

## ALCALOIDES E INFECCION FUNGICA EN FESTUCA: ESTADOS FENOLOGICOS Y POSIBILIDAD DE CONTAMINACION

Alicia E. Ramírez de Guglielmoni (1); Alicia M. Sáenz (1); Mirta B. Guglielmoni (1).  
María A. Carabelli (2); E. O. Basile (3); María C. Pereyra (1) y G. J. Segal (1)

Recibido 30/5/84

Aceptado: 21/11/84

### RESUMEN

Se ha estudiado la concentración de alcaloides en los distintos estados de desarrollo de una festuca tóxica en comparación con otra inocua, y la posibilidad de que la infección con *Epichloe typhina* pueda ser transmitida hacia plantas próximas sanas.

Los resultados indican:

#### a) Festuca tóxica

En el estado vegetativo de las plantas jóvenes, tanto los alcaloides pirrolizidínicos (lolinas), como perlolina, se encuentran en concentraciones pequeñas, aumentando luego durante la encañazón y floración. Los niveles de infección fúngica y de alcaloides pirrolizidínicos fueron medianos o elevados en los estados vegetativos siguientes, aún durante los meses fríos.

#### b) Festuca inocua

Si bien la perlolina aumentó marcadamente desde el estado vegetativo a la floración, no fue posible detectar, en ese lapso, alcaloides pirrolizidínicos.

En los estados vegetativos siguientes, durante dos años, tanto el contenido de estos alcaloides como la infección con *Epichloe typhina* fueron prácticamente nulos.

## ALKALOIDS AND FUNGIC INFECTION IN FESCUE: STATES OF GROWTH AND POSSIBILITY OF CONTAMINATION

### SUMMARY

The alkaloid content in different states of growth of both a toxic and a non toxic tall fescue, and the possibility of transmission of the infection with *Epichloe typhina* to neighbouring healthy plants, has been studied. The results indicate:

#### a) Toxic tall fescue

At the vegetative state of young plants, the pyrrolizidinic alkaloids (loline) as perloline, were found in low concentrations, later increasing during the jointing and flowering states.

The levels of both the fungic infection and the pyrrolizidinic alkaloids were either moderate or high in the successive vegetative states, even during the cold months.

#### b) Non toxic tall fescue

Although perloline markedly increased from the vegetative to the flowering states, it was impossible to detect pyrrolizidinic alkaloids in that period. At the following vegetative states (during two years) neither these alkaloids nor *Epichloe typhina* infection have been found.

1) Cátedra de Bioquímica, Departamento de Química, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Av. San Martín 4453, (1417) Buenos Aires, Argentina.

2) Becaria de A.A.C.R.E.A.

3) Becario de la Fundación Bunge y Born a través de la Fundación Facultad de Agronomía.

## INTRODUCCION

La festuca alta (*F. arundinacea* Schreber) es, por sus valiosas condiciones agronómicas, una forrajera ampliamente difundida en la pampa húmeda y subhúmeda de nuestro país. En un trabajo previo de nuestro laboratorio (R. de Guglielmo *et al.*, 1983) se ha comentado que, con frecuencia harto inconveniente, las praderas con festuca pueden producir toxicidad al pastoreo directo fundamentalmente durante la temporada primavero-estival. Aún cuando todavía se desconoce el factor tóxico, nuestros resultados (R. de Guglielmo y Sáenz, 1980; R. de Guglielmo *et al.*, 1982) permiten suponer que el alcaloide diazofenantrénico perlolina, cuantitativamente el más importante durante los meses cálidos, no sería el responsable directo o único del "síndrome de verano", puesto que en las festucas innocuas puede encontrarse en igual o mayor concentración que en las tóxicas. En cambio, la diferencia fundamental parece radicar en otro alcaloide, que hemos identificado como lolina, pirrolizidínico, presente en cantidades significativas sólo en festucas tóxicas (R. de Guglielmo *et al.*, 1982 y 1983). Es por ello, que este alcaloide, sin poder aún atribuirle carácter de agente etiológico del síndrome, puede ser, en cambio, considerado como factor indicativo de toxicidad actual o potencial de la pastura.

Dado que se ha supuesto que en algunos estados fenológicos la festuca puede ser más tóxica que en otros, parte del objetivo de este trabajo fue conocer si en esos estados se produce una variación en el contenido de alcaloides pirrolizidínicos.

Por otra parte, recientemente, se ha informado que el aumento de los alcaloides pirrolizidínicos acetil lolina y formil lolina (derivados N- sustituidos de lolina base) está asociado, en festucas tóxicas de EE.UU. (Bush *et al.*, 1982) a una infección endofítica provocada por *Epichloe typhina* (Fires) Tulasne,

un hongo clavicipetáceo ahora redenidoado *Acremonium coenophialium* (Morgan-Jones y Gams, 1982).

Resultados preliminares de nuestro laboratorio (R. de Guglielmo *et al.*, 1984) han permitido confirmar que en las festucas tóxicas de nuestro país puede encontrarse una asociación similar, mientras en las festucas innocuas hay sólo trazas o ausencia de lolinas y no se detecta infección fúngica.

Dada la importancia práctica que tendría la propagación de la infección entre plantas próximas, en este trabajo se ha estudiado la probabilidad de contaminación fúngica y/o de aumento del contenido de alcaloides pirrolizidínicos en una festuca innocua, adyacente a una tóxica, en función del tiempo.

## MATERIALES Y METODOS

En una superficie perteneciente al campo de la Universidad de Luján, se limitaron cuatro parcelas de 3 m x 1,50 m, separadas por caminos de 0,50 m. En junio de 1981 se plantaron dos de ellas con semilla (cultivar de origen desconocido), cosechada en un festucal probadamente tóxico, situado en un establecimiento particular en Canals, provincia de Córdoba; y las otras dos parcelas con semilla fiscalizada del cultivar "El Palenque" provista por la EERA, INTA, Pergamino. Este cultivar ha demostrado, a través de varios años, su inocuidad al pastoreo de ganado bovino. Las parcelas implantadas con semilla del festucal tóxico se denominaron  $T_A$  y  $T_B$  y aquéllas correspondientes al cultivar "El Palenque"  $P_A$  y  $P_B$ .

En la Catedra de Manejo y Conservación de Suelos de la Facultad de Agronomía, UBA, se llevó a cabo el análisis de contenido de nitrógeno total en alícuotas puntuales de las cuatro parcelas.

La siembra (densidad 800 plantas por metro cuadrado) se realizó en líneas distanciadas 0,15 m, utilizándose para el análisis ma-

terial vegetal sólo de las seis centrales, para evitar efecto de borde. En los distintos estados fenológicos, vegetativo, encañazón y floración, se obtuvieron muestras de dos líneas para cada uno, habiéndose realizado los cortes el 3/10/81, el 3/11/81 y el 5/12/81, respectivamente.

La extracción de alcaloides de tallos y hojas de festuca y su posterior purificación, separación cromatográfica, identificación y valoración espectrofotométrica se realizó según el método previamente descrito (R. de Guglielmone *et al.*, 1983). Dado que no se dispuso de droga testigo para lolina, su identificación se realizó por las características cromatográficas demostradas en tres sistemas distintos de ensayo y los resultados se expresan como absorbancia a 270 nm por gramo de pasto seco (R. de Guglielmone *et al.*, 1983). La perlolina fue valorada a 395 nm y los resultados se expresan como microgramos por gramo de pasto seco.

Para el estudio de contaminación fúngica se obtuvieron muestras representativas de T<sub>A</sub>, T<sub>B</sub> y P<sub>A</sub> el 6/1/83, 7/6/83 y 23/11/84. La detección del hongo endofítico *Epichloe typhina* se llevó a cabo según la técnica original de Bacon *et al.* (1977) con ligeras modificaciones. Sintéticamente, se obtuvieron cortes de las dos vainas basales externas de diez macollos de cada muestra, elegidos al azar. Los cortes se trataron con una solución acuosa de azul de anilina al 0,1 por ciento, adicionada de 50 ml de ácido láctico, en baño María hirviendo durante 10 minutos. Luego de enfriar o conservar en heladera por no más de 72 horas, los cortes se observaron en un microscopio binocular Zeiss. El grado de contaminación se expresó como porcentaje de macollos infectados, adjudicando a cada uno un valor de 0 a 10, según que la cantidad de hifas fuera nula, escasa, mediana o abundante respectivamente. El reconocimiento del endófito se ha realizado basándose en las características morfológicas descritas originalmente por C. W. Bacon *et al.* (1977); hifas delgadas, largas, tabicadas, rectas o más generalmente onduladas, extrace-

lulares, no ramificadas, que corren en el sentido del diámetro celular mayor y que se tiñen de azul intenso. Todas las otras formas endófitas observadas fueron descartadas para el cómputo de porcentaje de infección.

En la Figura 1 se muestra la fotografía de un preparado de nuestro laboratorio, obtenido de T<sub>A</sub>. Un preparado similar, remitido a C. W. Bacon (Universidad de Georgia, Estados Unidos de Norteamérica) fue reconocido, a nuestro requerimiento, como correspondiente a *Epichloe typhina*.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Hasta mediados de 1982 el único factor indicativo con que contábamos para suponer la toxicidad de una festuca desconocida, era la magnitud de concentración de lolina. Este componente, que en el sistema de solventes que hemos utilizado para su separación cromatográfica (n-butanol, ácido acético glacial, agua, 12: 3: 5) tiene un R<sub>f</sub> de 0,16-0,19 (R.



Figura 1: *Epichloe typhina* en festuca tóxica.

Fotomicrografía de un preparado de vaina basal de T<sub>A</sub> obtenido según materiales y métodos. Las flechas indican hifas del endófito (x 500).

de Guglielmo *et al.*, 1983), cuando es eluido y recromatografiado durante 30 horas o más se separa en dos alcaloides que, serían, supuestamente, acetil lolina y formil lolina, derivados N-sustituídos de la lolina base (Robbins *et al.*, 1972) y, por consiguiente, alcaloides pirrolizidínicos. En este trabajo se valoraron conjuntamente.

En una primera etapa, se analizaron las variaciones en la concentración de estos alcaloides y de perlolina, durante los distintos estados fenológicos de la festuca tóxica, en comparación con el cultivar "El Palenque". En todas las muestras analizadas de este cultivar se comprobó virtual ausencia de lolina, tanto por tinción del cromatograma con iodoplati-

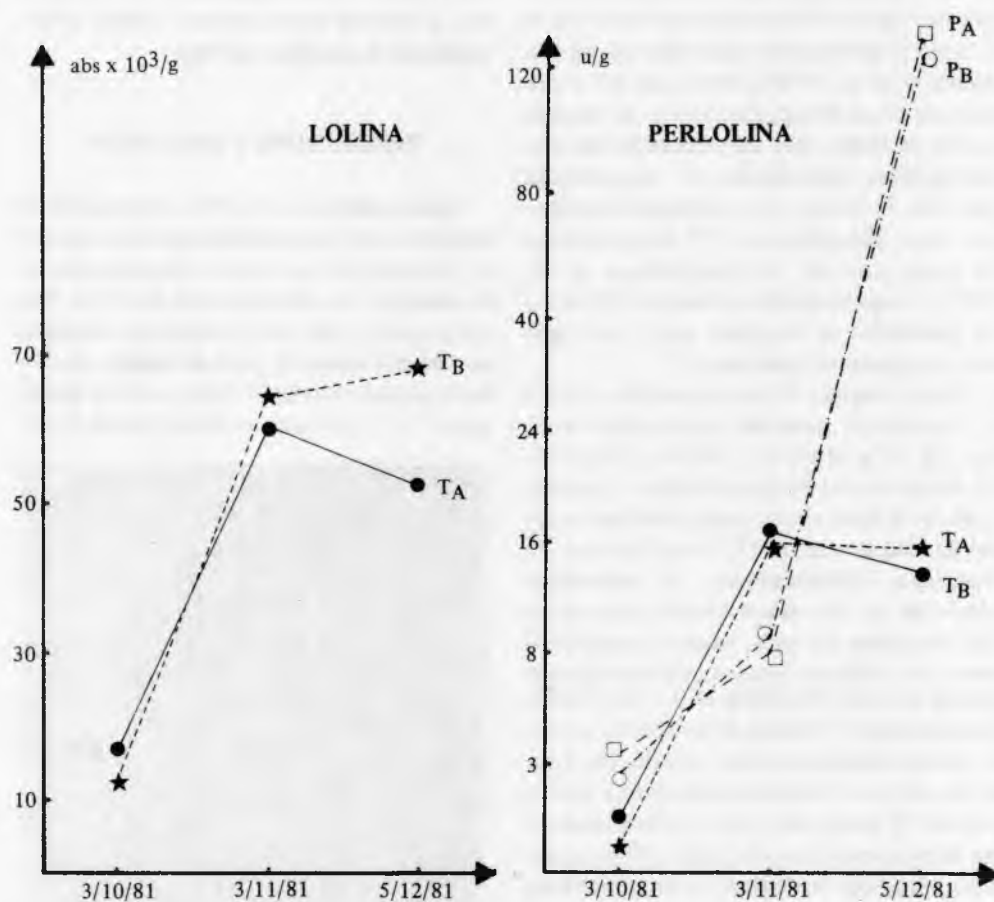


Figura 2: Variaciones en la concentración de alcaloides de festuca en los distintos estados fenológicos.

T<sub>A</sub> y T<sub>B</sub>: parcelas obtenidas de semilla de un festucal tóxico. P<sub>A</sub> y P<sub>B</sub>: parcelas del c.v. "El Palenque". El contenido de N en g % fue 0,182; 0,183; 0,183 y 0,181, respectivamente. Cada punto es la media de dos submuestras. Los valores de concentración de lolina corresponden a la absorbancia total a 270 nm por g de pasto seco y corresponde al componente que incluye acetil lolina y formil lolina (ver texto). En el 2º y 3º corte las concentraciones de perlolina en las parcelas tóxicas fue significativamente distinta por análisis de variancia ( $P < 0,01$ ) respecto de las inocuas.

nato de potasio como por medida de absorbancia a 270 nm del eluato obtenido del mismo, en la zona de Rf 0,16-0,19 (Figura 2). Con respecto a la festuca tóxica, los niveles de alcaloides pirrolizidínicos en el estado vegetativo, fueron muy bajos, aumentando alrededor de seis veces en la encañazón, para mantenerse luego sin variaciones notables. Esta evolución concuerda con resultados previos a otros autores (Gentry *et al.*, 1968).

Con respecto a perlolina, las cuatro parcelas demostraron poseer cantidades medibles desde el estado vegetativo. Hacia la encañazón hubo en T<sub>A</sub> y T<sub>B</sub> un aumento brusco (concentraciones significativamente mayores que en P<sub>A</sub> y P<sub>B</sub>), que pareció luego estabilizarse en la floración, mientras que en P<sub>A</sub> y P<sub>B</sub> el aumento de concentración prosiguió con valores aproximadamente 8 veces más altos que en T<sub>A</sub> y T<sub>B</sub>. La interpretación de estos resultados no es fácil. Sin embargo, teniendo en cuenta que actualmente se considera que los alcaloides no son meros estadios terminales del metabolismo nitrogenado, sino más bien reservorios en continua movilización (Tso y Jeffrey, 1959) y que la disponibilidad de N original (Cuadro 1), y la influencia de la temperatura y humedad en cada una de las parcelas fue similar, es posible suponer que en la festuca tóxica dicha dispo-

nibilidad se diversificó parcialmente hacia la formación de dos tipos de alcaloides, pirrolizidínicos y diazofenantrénicos, mientras que en el cultivar "El Palenque", por causa desconocida, perlolina fue largamente el alcaloide más importante. Este aumento notable de perlolina durante el verano confirma nuestros resultados previos (R. de Guglielmo *et al.* 1980), los que indicaban además un descenso espectacular del contenido de este alcaloide en los meses fríos. Aún cuando perlolina no parece ser el factor etiológico del "síndrome de verano", no puede descartarse al presente su acción como coadyuvante en el cuadro por el efecto demostrado "in vitro" sobre la microfauna y microflora ruminal (Bush *et al.* 1972).

Durante el lapso en que estudiamos la variación de alcaloides en los distintos estados fenológicos de festuca, no existía información sobre la relación entre lolinas e infección fúngica. Si bien en 1977, Bacon *et al.* describieron la identificación de hifas de *Epichloa typhina* en festuca tóxica y en pasto quilla (*Agrostis perennis* (Walt.) Tuck.), sólo desde 1981 informaciones preliminares sobre comportamiento animal en festucas infectadas (Schmidt *et al.* 1981) y posteriores sobre contenido de alcaloides pirrolizidínicos y porcentaje de infección (Bush *et al.*, 1982)

CUADRO 1: Alcaloides pirrolizidínicos e infección fúngica en festuca tóxica e innocea en sucesivos estados vegetativos.

Fecha de muestreo	E <sup>+</sup> mm	Pp <sup>+</sup> mm	Parcelas					
			T <sub>A</sub>		T <sub>B</sub>		P <sub>A</sub>	
			Lolina	Infección %	Lolina	Infección %	Lolina	Infección %
6/1/83	155,7	94,4	51,6	40	34,3	43	0	0
7/6/83	22,0	26,0	76,5	93	48,6	50	0	0
23/2/84	107,6	318,5	78,5	80	n.d.	50	0	0

E<sup>+</sup> y Pp<sup>+</sup> representan la evaporación y precipitación mensuales respectivamente, suministrados por la Estación Agroclimática Campo Luján; T<sub>A</sub>, T<sub>B</sub>, P<sub>A</sub> ver texto; Concentración de lolina e infección fúngica se expresan según texto; n.d.: no determinado.

indicaron la importancia de ambos eventos como factores indicativos de toxicidad. Nuestra experiencia al respecto, iniciada durante el verano 82/83, ha permitido confirmar este criterio para festucas tóxicas de nuestro país (R. de Guglielmo *et al.*, 1984).

La búsqueda de *Epichloe typhina* y la determinación del contenido de lolina se realizó en las parcelas  $T_A$ ,  $T_B$  y  $P_A$  al estado vegetativo obtenido por cortes sucesivos durante un año calendario. Los resultados se muestran en el Cuadro 1. Durante el ensayo,  $T_A$  y  $T_B$  presentaron desde mediano a alto tenor de infección y contenido de alcaloides, este último semejante al estado de encañazón de las plantas jóvenes. El pico de ambos parámetros en  $T_A$  se obtuvo, sorpresivamente, durante junio de 1983, lo que eventualmente podría atribuirse a la disponibilidad real de agua. En efecto, la diferencia entre precipitación y evaporación mensual fue negativa para enero de 1983 y positiva para junio de 1983 y febrero de 1984 (Cuadro 1). En cambio no podemos explicar los distintos valores obtenidos en  $T_A$  y  $T_B$  siendo la misma semilla y la implantación contemporánea, ya que  $T_B$  presenta un 40 por ciento menos de lolina e infección fúngica que  $T_A$ . Sin embargo, conviene tener en cuenta que, de acuerdo a otros investigadores (Boling *et al.*, 1982) aún los valores de  $T_B$  configuran las características de una festuca tóxica.  $P_A$  por el contrario, no mostró infección fúngica ni cantidades de lolina medibles por nuestro método. Dada la escasa distancia entre parcelas (ver Materiales y Métodos) y el tiempo transcurrido desde su implantación (3 años) puede suponerse que el cultivar "El Palenque" permaneció sin infectarse. Esto supone que la transmisión del endófito entre plantas próximas es improbable, por lo menos a corto plazo.

Lamentablemente, no sabemos al presente, si el cultivar "El Palenque" es resistente a la infección o si, como indican informes recientes (Siegel, 1983) el endófito "in vivo" tiene un ciclo incompleto sin generar formas reproductivas, siendo la vía de propagación

más probable, las hifas contenidas en semilla. Por ello, el riesgo de contaminación de una festuca inocua, no resistente, podría depender del depósito accidental de restos de tallos u hojas infectados sobre matas sanas heridas durante el corte que supone el pastoreo.

En resumen, los resultados presentes permiten suponer que, si bien en el estado vegetativo de la planta joven tóxica, la cantidad de alcaloides pirrolizidínicos es la más baja, en los sucesivos estados vegetativos, tal como se dan durante pastoreos intensivos, dicha concentración no llega nunca a disminuir a esos niveles. Esto se asocia al respetable tenor de contaminación fúngica, aún en los meses fríos. Pareciera que estos resultados son incompatibles con la práctica habitual de pastoreo de festucas tóxicas desde mayo a setiembre, la cual indica que generalmente no surgen problemas. Sin embargo, es necesario considerar que si bien durante este lapso los indicadores de toxicidad pueden no disminuir en magnitud, el síndrome animal, caracterizado por un estado febril, no llegaría a manifestarse clínicamente por la posibilidad de disipación de calor favorecida por las condiciones ambientales. Ello está corroborado por experiencias de otros autores (Boling *et al.*, 1982) y por el hecho, no infrecuente en nuestro país, que la elevación brusca de humedad y temperatura en el invierno provoquen una súbita aparición del cuadro. Es por ello que el riesgo de toxicidad sólo se evitará con la erradicación de la festuca que ha manifestado problemas y su sustitución por cultivares probadamente inocuos. Nuestra tarea futura apunta al estudio de aquellos que están libres de alcaloides pirrolizidínicos y contaminación fúngica.

## CONCLUSIONES

La concentración de alcaloides pirrolizidínicos en el estado vegetativo de plantas jóvenes de festuca tóxica, parece ser una situación irrepetible, puesto que tanto en los otros estados fenológicos, como en los esta-



dos vegetativos siguientes, dicha concentración es, como mínimo, cuatro a cinco veces mayor.

En las condiciones de este ensayo, la infección fúngica, que invariablemente se asocia a la presencia de alcaloides pirrolizidínicos en festucas tóxicas, no se transmite, por lo menos durante tres años, a plantas próximas libres de ambos indicadores de toxicidad.

Si bien aún no se conoce si alguno o ambos de estos indicadores de toxicidad animal pueden ser considerados agentes etiológicos del síndrome, dado que ellos persisten en los sucesivos estados vegetativos de festuca tóxica, el pastoreo es desaconsejable, incluso en meses fríos, ante cambios eventuales de temperatura ambiente que disminuyan la posibilidad de pérdida de calor animal.

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido apoyado por subsidios del CONICET (Nº 8808 c/82 y Nº 8808 d/83) y por A.A.C.R.E.A. La Fundación Bunge y Born a través de la Fundación Facultad de Agronomía ha contribuido becando a uno de los autores. La EERA, INTA Pergamino, ha provisto la semilla fiscalizada cultivar "El Palenque", utilizada en el ensayo. Los autores agradecen a la Cátedra de Manejo y Conservación de Suelos, Facultad de Agronomía, UBA; y al Ing. Agr. Eduardo Antonio Ducca, de la Facultad de Agronomía, UBA, por el valioso aporte a este trabajo a través de la compaginación de datos de la Estación Agroclimática Campo Luján.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1) Bacon, C. W.; J. K. Porter; J. D. Robbins and E. S. Luttrell, 1977. *Epichloe typhina* from toxic tall fescue grasses. *Appl. Environ. Microbiol.* 34: 576-581.
- 2) Boling, J. A.; R. W. Hemken; L. P. Bush; R. C. Buckner; J. A. Jackson Jr. and S. G. Yates, 1982. Role of alkaloids and toxic compound (s) in the utilization of tall fescue by ruminants *Proceedings XIV. Internat. Grassl. Congr. A. Smith ed., Boulder, Colo. Westview Press. Pág. 722-725.*
- 3) Bush, L. P.; J. A. Boling; G. Allen and R. C. Buckner, 1972. Inhibitory effects of perloine to rumen fermentation in vitro. *Crop Sci.* 12: 277-279.
- 4) Bush, L. P.; P. L. Cornelius; R. C. Buckner; D. R. Varney; R. A. Chapman; P. B. Burrus; C. W. Kennedy; T. A. Jones and M. J. Saunders, 1982. Association of N-acetyl loline and N-formyl loline with *Epichloe typhina* in Tall Fescue. *Crop Sci.* 22: 941-943.
- 5) Gentry, C. E.; R. A. Chapman; L. Henson and R. C. Buckner, 1968. Factors affecting the alkaloid content of tall fescue. Kentucky Agricultural Experiment Station. 1-15.
- 6) Morgan-Jones G. and W. Gambs, 1982. An endophyte of *Festuca arundinacea* and the anamorph of *Epichloe typhina*, new taxa in one of the new Sections of *Acremonium*, *Mycotaxon*, 15: 311-318.
- 7) Ramírez de Guglielmone, A. E. y A. M. Sáenz, 1980. Determinación de alcaloides de *Festuca arundinacea* (Schreb.) en relación con toxicidad. *Memorias del III Congreso Argentino de Ciencias Veterinarias.* Ed. por Sociedad de Medicina Veterinaria Buenos Aires. Pág. 204-214.
- 8) Ramírez de Guglielmone, A. E.; A. M. Sáenz; S. I. Gahan; M. A. Carabelli y M. B. Guglielmoni, 1982. Alcaloides de festuca: variaciones cuali-cuantitativas y toxicidad. *Producción Animal*, 9: 280-288.
- 9) Ramírez de Guglielmone, A. E.; A. M. Sáenz; M. A. Carabelli; M. B. Guglielmoni; E. O. Basile y M. C. Pereyra, 1983. Influencia del suelo y la fertilización nitrogenada sobre el contenido cuali-cuantitativo de alcaloides de festuca cultivar "El Palenque". *Rev. Facultad de Agronomía*, 4 (1): 69-77.
- 10) Ramírez de Guglielmone, A. E.; A. M. Sáenz; M. B. Guglielmoni; M. A. Carabelli; E. O. Basile; M. C. Pereyra y G. J. Segal, 1984. Indicadores de toxicidad en festuca. *Rev. CREA*, 105: 72-75.
- 11) Robbins, J. D.; J. G. Sweeny; S. R. Wilkinson and D. Burdick, 1972. Volatile alkaloids of Kentucky 31 tall fescue seed. *J. Agr. Food Chem.* 20: 1040-1042.

- 12) Schmidt, S. P.; C. S. Hoveland; C. C. King; E. M. Clark; N. D. Davis; D. M. Ball; L. A. Smith; H. W. Grimes and J. L. Holliman, 1981. Fungus limits fescue pasture gains. Highlights of Agricultural Research Published by Agricultural Experiment Station of Auburn University Alabama. Vol 28, N° 2.
  - 13) Siegel, M. R., 1983. Mode of transmission of the fescue endophyte. *Proceedings Tall Fescue Toxicosis Workshop*, Atlanta Georgia. 48-51.
  - 14) Tso, T. C. and R. N. Jeffrey, 1959. Biochemical studies on tobacco alkaloids. I. The fate of labelled tobacco alkaloids supplied to *Nicotiana* plants. *Arch. Biochem. Biophys.* 80: 46-56.
-