw JB. (1995). Natural selection and ecotypic differentiation in *Impatiens pallida*. *Ecol. Monogr.*, 65, pp.303-323.
11. Berenbaum MR, Zangerl AR (1992). Genetics of secondary metabolism and herbivore resistance in plants. En: Rosenthal y Berenbaum (1992) *Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites*. Eds. Rosenthal A y Berenbaum MR, 2nd ed, vol 2. Academic Press, San Diego, pp.415-438.
12. Berenbaum MR, Zangerl AR. (1996) Phytochemical diversity: adaptation or random variation?. En: *Phytochemical Diversity and Redundancy in Ecological Interactions*. Ed Romeo JT, Saunders IA, Barbosa P. Plenum Press; p.1-24.
13. 29. Degenhardt J, Gershenzon J, Baldwin IT, Kessler A: Attracting Beskow W. (1995) A study of the factors influencing the emergence and establishment of ragwort (*Senecio jacobaea* L.) seedlings in pasture. Tesis de Maestría, Universidad de Massey, Nueva Zelanda.
14. Bermudez R, Ayala W. (2008). Seminario de actualización técnica: Fertilización fosfatada de pasturas en la región Este. INIA, Serie técnica n°172.
15. Black-Samuelsson S, Andersson S. (1997) Reaction norm variation between and within populations of two rare plant species, *Vicia pisiformis* and *V. dumetorum* (Fabaceae). *Heredity* 79, pp.268-276.
16. Blossey B, Nötzold R. (1995) Evolution of increased competitive ability in invasive non-indigenous plants: a hypothesis. *J ecol* 83, pp.887–889.
17. Boppre M. (2011). The ecological context of pyrrolizidine alkaloids in food, feed and forage: an overview. *Food Addit Contam*, 28(3), pp.260–281.

18. Borstel KV, Witte L, Hartmann T. (1989). Pyrrolizidine alkaloid patterns in populations of *Senecio vulgaris*, *S. vernalis* and their hybrids. *Phytochemistry* 28, pp.1635–1638.
19. Bossdorf O, Auge H, Lafuma L, Rogers WE, Siemann E, Prati D. (2005) Phenotypic and genetic differentiation between native and introduced plant populations. *Oecologia* 144, pp.1–11.
20. Bossdorf O, Lipowsky A, Prati D. (2008) Selection of preadapted populations allowed *Senecio inaequidens* to invade Central Europe. *Divers. Distrib.*, 14, pp.676–685.
21. Bradley BA, Oppenheimer M, Wilcove DS. (2009). Climate change and plant invasions: restoration opportunities ahead?. *Global change biology*, 15(6), pp.1365–1614
22. Bradlet BA, Blumenthal DM, Wilcove DS, Ziska LH. (2010). Predicting plant invasions in an era of global change. *Trends in Ecology and Evolution*, 25(5), pp.310-318.
23. Brazeiro A, Panario D, Soutullo A. (2012). Clasificación y delimitación de las Eco-regiones de Uruguay. *Convenio MGAP/PPR – Sociedad Zoológica del Uruguay*, p.41.
24. Budak HRC, Shearman I, Parmaksiz RE, Gaussoin TP, Riosdan D. (2004) Molecular characterization of buffalograss germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers. *Theor appl genet* 108, pp.328-334.
25. Bull LN, Culvenor CCJ, Dick AT. (1968) The pyrrolizidine alkaloids: their chemistry, pathogenicity and other biological properties. En: Ed Bull LN (1968) *Frontiers of Biology*. North Holland Publ.; Amsterdam.
26. Burrow GE, Tyrl RJ (2013). *Asteracea martinov*. En: Burrow (2013) *Toxic plants of north america*. Eds. John Wiley & Sons inc, 2nd ed., pp.203-214.
27. Caño L, Escarré J, Fleck I, Blanco-Moreno JM, Sans FX. (2008) Increased fitness and plasticity of an invasive species in its introduced range: a study using *senecio pterophorus*. *J. Ecol.*, 96, pp.468–476.
28. Caño L, Escarré J, Vrieling K, Sans FX. (2009) Palatability to a generalist herbivore, defence and growth of invasive and native senecio species: testing the evolution of increased competitive ability hypothesis. *Oecologia*, 159, pp.95–106.
29. Carvalho S, Macel M, Schlerf M, Moghaddam FE, Mulder PPJ, Skidmore AK, van der Putten WH. (2013) Changes in plant defense chemistry (pyrrolizidinealkaloids) revealed through high-resolution spectroscopy. *ISPRS*, 80, pp.51–60.
30. Castells E, Mulder PPJ, Trujillo MP. (2014) Diversity of pyrrolizidine alkaloids in native and invasive *Senecio pterophorus* (asteraceae): implications for toxicity. *Phytochemistry*, 108, pp.137–146.
31. Cheeke PR. (1988) Toxicity and metabolism of pyrrolizidine alkaloids. *J anim sci*, 66, pp.2343-2350.
32. Coombs E, Clark J, Piper G, Cofrancesco AE. (2004) *biological control of invasive plants in the United States*. Oregon state university press, Corvallis.
33. Craig AM, Blythe LL, Lassen ED, Slizeski ML. (1986) Resistance of sheep to pyrrolizidine alkaloids. *Isr J Vet Med*, 4, PP.376–384.
34. Crews C, Berthiller F, Krska R. (2010). Update on analytical methods for toxic pyrrolizidine alkaloids. *Anal bioanal chem*, 396, pp.327–338.

35. Cullen JM, Stalker MJ. (2007) Liver and biliary system. En: Maxie MG (2007), ed. Jubb, Kennedy and Palmer's pathology of domestic animals. 6th ed. Missouri, Elsevier, pp.336–338.
36. D'Antonio CM, Vitousek PM (1992). Biological invasions by exotic grasses, the grass/fire cycle, and global change. *Annu Rev Ecol System*, 23, pp.63–87.
37. Doorduyn LJ, Vrieling K. (2011) A review of the phytochemical support for the shifting defence hypothesis. *Phytochem. Rev.*, 10, pp.99–106.
38. Driemeier D, Barros CSL. (1992) Intoxicación experimental por *Senecio oxyphyllus* en bovinos. *Pesq. Bras. Vet.*, 12 (1/2), pp.33-42.
39. Durka W, Bossdorf O, Prati D, Auge H. (2005) Molecular evidence for multiple introductions of garlic mustard (*Alliaria petiolata*, Brassicaceae) to North America. *Mol Ecol*, 14, pp.1697–1706.
40. Dutra F, Romero A, Quinteros C. (2010) Archivos Veterinarios del Este. Publicación del DILAVE Regional Este-MGAP, año 2, boletín núm. 2.
41. 4. Dutra F, Romero A, Quinteros C, García J. (2015) Archivos Veterinarios del Este. Publicación del DILAVE Regional Este-MGAP, boletín núm. 18.
42. 5. Dutra F, Romero A, Quinteros C, García J. (2016) Archivos Veterinarios del Este. Publicación del DILAVE Regional Este-MGAP, boletín núm. 19.
43. Ehmke A, Von Borstel K, Hartmann T. (1988) Alkaloid *N*-oxides as transport and vacuolar storage compounds of pyrrolizidine alkaloids in *Senecio vulgaris*. *Planta*, 176, pp.83–90.
44. Ellstrand NC, Elam DR. (1993) Population genetic consequences of small population-size – implications for plant conservation. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst*, 24, pp.217–242.
45. Ellstrand NC, Schierenbeck KA. (2000) Hybridization as a stimulus for the evolution of invasiveness in plants?. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, pp.7043–7050.
46. Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131, pp.479–491
47. Fahima T, Sun GL, Beharav A, Krugman T, Beiles A, Nevo E. (1999) Rapid polymorphism of wild emmer wheat populations, *Triticum dicoccoides*, in israel. *Theor. Appl. Genet.*, 98, pp.434–447.
48. Fernández ON, Verona CA. (1984) Características reproductivas de *Senecio madagascariensis* Poiret (*Compositae*). *Rev. Facultad de Agronomía*, 5(3), pp.125-137.
49. Fisher RA. (1930) The genetical theory of natural selection. Clarendon Press, Oxford, 272 p.
50. Freire SE, Ariza Espinar L, Salomón L, Hernández MP. 2015. Tribu Senecioneae Cass. En: Freire SE, Flora Vasculare de la república Argentina. Instituto de Botánica Darwiniano, 1° ed., v. 7(2), p.27-220. JSTOR, www.jstor.org/stable/j.ctt19dzdnt.
51. Frost CJ, Meschner MC, Carlson JE, De Moraes CM. (2008) Plant defense priming against herbivores: getting ready for a different battle. *Plant physiol*, 146, pp.818–824.
52. Fu PP, Xia QW, Lin G, Chou MW. (2004). Pyrrolizidine alkaloids – genotoxicity, metabolism enzymes, metabolic activation, and mechanisms. *Drug metab. Rev.* 36, pp.1–55.
53. Furnier GR.(2004) Métodos para medir variación genética en las plantas. En: Vargas H (2004) Manejo de recursos genéticos forestales. Eds. Vargas H., J.

- Jesús, Basilio Bermejo V. y F. Thomas Ledig, 2da ed. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México y Comisión Nacional Forestal, Zapopan, Jalisco, p.21-30.
54. García JÁ; Romero A, Quinteros C, Dutra F. (2016) Análisis retrospectivo de intoxicaciones asociadas a plantas tóxicas, micotoxinas y otros compuestos en bovinos de la región este de Uruguay (1994-2015). XLIV Jornadas Uruguayas de Buiatría 2016, 9-10 Junio, Paysandú, Uruguay.
 55. García P, Vences FJ, Pérez M, Allard RW. (1989) Allelic and genotypic composition of ancestral Spanish and colonial Californian gene pools of *Avena barbata*: evolutionary implications. *Genetics*, 122, pp.687–694.
 56. Gardner DR, Thorne MS, Molyneux RJ, Pfister JA, Seawright AA. (2006) Pyrrolizidine alkaloids in *Senecio madagascariensis* from Australia and Hawaii and assessment of possible livestock poisoning. *Biochem Syst Ecol*, 34, pp.736–744.
 57. Giaretta PR, Panzier W, Galiza GJA, Brum JS, Bianchi RM, Hammerschmitt ME, Bazzi T, Barros CSL. (2014) Seneciosis in cattle associated with photosensitization. *Pesq. Vet. Bras.*, 34(5), pp.427-432.
 58. Grecco FB, Schild AL, Soares MP, Pereira CM, Silva PE, Sallis ESV. (2010) Aspectos epidemiológicos e padrões de lesões hepáticas em 35 surtos de intoxicação por *Senecio* spp. em bovinos no sul do Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.*, 30(5), pp.389-397.
 59. Gottschalk C, Ronczkaa S, Preiweigerta A, Ostertag J, Klaffkea H, Schaffta H, Lahrssen-wiederholt M. (2015) Pyrrolizidine alkaloids in natural and experimental grass silages and implications for feed safety. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 207, pp.253–261.
 60. Gulsen O, Sever S, Mutlu N, Tuna M, Karaguzel O, Shearman RC, Riordan TP, Heng-moss TM. (2009) Polyploidy creates higher diversity among *Cynodon* accessions as assessed by molecular markers. *Theor Appl Genet.*, 118, pp.1309-1319.
 61. Haldimann P, Steinger T, Schärer HM. (2003) Low genetic differentiation among seasonal cohorts in *Senecio vulgaris* as revealed by amplified fragment length polymorphism analysis. *Mol. Ecol*, 12, pp.2541–2551.
 62. Hartmann T, Toppel G. (1987) Senecionine N-oxide, the primary product of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis in root cultures of *Senecio vulgaris*. *Phytochemistry*, 26, pp.1639–1643.
 63. Hartmann T, Ehmke A, Eilert U, Borstel KV, Teuring C. (1989) Sites of synthesis, translocation and accumulation of pyrrolizidine alkaloid N-oxides in *Senecio vulgaris*. *Planta*, 177, pp.98–107.
 64. Hartmann T, Witte L. (1995) Chemistry, biology and chemoeology of pyrrolizidine alkaloids. En: Pelletier SW (ed) *Alkaloids: chemical and biological perspectives*, Oxford (UK): Pergamon, 9, pp.155–233.
 65. Hartmann T, Dierich B. (1998) Chemical diversity and variation of pyrrolizidine alkaloids of the senecionine type: biological need or coincidence?. *Planta*, 206, pp.443-451.
 66. Hartmann T. 1999. Chemical ecology of pyrrolizidine alkaloids. *Planta* 207, pp.483–495.
 67. Hartmann T, Ober D. (2000). Biosynthesis and metabolism of pyrrolizidine alkaloids in plants and specialized insect herbivores. Springer-verlag, Berlin, pp.207–243.

68. Hartmann T, Kutchan TM, Strack D. (2005) Evolution of metabolic diversity. *Phytochemistry*, 66, pp.1198–1199.
69. Hódar JA, Zamora R, Cayuela L. (2012). Cambio climático y plagas: algo más que el clima. *Ecosistemas*, 21(3), pp.73-78
70. Hol WHG, Macel M, van Veen JA, van der Meijden E. (2004) Root damage and aboveground herbivory change concentration and composition of pyrrolizidine alkaloids of *Senecio jacobaea*. *Basic Appl Ecol.*, 5, pp.253–260.
71. Hol WHG. (2011) The effect of nutrients on pyrrolizidine alkaloids in *senecio* plants and their interactions with herbivores and pathogens. *Phytochem Rev.*, 10, pp.119–126.
72. Holm L, Doll J, Holm E, Pancho J, Herberger J. (1997) World weeds: natural histories and distribution. John Wiley & Sons, New York, p.1129.
73. Huang LK, Jiang XY, Huang QT, Xiao YF, Chen ZH, Zhang XQ, Miao JM, Yan HD. (2014) Genetic diversity and relationships in cultivars of *lolium multiflorum* lam. using sequence-related amplified polymorphism markers. *Genet Mol Res.*, 13(4), pp.10142-10149.
74. Jain R, Fischer S, Serra S, Chetty R. (2010) The Use of Cytokeratin 19 (CK19) Immunohistochemistry in Lesions of the Pancreas, Gastrointestinal Tract, and Liver. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 18(1).
75. Jeanmonod D. (2002) Nouvelles stations pour le *Senecio inaequidens* dc. Ou la conquête irrésistible du sénecion du cap. *Saussurea*, 32, pp.43–50.
76. Johnson AE, Molyneux RJ, Merrill GB. (1985) Chemistry of toxic range plants: variation in pyrrolizidine alkaloid content of *senecio*, *amsinckia*, and *crotalaria* species. *J agric food chem.*, 33, pp.50–55.
77. Karakas O, Gurel F, Uncuoglu AA. (2011) Assessment of genetic diversity of wheat genotypes by resistance gene analog-est markers. *Genet. Mol. Res.*, 10, pp.1098-1110.
78. Karam FSC; Soares MP, Haraguchi M, Riet-correa F, Méndez MC, Jarenkow JA. (2004) Aspectos epidemiológicos da seneciose na região sul do rio grande do sul. *Pesq. Vet. Bras.* 24(4), pp.191-198.
79. Karam FSC, Schild AL, Mello JRB. (2011) Intoxicação por *Senecio* spp. em bovinos no Rio Grande do Sul: condições ambientais favoráveis e medidas de controle. *Pesq. Vet. Bras.*, 31(7), pp.603-609.
80. Karam FSC, Moraes JCF, Schild AL. (2013) Controle de *Senecio* spp. com pastoreio ovino de acordo com sua infestação e fenología. *Pesq. Vet. Bras.*, 33(9), pp.1109-1115.
81. Kirk H, Vrieling K, van der Meijden E, Klinkhammer PLG. (2010) Species by environment interactions affect pyrrolizidine alkaloid expression in *Senecio jacobaea*, *Senecio aquaticus*, and their hybrids. *J Chem Ecol.* 36, pp.378–387
82. Lacmuth S, Durka W, Schurr F. (2010) The making of a rapid plant invader: genetic diversity and differentiation in the native and invaded range of *senecio inaequidens*. *Molecular ecology*, 19, pp.3952–3967.
83. Lambrinos JG. (2004) How interactions between ecology and evolution influence contemporary invasion dynamics. *Ecology*, 85(8), pp.2061–2070.
84. Langel D, Ober D, Pelsler PB. (2011) The evolution of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis and diversity in the senecioneae. *Phytochem. Rev.*, 10, pp.3–74.
85. Lavergne S, Molofsky J. (2007) Increased genetic variation and evolutionary potential drive the success of an invasive grass. *PNAS*, 104(10), pp.3883–3888.

86. Lee CE. (2002) Evolutionary genetics of invasive species. *Trends Ecol Evol* 17, pp.386–391.
87. Le Roux JJ, Wieczorek AM, Ramadan MM, Tran CT. (2006) Resolving the native provenance of invasive fireweed (*Senecio madagascariensis* poir.) in the Hawaiian islands as inferred from phylogenetic analysis. *Divers. Distrib.* 12, pp.694–702.
88. Le Roux JJ, Wieczorek AM, Tran CT, Vorsino A. (2010) Disentangling the dynamics of invasive fireweed (*Senecio madagascariensis* poir. species complex) in the Hawaiian islands. *Biological invasions*, 12, pp.2251–2264.
89. Levine JM, Adler PB, Yelenik SG. (2004) A meta-analysis of biotic resistance to exotic plant invasions. *Ecol. Lett.*, 7, pp.975-989.
90. Li G, Quiros CF. (2001) Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in brassica. *Theor. Appl. Genet.*, 103, pp.455-461.
91. Li G, Mcvetty PBE, Quiros CF. (2013) SRAP molecular marker technology in plant science. En: *Plant breeding from laboratories to fields*. License Intech, open access article, 2, pp.23-43.
92. Liddell JR; Stermitz FR, Barros CLS. (1992) Pyrrolizidine alkaloids from *senecio oxyphyllus*, a brazilian poisonous plant. *Biochem. Syst. Ecol*, 20 (4), pp.393.
93. Linhart YB, Grant MC. (1996) Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst*, 27, pp.237-277.
94. Lodge DM. (1993) Biological invasions: lessons for ecology. *Trends Ecol. Evol.*, 8, pp.133–137.
95. Lonsdale WP. (1999). Global patterns of plant invasions and the concept of invasibility. *Ecology*, 8, pp.1522-1536.-
96. Lucena RB, Rissi DR, Maia LA, Flores MM, Dantas AFM, Nobre VMT, Riet-Correa F, Barros CSL. (2010) Intoxicação por alcaloides pirrolizidínicos em ruminantes e equinos no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.*, 30(5), pp.447-452.
97. Macel M, Klinkhamer PGL, Vrieling K, Van der meijden E. (2002) Diversity of pyrrolizidine alkaloids in *Senecio* species does not affect the specialist herbivore *Tyria jacobaeae*. *Oecologia*, 133, pp.541–550.
98. Macel M, Vrieling K, Klinkhamer PGL. (2004) Variation in pyrrolizidine alkaloid patterns of *Senecio jacobaea*. *Phytochemistry*, 65, pp.865–873.
99. Mack RN, Simberloff D, Lonsdale WM, Evans H, Clout M. (2000) Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences, and control. *Ecol. Appl.*, 10, pp.689-710.
100. MacLachlan NJ, Cullen JM. (1998) Fígado, sistema biliar e pancreas exócrino. En: Carlton WW y McGavin MD (ed.) *Patologia Veterinária Especial de Thomson*. 2 ed., Artes Médicas, Porto Alegre, pp. 95-131.
101. Mantel N. (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res*, 27, pp.209 220.
102. Marzocca A. (1992) *Manual de malezas*. 4º edición, ed. Hemisferio Sur, pp. 684.
103. Más C. (1978) Region Este. En: *Pasturas IV*. Ministerio de Agricultura y Pesca, Centro de Investigaciones Agrícolas “Alejandro Boerger”, Miscelaneas, 2da ed, 18, p49-85.
104. Mattocks AR. (1986) *Chemistry and toxicology of pyrrolizidine alkaloids*. Academic Press, London, p.393.

105. Matzenbacher NI, Schneider AA. (2008) Nota sobre a presença de uma espécie adventícia de *Senecio* (Asteraceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Revta Bras. Biociênc.*, 6, pp.111-115.
106. Méndez MC; Riet-Correa F, Schild AL, Martz W. (1990) Intoxicação experimental por por cinco espécies de *Senecio* en bovinos y aves. *Pesq. Vet. Bras.*, 10(3/4), pp.63-69.
107. Monty A, Mahy G. (2009) Clinal differentiation during invasion: *Senecio inaequidens* (Asteraceae) along altitudinal gradients in Europe. *Oecologia*, 159(2), pp.305-315.
108. Mooney HA, Cleland EE. (2001) The evolutionary impact of invasive species. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98, pp.5446–5451.
109. Motooka P, Nagai G, Onuma K, Duponte M, Kawabata A, Fukumoto G. (1999) Control of fireweed (*Senecio madagascariensis*). CTAHR publication on weed control WC-2. University of Hawaii press, Honolulu.
110. Mroczek T, Glowniak K. (2002). Pyrrolizidine alkaloids: their chemistry, occurrence and significance as natural compounds. En: Rauter AP, Palma FB, Justino J, Araujo E, Dos Santos SP (eds) Natural products in the new millenium: propects and industrial application. Kluwer, Dordrecht, pp.1–46.
111. Müller-Schärer H, Schaffner U, Steinger T. (2004) Evolution in invasive plants: implications for biological control. *Trends ecol evol*, 19, pp.417–422.
112. Muetterlein R, Arnold C-G. (1993) Investigations concerning the content and the pattern of pyrrolizidine alkaloids in *Symphytum officinale* L. (Comfrey). *Pharm Ztg.*, 138, pp.119–125.
113. Nei M, Maruyama T, Chakraborty R. (1975) The Bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*, 29, pp.1-10.
114. Orians CM, Ward D. (2010) Evolution of plant defenses in nonindigenous environments. *Annu. Rev. Entomol.*, 55, pp.439-459.
115. Panziera W, Goncalves MA, Oliveira LGS, Lorenzetti MP, Reis M, Hammerschmitt ME, Pavarini SP, Driemeier D. (2017) Intoxicação por *Senecio brasiliensis* em bezerros: padrão e evolução de lesões hepáticas. *Pesq. Vet. Bras.*, 37(1), pp.8-16.
116. Parsons WT, Cuthbertson EG. (1992) Noxious weeds of Australia. Inkata press, Melbourne/Sydney, pp.692.
117. Pelter PB, van den Hof K, Gravendeel B. (2004) The systematic value of morphological characters in *Senecio* sect. *Jacobaea* (Asteraceae) as compared to DNA sequences. *Syst Bot*, 29, pp.790–805
118. Pelter PB, Devos H, Theuringcet AL. (2005) Frequent gain and loss of pyrrolizidine alkaloids in the evolution of senecio section jacobaea (asteraceae). *Phytochemistry*, 66, pp.1285–1295
119. Pelter PB, Nordenstam B, Kadereit JW. (2007) An ITS phylogeny of tribe *Senecioneae* (Asteraceae) and a new delimitation of *Senecio*. *Taxon*, 56, pp.1077–1104.
120. Pelter PB, Abbott RJ, Comes HP, Möller JJ, Looseley ME, Cron JV; Barcelona JF, Kennedy AH, Watson LE; Barone RN, Hernandez FN, Kadereit JW. (2012) The genetic ghost of an invasion past: colonization and extinction revealed by historical hybridization in senecio. *Mol. Ecol*, 21, pp.369–387.

121. Pimentel D, Zuniga R, Morrison D. (2005) Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. *Ecol. Econ.*, 52, pp.273–288
122. Prakash AS, Pereira TN, Reilly PEB, Seawright AA. (1999) Pyrrolizidine alkaloids in human diet. *Mutat. Res.*, 443, pp.53–67.
123. Preliasco M, Gardner D, Moraes J, Gonzalez AC, Uriarte G, Rivero R. (2017) *Senecio grisebachii* Baker: Pyrrolizidine alkaloids and experimental poisoning in calves. *Toxicon*, 133, pp.68-73.
124. Prentis PJ, Wilson JRU, Dormontt EE, Richardson DM, Lowe AJ. (2008) Adaptive evolution in invasive species. *Trends Plant Sci*, 13(6).
125. Radford IJ, Cousens RD. (2000a) Invasiveness and comparative life-history traits of exotic and indigenous *Senecio* species in australia. *Oecologia*, 125, pp.531–542.
126. Radford IJ, Muller P, Fiffer S, Michael PW. (2000b) Genetic relationships between Australian fireweed and South African and Madagascan populations of *Senecio madagascariensis* poir. and closely related *Senecio* species. *Aust. Syst. Bot.*, 13, pp.409-423.
127. Radosevich SR; Stubbs MM, Ghera CM. (2003) Plant invasions – process and patterns. *Weed Science*, 51, pp.254-259.
128. Rasmann S, Agrawal AA. (2009) Plant defense against herbivory: progress in identifying synergism, redundancy, and antagonism between resistance traits. *Current opinion in plant biology*, 12, pp.473–478.
129. Riaz A, Li G, Quresh Z, Swati M, Quiros CF. (2001) Genetic diversity of oilseed brassica napus inbred lines based on sequence-related amplified polymorphism and its relation to hybrid performance. *Plant breed.*, 120, pp.1-5.
130. Richardson DM, Pysek P, Rejmanek M. (2000) Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. *Divers. Distrib*, 6, pp.93–107.
131. Richardson DM, Pysek P. (2006) Plant invasions: merging the concepts of species invasiveness and community invasibility. *Prog. Phys. Geog.*, 30, pp.409–431.
132. Riet- Correa F, Méndez MC, Schild AL. (1993). Intoxicações por plantas e micotoxícoses em animais domésticos. *Agropecuaria Hemisferio Sur SRL*. Montevideo.
133. Riet-Correa F, Medeiros RMT. (2001) Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. *Pesq. Vet. Bras.*, 21, pp.38-42.
134. Riet-Correa F, Medeiros RMT, Pfister J, Schild AL, Dantas AFM. (2009) Plants causing hepatic fibrosis. En: Riet-Correa (2009) Poisoning by plants, mycotoxins and related substances in Brazilian Livestock. Ed. da Universidade Federal de Campina Grande, 4, pp.66:80.
135. Rissi DR, Rech RR, Pierezan F, Gabriel AL, Trost ME, Brum JS, Kommers GD, Barros CSL. (2007) Intoxicações por plantas e micotoxinas associadas a plantas em bovinos no rio grande do sul: 461 casos. *Pesq. Vet. Bras.*, 27(7), pp.261-268.
136. Rivero R, Riet-Correa F, Dutra F, Matto C. (2011) Toxic plants and mycotoxins affecting cattle and sheep in uruguay. En: Riet-Correa F, Pfister J, Schild AL, Wierenga TL (2011) Poisoning by plants, mycotoxins, and related toxins. London, cab, pp.25-34.

137. Rohlf F. (2000) NTSYS-PC. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 1.70. Exeter Software Publ. Setanhet. N.Y.
138. Romo de Vivar A, Pérez-Castorena AL, Arciniegas A, Villaseñor JL. (2007) Secondary metabolites from Mexican species of the tribe *Senecioneae* (Asteraceae). *J. Mex. Chem. Soc.*, 51(3), pp.160-172.
139. Rowe ML, Lee DJ, Nissen SJ, Bowditch BM, Masters RA. (1997) Genetic variation in North American leafy spurge (*Euphorbia esula*) determined by DNA markers. *Weed Sci*, 45, pp.446–454
140. Sakai AK, Allendorf FW, Holt JS. (2001) The population biology of invasive species. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst*, 32, pp.305–332.
141. Schmalhausen II. (1949) *Factors of Evolution*. Chicago University Press, Chicago.
142. Schwaegerle KE, Schaal BA. (1979) Genetic variability and founder effect in the pitcher plant *Sarracenia purpurea* L. *Evolution*, 33(4), pp. 1210-1218.
143. Scott LJ, Congdon C, Playford J. (1998) Molecular evidence that fireweed (*Senecio madagascariensis*, Asteraceae) is of South African origin. *Plant Syst. Evol.*, 213, pp.251-257.
144. Silvertown JW, Lovett Doust J. (1993) *Introduction to plant population ecology*. Blackwell scientific publications, Oxford, 3era ed., 210p.
145. Sindel B, JhorarO, Reeve I, Thompson L, Moss J, Coleman M. (2009) *Weed detection on farms: a guide for landholders*. University of new england, Armidale, 22p.
146. Sindel B, Coleman M. (2012) *Fireweed: a best practice management guide for Australian landholders*. University of New England, pp.33, ISBN 978-1-921597-37-4.
147. Schlichting CD. (1986) The evolution of phenotypic plasticity in plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 17, pp.667-93.
148. Soltis DE, Soltis PS. (1999) Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. *TREE*, 14.
149. Soltis PS, Soltis DE. (2000) The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *PNAS*, 97(13), pp.7051–7057.
150. Stegelmeier BL, Edgar JA; Colegate SM, Schoch TK, Gardner DL, Coulombe RA, Molyneux RJ. (1999) Pyrrolizidine alkaloids plants, metabolismo and metabolism. *J Nat Toxins*, 8(1).
151. Stegelmeier BL. (2011) Pyrrolizidine alkaloid–containing toxic plants (*Senecio*, *Crotalaria*, *Cynoglossum*, *Amsinckia*, *Heliotropium*, and *Echium* spp.). *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 27(2), pp.419-428.
152. Stigger AL, Stima-Silva P, Fiss L, Coelho ACB, Santos BL, Gardner DR, Marcolongo-Pereira C, Schild AL. (2014) *Senecio madagascariensis* poir. (asteraceae): uma nova causa de seneciose em bovinos no sul do rio grande do sul. *Pesq. Vet. Bras.*, 34(9), pp.851-855.
153. Taylor EL. (1939) Technique for the estimation of pasture infestation by strongyloid larvae. *Parasitology*, 31, pp.473–478.
154. Tokarnia C.H., Döbereiner J. & Peixoto P.V. (2000) Plantas hepatotóxicas. En: Tokarnia C.H., Döbereiner J. & Peixoto P.V. (2000) *Plantas Tóxicas do Brasil*. Editora Helianthus, Rio de Janeiro, pp.80-110.
155. Trigo RJ, Leal IR; Matzenbacher NI, Lewinsohn TM. (2003) Chemotaxonomic value of pyrrolizidine alkaloids in Southern Brazil *Senecio* (Senecioneae: Asteraceae). *Biochem. Syst. Ecol*, 31(1), pp. 1011-1022.

156. Vanijajiva O. (2012) Assessment of genetic diversity and relationships in pineapple cultivars from Thailand using ISSR marker. *J. Agr. Sci. Tech.*, 8(5), 1829-1838.
157. Van dam NM, Vrielin K. (1994) Genetic variation in constitutive and inducible pyrrolizidine alkaloid levels in *Cynoglossum officinale*. *Oecologia*, 99, pp.374-378.
158. Van Dam NM, Vuister LWM, Bersghoeff C, Vos H de, van der Meijden E. (1995) The 'raison d'êntre' of pyrrolizidine alkaloids in *Cynoglossum officinale*: deterrent effects against generalist herbivores. *J Chem Ecol.*, 21, pp.507–523.
159. Verschavea SH, Leveckea B, Duchateaub L, Vercruyssea J, Charlier J. (2015) Measuring larval nematode contamination on cattle pastures: comparing two herbage sampling methods. *Vet. Parasitol*, 210, pp.159–166.
160. Vitousek PM, D'antonio CM, Loope LL, Westbrooks R. (1996) Biological invasions as global environmental change. *Am. Sci.*, 84, pp.468-478.
161. Von borstel K, Witte L, Hartmann T. (1989) Pyrrolizidine alkaloid patterns in populations of *Senecio vulgaris*, *S. vernalis* and their hybrids. *Phytochemistry*; 28, pp.1635-1638.
162. Vrieling K, Smit W, van der Meijden E. (1991) Tritrophic interactions between aphids (*Aphis jacobaeae* Schrank), ant species, *Tyria jacobaeae* L., and *Senecio jacobaea* L. lead to maintenance of genetic variation in pyrrolizidine alkaloid concentration. *Oecologia*, 86, pp.177–182.
163. Vrieling K, De Vos H, Van Wijk Cam. (1993) Genetic analysis of the concentrations of pyrrolizidine alkaloids in *Senecio jacobaea*. *Phytochemistry*, 32, pp.1141–1144.
164. Wardle DA, Nicholson KS, Rahman A. (1995). Ecological effects of the invasive weed species *Senecio jacobaea* (ragwort) in a New Zealand pasture. *Agric. Ecosyst. Environ*, 56, pp.19–28.
165. Watson R, Launder T, Macadam J. (1994) Fireweed. *Nsw agriculture agfact p7 6 26*, 2nd edn. New south wales department of agriculture. Scone, Australia.
166. Widen B, Andersson S. (1993) Quantitative genetics of life-history and morphology in a rare plant, *Senecio integrifolius*. *Heredity*, 70, pp.503—514.
167. Wiedenfeld H, Edgar JA. (2011) Toxicity of pyrrolizidine alkaloids to humans and ruminants. *Phytochem rev*, 10, pp.137–151.
168. Willmot FC, Robertson GW. (1920) *Senecio* disease or cirrhosis of the liver due to senecio poisoning. *Lancet*, pp.848–849.
169. Witte L, Ernst L, Adam H, Hartmann T. (1992) Chemotypes of two pyrrolizidine alkaloid-containing senecio species. *Phytochemistry*, 31, pp.559-565.
170. Wouters ATB, Boabaid FM, Fredo G, Wouters F, Driemeier D. (2013) Caracterização imuno-histoquímica das alterações encefálicas em bovinos com hepatopatia tóxica por *Senecio* sp. *Pesq. Vet. Bras.*, 33(11), pp.1325-1331.
171. Wright S. (1965) The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19, pp.395–420
172. Venables WN, Ripley BD. (2002) Software and datasets to support 'Modern Applied Statistics with S'. Springer, 4ed, ISBN 0-387-95457-0.
173. Villalba J, Fernández G. (2000) Algunas consideraciones sobre *Senecio* spp. *Nota técnica*. Cangüé, 19.

174. Xie X, Zhou F, Zhang X, Zhang J. (2009) Genetic variability and relationship between mt-1 elephant grass and closely related cultivars assessed by srp markers. *J. Genet*, 88, pp.281-290.
175. Yaber MA, Ciancia M, Leicach SR. (2009) Variación en la producción de alcaloides en inflorescencias de *Senecio grisebachii* por deficiencia de nutrientes. *Ci. Suelo*, 27(1), pp. 31-39,
176. Yang Y, Zhao L, Wang YF, Chang ML, Huo CH, Gu YC, Shi QW, Kiyota H. (2011) Chemical and Pharmacological Research on Plants from the Genus *Senecio*. *Chem. Biodiv.*, 8, pp.13-72.
177. Zangerl AR, Berenbaum MR. (1990) Furanocoumarin induction in wild parsnip: genetics and populational variation. *Ecology*, 71, pp.1933-1940.
178. Zhu L, Li N, Ruana JQ, Fuc PP, Zhao ZZ, Lin G. (2015) Chemical diversity investigation of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in qianliguang (*Senecio scandens*) and related species by UHPLC-QTOF-MS. *WJTCM*, 1(2), pp.1-11.