

## Tesis de Licenciatura

# Producción de tricotecenos macrocíclicos por el epibionte fúngico de *Baccharis coridifolia*

Rosso, María Luciana

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en  
Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis de licenciatura de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Six-Year Bachelor's Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Rosso, María Luciana. ( ). Producción de tricotecenos macrocíclicos por el epibionte fúngico de *Baccharis coridifolia*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario\\_nBIO000653\\_Rosso](http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000653_Rosso)

Cita tipo Chicago:

Rosso, María Luciana. "Producción de tricotecenos macrocíclicos por el epibionte fúngico de *Baccharis coridifolia*". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires..  
[http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario\\_nBIO000653\\_Rosso](http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000653_Rosso)

**EXACTAS**  
UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

**FCE y BN BIBLIOTECA**

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLOGICAS**

**TESIS DE LICENCIATURA**

***“Producción de tricotecenos macrocíclicos por  
el epibionte fúngico de Baccharis coridifolia”***

**AUTORA: MARIA LUCIANA ROSSO**

**DIRECTORA: MARIA DELIA BERTONI  
CODIRECTORA: MARTA SILVIA MAIER**

**1999**

**Nº 0653**

### **FE DE ERRATAS**

- 1- En la página No. 5 en el primer párrafo donde dice: enlace macrocíclico entre C-4 y C-5, debería decir: enlace macrocíclico entre C-4 y C-15.
- 2- En la página No. 5 en el segundo párrafo donde dice: presentando las roridinas un grupo hidroximetilo, debería decir: presentando las roridinas un grupo hidroxietilo.
- 3- En la página No. 21, en el diagrama, donde dice: metileno, debería decir: cloruro de metileno.



*A mis padres  
A mis hermanos  
A Rodrigo*

*Agradezco especialmente a mi Directora, Dra. María Delia Bertoni y a mi Codirectora, Dra. Marta Silvia Maier por su paciencia, dedicación y por haberme enseñado tanto durante mi trabajo.*

Agradezco también:

- A los Sres. miembros del Jurado.
- Al Dr. Jorge Wright y al Dr. Daniel Cabral por sus consejos y útiles comentarios
- Al Dr. Arturo Wulf por suministrarme las plantas necesarias para este trabajo y por sus consejos que me fueron de gran utilidad.
- A la Dra. Varsavky , por haberme recibido en su laboratorio y por sus consejos.
- A la Dra. Alicia Seldes.
- A Rodrigo, por ser tan compañero y haberme apoyado en todo momento.
- A mis padres que me brindaron su apoyo incondicional y la oportunidad de dedicarme exclusivamente a mi formación profesional.
- A mis hermanos, Lorena y Diego, por estar en todo momento.
- A mi gran amiga Belén, por todo lo que compartimos durante las largas tardes de estudio y por su gran apoyo en todos estos años.
- A mis super amigas Laly, Vicky, Jose y Lucila, por los hermosos años que compartimos y por estar siempre en los momentos importantes de mi vida.
- A "mis amigas del Sur", por esta gran amistad que cultivamos desde el secundario y que conservamos como un gran tesoro.
- A la Dra. Silvia López, por sus útiles consejos que me ayudaron a tomar importantes decisiones.
- A la Dra. Andrea Romero, por su apoyo y colaboración en todo momento.
- A Vicky y Marce, por los momentos que compartimos.
- A Cybele y Lupe, por su amistad.
- A verito, Ceci y Vivi, por los almuerzos más divertidos de estos últimos años.
- A Laura Levin y a Alejandro Pardo, por ser tan buenos compañeros de laboratorio.

*-A mis compañeros del laboratorio de Química Orgánica: Leonor, Hugo, Laura y Eyleen, que me brindaron todo su apoyo.*

*-A la gente del Laboratorio 8, por haberme prestado material necesario para este trabajo..*

*-A la Sra. Mercedes y a la Sra. Bruna.*

<b>Resumen</b>	1
<b>Introducción</b>	
El género <i>Baccharis</i>	2
<i>Baccharis coridifolia</i>	2
Tricotecenos macrocíclicos	5
1) Estructura química	5
2) Análisis	7
3) Actividad biológica	8
Líneas de investigación	9
Antecedentes de epibiontes fúngicos en pastos	9
<b>Hipótesis</b>	12
<b>Objetivos</b>	13
<b>Materiales y Métodos</b>	
Población de plantas	14
Cultivo de meristemas	14
Producción de tricotecenos macrocíclicos	14
A) En medio líquido	15
B) En medio sólido	15
Extracción de tricotecenos macrocíclicos	16
Purificación y aislamiento de los tricotecenos macrocíclicos	19
Resonancia magnética nuclear	22
<b>Resultados</b>	
Cultivo de meristemas	23
Producción y extracción de tricotecenos macrocíclicos	24
Aislamiento y caracterización de los tricotecenos macrocíclicos	25
<b>Discusión</b>	30

<b>Conclusiones</b>	33
<b>Anexo</b>	34
<b>Bibliografía</b>	39

## *Resumen*

*Baccharis coridifolia* D.C. (Asteraceae) es un arbusto herbáceo, conocido como "mio mio" o "romerillo". Es una de las plantas tóxicas más importantes para mamíferos herbívoros. Posee una amplia distribución desde el sur de Brasil, Paraguay, Uruguay y Argentina (hasta la Prov. de Río Negro). Las sustancias tóxicas presentes en esta especie son tricotecenos macrocíclicos: roridinas A, D y E; verrucarinas A y J y miotoxinas. Estos metabolitos son micotoxinas sintetizados por algunos hongos, como por ejemplo: *Myrothecium roridum* y *M. verrucaria*.

Desde 1997, se conoce la presencia de un epibionte fúngico en meristemas de *Baccharis coridifolia*. Por comparación del DNA<sub>r</sub> 18S se determinó que el epibionte pertenece al orden Hypocreales, al igual que los géneros *Fusarium*, *Myrothecium* y *Stachybotrys* que son productores de tricotecenos.

En el presente trabajo de investigación se demostró que el epibionte fúngico de *B. coridifolia* sintetiza los mismos tricotecenos macrocíclicos que los hallados en las plantas: roridinas A y E y verrucarinas A y J. La localización del epibionte en los meristemas lo ubica en una posición ideal para la colonización de hojas, tallos, flores y semillas, partes de la planta donde fueron hallados los tricotecenos.

Teniendo en cuenta los antecedentes de epibiontes fúngicos en pastos, que establecen una asociación mutualista con el hospedante, produciendo metabolitos secundarios tóxicos para el ganado y la capacidad del epibionte de producir los mismos tricotecenos macrocíclicos que los hallados en las plantas, sugerimos que este epibionte establecería una relación mutualista con *B. coridifolia* y sería el responsable de la presencia de dichas toxinas en la planta y el causante de la toxicidad hacia herbívoros.

## *Introducción*

## **El género *Baccharis***

El género *Baccharis* (familia Asteraceae, tribu: Astereae, subtribu: Baccharidinae), contiene más de 500 especies, que pertenecen exclusivamente a América, (excepto una). Estas especies se distribuyen en 7 áreas geográficas: Brasil, Montañas Andinas, Andes patagónicos, S.E. de Brasil, México (incluyendo el Oeste de Estados Unidos) y Las Antillas, incluyendo el Este de Estados Unidos (Malagarriga, 1976). La gran concentración de especies en Brasil y en los Andes sugiere que éstas áreas son el centro de origen (Teodoro-Luis, 1955).

Las plantas de *Baccharis* son arbustos leñosos perennes, de 0,5 a 4,0 m de altura, son plantas dioicas, por lo tanto poseen polinización cruzada, con la única excepción de *B. monoica* Neson (1988) de América Central.

Algunas especies de *Baccharis* poseen valor productivo y son importantes localmente: para protección del suelo, reduciendo la erosión y eliminando malezas (*B. pilularis*, *B. sarothroides*, *B. salicifolia* y *B. macrantha*); como ornamental, ya que algunas son robustas; resistentes a suelos salinos (*B. halimifolia* -introducida en Europa y Australia -, *B. angustifolia*, *B. geomeruliflora* y *B. neglecta*); como productoras de miel (*B. salicifolia*, *B. pilularis* y *B. sacrothroides*); para fabricación de perfumes (*B. dracunculifolia* y *B. genistelloides*); con usos medicinales: fabricación de té (*B. douglasii*), lavado de ojos y lociones (*B. salicifolia*), disminución de la fiebre, trastornos digestivos y actividad antimicrobiana (*B. crispa* y *B. notosergila*).

Sin embargo algunas especies de este género son tóxicas para el ganado, como por ejemplo: *Baccharis coridifolia* y *B. megapotamica*.

### ***Baccharis coridifolia***

*Baccharis coridifolia* D.C. es un arbusto herbáceo, conocido como "mío-mío" o "romerillo" (Fig. 1). Posee una amplia distribución desde el Sur de Brasil, Paraguay, Uruguay, Norte y Centro de Argentina (hasta la provincia de Río Negro) (Fig. 2). Frecuentemente se halla en sabanas y estepas.

La planta es perenne y forma matas densas de 40-80 cm de altura, siempre de color verde. Sus hojas son lineales, agudas, enteras y sin nervaduras. Los capítulos son pequeños, dispuestos en racimos densos en los extremos de las ramas y formando en conjunto una amplia panoja foliosa (Burkart, 1974).

Es una de las plantas tóxicas más importantes para mamíferos herbívoros y causante de severas pérdidas en el ganado (bovinos, ovinos, suinos y equinos) (Gallo, 1987; Habermehl *et al.*, 1985a). Aunque los animales de las regiones endémicas generalmente conocen la planta y no la ingieren, sí lo hacen los que son trasladados desde regiones en donde no crece, produciendo en ellos resultados fatales. Se dice que esta planta produjo una gran mortandad de caballos en la campaña del General Lavalle contra Rosas, cuando en el Norte preparaba la expedición libertadora (Monticelli, 1941).

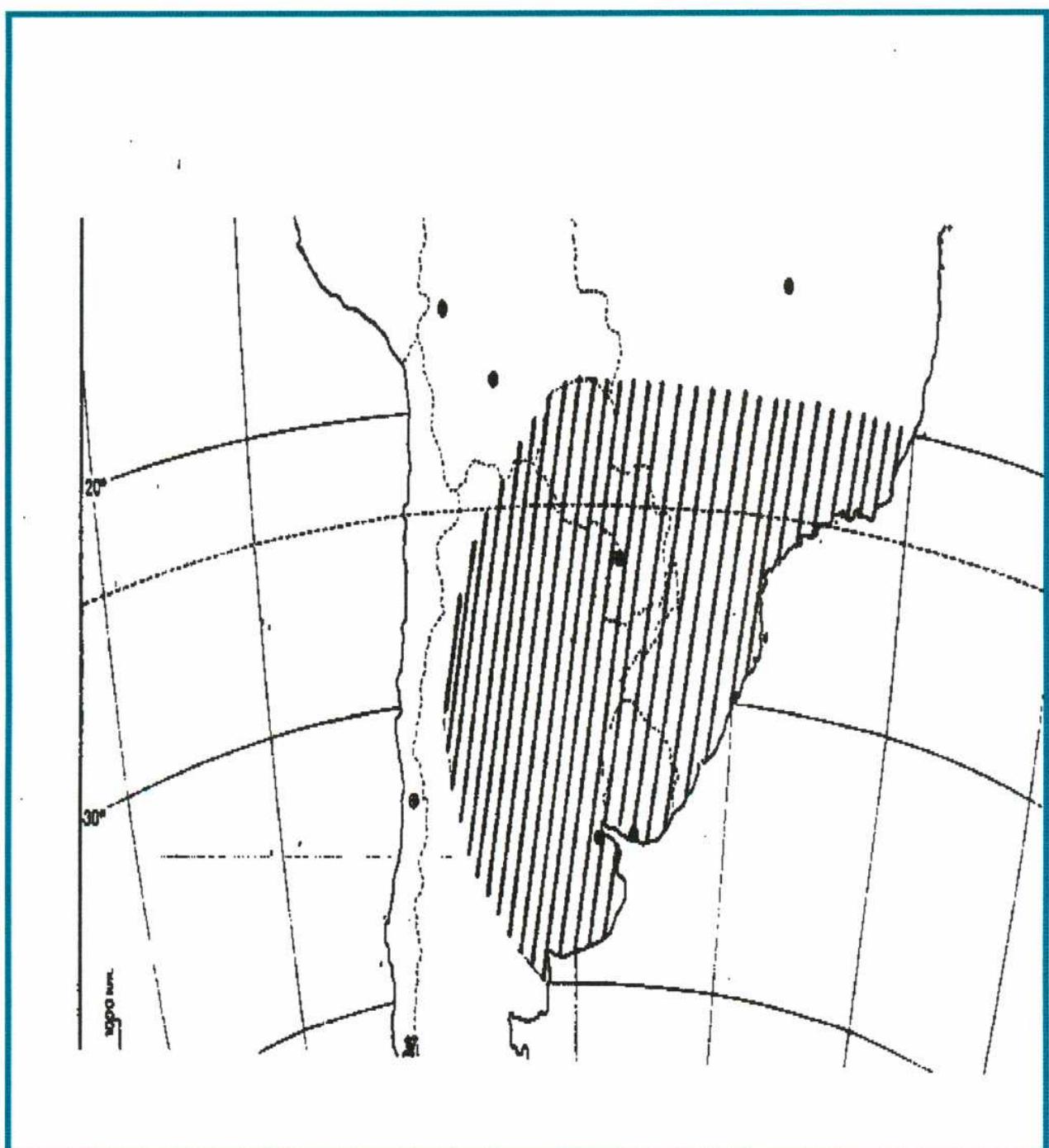
La ingestión de estas plantas produce una intoxicación sobreaguda. Los primeros síntomas que comienzan a las 6-8 horas después de la ingesta, provocan cierta intranquilidad, luego hay astenia absoluta, anorexia y sed. Hay hiperestesia de la columna vertebral, que se evidencia en una incoordinación del tren posterior. El aparato locomotor sufre contracciones musculares. La saliva tiene un color verdoso que es prácticamente la disolución del mío-mío. Hay cólicos gastrointestinales y posteriormente diarreas intensas. El animal padece de una congestión aguda de pulmón o edema pulmonar, latidos cardíacos irregulares, violentos y tumultosos, acompañados de pulso débil. Hay micciones repetidas, siendo éstas producidas por la congestión renal. Toda intoxicación con mío-mío se

**Figura 1.** Aspecto general de *Baccharis coridifolia*



a.- aspecto general de la planta; b.- planta femenina; c.- planta masculina; d.- capítulo.

Figura 2. Mapa de distribución de *Baccharis coridifolia*



acompañada de midriasis intensa, teniendo los animales dificultades de acomodación y de visualización de los objetos (Gallo, 1987) y, en casos extremos, la intoxicación provoca la muerte (Tokatnia y Döbereiner, 1976).

La toxicidad de *B. coridifolia* presenta variaciones bastante grandes según el estado de crecimiento de la planta, por ejemplo, las hojas, raíces y tallos son tóxicos durante todo el año, pero la toxicidad es de 4 a 8 veces mayor al final de la estación de crecimiento, durante la floración (Jarvis *et al.*, 1991) y en las semillas (Jarvis *et al.*, 1988b; Kuti *et al.*, 1990).

Varios profesionales argentinos resultaron pioneros en este tema, Murray, en 1862, fue el primero en mencionar las características tóxicas de la planta y Andrieu, en 1906, demostró experimentalmente la toxicidad de esta especie. En 1917, Flores y Houssay estudiaron exhaustivamente la toxicidad de la misma en una amplia gama de animales. Este trabajo se completó con la colaboración de Arreguine, en 1918, que describió la técnica de extracción de las sustancias tóxicas y su purificación hasta obtener un producto que presentaba una toxicidad constante (Reggs *et al.*, 1984). Muchos años más tarde, en 1985a, Habermehl *et al.* encontraron que las sustancias tóxicas presentes en esta especie vegetal y responsables de la toxicidad para el ganado son tricotecenos macrocíclicos: roridinas A, E, H Y D; verrucarinas A y J; miotoxinas A, B, C y D; Isomiotoxina D y miofitocenos A y B (Jarvis *et al.*, 1987a; Cutler and Jarvis, 1985). Estos metabolitos son **micotoxinas** sintetizados por algunos hongos, como *Myrothecium roridum* (Jarvis *et al.*, 1985b); *M. verrucaria* (Jarvis *et al.*, 1985b); *Stachybotrys atra* (*S. chartarum*) (Jarvis *et al.*, 1985b); *Cylindrocarpon sp.* (Matsumoto, 1979), *Verticimonosporium diffractum* (Minato *et al.*, 1975); *Cryptomola acutispora* (Turner and Aldridge, 1983) y *Phomopsis leptostromiformis* (Samples *et al.*, 1984). Previamente tricotecenos macrocíclicos

del tipo bacarinoides (roridinas oxidadas) fueron hallados en otra especie vegetal, *Baccharis megapotamica*, durante un estudio de actividad antitumoral en extractos de plantas (Kupchan *et al.*, 1976; 1977).

## Tricotecenos macrocíclicos

Los tricotecenos son uno de los grupos de micotoxinas más importantes. Estos compuestos son sesquiterpenos y poseen un doble enlace entre C-9 y C-10 y un anillo epóxido en el C-12. Se dividen en dos grupos en función de la presencia o ausencia de un enlace macrocíclico entre C-4 y C-5: A) *Tricotecenos simples* (por ej.: deoxinivalenol, diacetoxicirpenol, toxina T-2, verrucarol, etc.) y B) *Tricotecenos macrocíclicos* (por ej.: bacarinoides, roridinas, verrucarinas, etc.).

### 1) Estructura química

Los tricotecenos macrocíclicos, los cuales son di- o trilactonas de verrucarol, pueden ser divididos en dos clases dependiendo del modelo de sustitución en el anillo macrólido: las **roridinas** (29 átomos de carbono) y las **verrucarinas** (27 átomos de carbono) que difieren en el grupo funcional de C-6', presentando las roridinas un grupo hidroximetilo y las verrucarinas un grupo carbonilo (lactona) (tabla 1, Anexo). Dado que las verrucarinas tienen dos centros estereogénicos menos (C-6' y C-13'), presentan menor dificultad en cuanto a su asignación estructural. Dentro de la clase de las roridinas, hay varias subclases: satratoxinas, vertisporinas, roritoxinas y miotoxinas, las cuales presentan un anillo tetrahidropirano dentro de la cadena del macrólido (tablas 2-3, Anexo), y los bacarinoides que están hidroxilados en el anillo A en C-8 $\beta$  (mayoritarios) o en C-16 (minoritarios) (Jarvis *et al.*, 1987a). Este modelo de sustitución es característico de los bacarinoides, ya que, con pocas excepciones (Corely *et al.*,

1986), el resto de los tricotecenos con un grupo hidroxilo en C-8 tienen configuración  $\alpha$ . Es posible que los bacarinoïdes surjan por hidroxilaciones de roridinas mediadas por la planta.

Las estructuras de los tricotecenos macrocíclicos fueron establecidas por primera vez a partir del análisis por difracción de rayos X del p-iodobenzoato de la verrucarina A (McPhail and Sim, 1966). Desde entonces, se han registrado una serie de estructuras cristalinas por rayos X: verrucarina A (Anderson *et al.*, 1988; Ashton *et al.*, 1990; Sharma y Salunkhe, 1991), verrucarina B (Breitenstein *et al.*, 1979), roridinas A e isoE (jarvis *et al.*, 1982b), miotoxinas A y C (Jarvis *et al.*, 1986), bacarinoïdes B5 (Kupchan *et al.*, 1976), B7 y B2 triacetato (Jarvis *et al.*, 1987 a) y miotoxina A (Habermehl *et al.*, 1984). Dado que la configuración absoluta del núcleo central del tricoteceno ha sido establecida, la cristalografía de rayos X es a menudo utilizada para determinar la configuración de los centros estereogénicos en la cadena del macrólido. Anteriormente, la estereoquímica de estos centros se determinaba por estudios de degradación química (Tamm, 1974).

Variaciones comunes en la estructura se presentan en las posiciones 2',3', las cuales pueden ser un doble enlace (ej. roridina E, verrucarina J, satratoxina H y bacarinoide B9), un epóxido (ej. roridina D, verrucarina B, miotoxina A y bacarinoide B4), una cadena  $\text{CHOCHCH}_3$  (roridina A, verrucarina A y bacarinoide B7) o  $\text{CH}_2\text{CHCH}_3$  (bacarinoïdes B1 y B2 y miotoxina B). Los bacarinoïdes derivados de plantas y las miotoxinas frecuentemente están oxigenadas en C-4'; la roridina J es la única hidroxilada en C-4' reportada a partir del cultivo de un hongo (Tablas 1, 2, 3- Anexo).

## 2) Análisis

La cromatografía en capa delgada (CCD) (Nesheim and Trucksess, 1987) es la técnica analítica más simple y económica. Dado que casi todos los tricotecenos macrocíclicos tienen un sistema de una lactona diénica, la cual es un potente cromóforo ( $\lambda_{\text{máx}} \approx 260 \text{ nm}$ ,  $\epsilon \approx 20.000$ ), sus manchas se visualizan fácilmente con luz UV de longitud de onda corta a un nivel de 50 ng por mancha en ausencia de sustancias interferentes.

Los diastereómeros (por ej. roridina E e isororidina E, bacarinoides B5 y B8, tricoverrinas A y B, etc.) a menudo son difíciles de separar por CCD sin embargo se ha logrado utilizando dos mezclas de solventes de desarrollo distintos, uno a continuación del otro. Las manchas también pueden ser visualizadas por pulverización con ácido sulfúrico/vainillina, las cuales por calentamiento dan manchas de un color azul acero; las roridinas desarrollan el color más rápido que las verrucarinas. Si hay un grupo cetona presente en C-8, las manchas son más verdosas.

La cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) (Shepherd, 1986) es una técnica muy poderosa en el análisis de tricotecenos, que permite detectar estos compuestos en el nivel de nanogramos/inyección. CLAR en fase normal en columnas de sílica gel da una excelente resolución de la mayoría de los macrocíclicos, con tiempos relativos de retención muy cercanos a los Rfs observados en CCD. Los solventes más comúnmente usados son metanol (o alcohol isopropílico) en diclorometano o acetato de etilo en hexano.

La CLAR de fase reversa ha sido empleada en el análisis de muestras contaminadas con *S. atra*. Como es de esperar, el orden de elución en CLAR de fase reversa es inverso al observado en CLAR de fase normal, si bien las roridinas tienden a quedar retenidas más tiempo que las verrucarinas.

Hay que ser cuidadosos en la interpretación de los datos de CCD y CLAR. La presencia de una mancha con el valor de Rf correcto o de un pico en CLAR de tiempo de retención correcto no puede ser considerado como una prueba de la presencia de un tricoteceno macrocíclico. Pruebas confirmatorias se deben obtener por métodos adicionales, idealmente por aislamiento y posterior caracterización no ambigua. La técnica más valiosa para establecer las estructuras de los tricotecenos macrocíclicos es la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), en particular la protónica (RMN  $^1\text{H}$ ) (Mazzola and Jarvis, 1987; Greenhalgh *et al.*, 1989; Sanson *et al.*, 1989).

La espectrometría de masa (EM), en especial técnicas de EM/EM también pueden ser utilizadas, pero dichos análisis no son una rutina para tricotecenos macrocíclicos.

### **3) Actividad Biológica**

Poseen un amplio espectro de actividad biológica, como: antitumoral (Kupchan *et al.*, 1977), antifúngica (Freeman and Morrison, 1948), antiviral (Okazaki *et al.*, 1988; 1989), antibacteriana, insecticida (Kishaba *et al.*, 1962) y en humanos causa dermatitis por contacto (Ueno, 1983). En 1999, Isaka *et al.*, detectaron que poseen también actividad contra la malaria.

Además, los tricotecenos macrocíclicos son tóxicos para todos los eucariotas, porque inhiben la síntesis proteica (McLaughlin *et al.*, 1977; Feinberg y McLaughlin, 1989). Esta inhibición debe a la unión del compuesto a la subunidad 60S de los ribosomas e interfieren en la actividad de la peptidiltransferasa (Feinberg y McLaughlin, 1989; Cundliffe *et al.*, 1974).

## Líneas de investigación

A partir del hallazgo de tricotecenos macrocíclicos en *Baccharis coridifolia* surgen dos líneas de investigación que tratan de explicar la presencia de estas toxinas en las plantas de *B. coridifolia*:

1) Jarvis *et al.* (1988 a; b) proponen que las plantas de *Baccharis coridifolia* sintetizan de novo estas toxinas. Según estos investigadores las plantas de *B. coridifolia* habrían adquirido la capacidad de producir tricotecenos macrocíclicos por una "evolución convergente" con *Myrothecium* o por una "transferencia horizontal de información genética", para la síntesis de tricotecenos, desde el hongo a la planta. Actualmente, estos investigadores trabajan en la caracterización de los genes de *Myrothecium roridum* que intervienen en la biosíntesis de tricotecenos macrocíclicos (Trapp *et al.*, 1998).

2) Nuestro grupo de investigación, por el contrario, sostiene que hongos presentes en las plantas de *B. coridifolia*, y en relación simbiótica mutualista con el hospedante, serían los responsables de la producción de estos metabolitos.

En 1997, Bertoni *et al.*, en esta línea de investigación, detectan la presencia de un epibionte fúngico en meristemas de *Baccharis coridifolia*, que por comparación del DNA<sub>r</sub> 18S, resultó pertenecer al orden Hypocreales, al igual que los géneros *Fusarium*, *Myrothecium* y *Stachybotrys* que son productores de tricotecenos (Sharma and Salunkhe, 1991).

## Antecedentes de epibiontes fúngicos en pastos

Uno de los sistemas más estudiados en cuanto a la relación plantas/ hongos/ toxicidad es el de las pasturas, debido al efecto que se observa en el ganado que ha consumido pastos infectados. Esta asociación generalmente ocurre entre los

pastos (Gramineae) y los hongos pertenecientes a la familia Clavicipitaceae (Hypocreales, Ascomycotina)

La familia Clavicipitaceae contiene géneros cuyas especies son endofíticas, es decir, las hifas crecen intercelularmente en hojas y tallos (Ej. *Epichoë* y *Balansia*) (White and Owens, 1992; White, 1993), mientras que otras especies de esta familia son epífíticas, las hifas crecen sobre los primordios foliares y sobre los meristemas (Clay and Frentz, 1993): *Myriogenospora atramentosa*; *Atkinsonella hypoxylon*; *A. texensis*; *Balansia cyperi*; *B. pilulaeformis*; *B. pallida* y *Claviceps purpurea* (Luttrell and Bacon, 1977; Leuchtmann and Clay, 1988a; 1989; 1988b; Clay and Frentz, 1998; Rykard *et al.*, 1985). Dado que estos géneros pertenecen a la tribu Balansieae, se considera al epifitismo un hábito común en esta tribu (Clay and Frentz, 1998).

Esta asociación planta-epífito en la familia Clavicipitaceae se considera mutualista. Las ventajas que le confiere el epibionte a las plantas huéspedes son:

- ❖ Resistencia a herbívoros, insectos y hongos patógenos gracias a las micotoxinas (alcaloides) producidas por el epibionte (Bacon *et al.*, 1986; Clay and Hammond, 1985; Clay, 1986).
- ❖ Son más vigorosas que las plantas no infectadas ya que la localización del epibionte en los meristemas influye en los patrones de desarrollo, produciendo por ejemplo, fitohormonas (Clay, 1984; 1986; Latch *et al.*, 1985; Leuchtmann and Clay, 1988b; Read and Camp, 1986).

El epibionte está favorecido por su ubicación en los meristemas ya que:

- ❖ Le confiere mayor protección que el estar expuesto en la superficie de las hojas adultas.
- ❖ Facilita la obtención de nutrientes, carbohidratos y sustancias nitrogenadas, a partir de los primordios foliares y meristemas. En estas zonas la cutícula no

está totalmente desarrollada facilitando la captación de nutrientes a partir del hospedante. El intercambio de carbohidratos entre el epibionte y el huésped se demostró en *Myriogenospora atramentosa* (Smith *et al.*, 1984).

- ❖ También se ve facilitada la reproducción y diseminación del epibionte a través de las semillas del hospedante, como en el caso de *Atkinsonella hypoxylon* (Clay and Jones, 1984).

## *Hipótesis*



**Hipótesis:** El epibionte fúngico presente en los meristemas de *Baccharis coridifolia* produce tricotecenos macrocíclicos y es el responsable de la toxicidad de la planta.

## *Objetivos*

1. Aislar el epibionte fúngico de los meristemas de *Baccharis coridifolia*.
2. Realizar cultivos para incentivar la producción de tricotecenos macrocíclicos.
3. Detectar los tricotecenos tanto por Cromatografía en Capa Delgada (CCD) como por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y comparar con extractos de hongos productores de tricotecenos macrocíclicos (*Myrothecium verrucaria*) y con testigos puros.

## ***Materiales y Métodos***

## Población de plantas

Las plantas de *Baccharis coridifolia* utilizadas en este trabajo, se encuentran en el invernadero de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Estas plantas crecieron a partir de semillas de distinta procedencia: Brasil (Santa María, Río Grande Do Sul); Argentina: Gualeguaychú (Provincia de Entre Ríos) y Curuzú Cuatiá (Provincia de Corrientes).

## Cultivo de meristemas

Para el aislamiento del epibionte fúngico se utiliza la técnica de cultivo de meristemas (Bertoni *et al*, 1997). Para ello se cortan los extremos terminales (aproximadamente 5 cm de longitud) de tallos jóvenes y se lavan con agua corriente. Luego se esterilizan superficialmente con una secuencia de alcohol etílico 50% durante 3 minutos, solución acuosa de hipoclorito de sodio (2:1) durante 20 minutos, y cuatro enjuagues con agua destilada estéril. Los pasos siguientes se realizan en condiciones de esterilidad, en un flujo laminar utilizando una lupa binocular. Se separan los primordios foliares externos dejando libres los meristemas con el primer o segundo par de primordios. Los meristemas se cultivan en Cajas de Petri con Agar Agua 2% y se incuban en condiciones de luz diurna y temperatura ambiente durante 30 días. Luego se procede al aislamiento del epibionte.

El micelio que emerge del meristema se repica en tubos con Extracto de Malta Agarizado (EMA).

## Producción de tricotecenos macrocíclicos

Se toman al azar 16 cepas del epibionte. Fracciones de micelio se utilizan para inocular los medios de cultivo (líquidos y sólidos) para la producción de tricotecenos macrocíclicos.

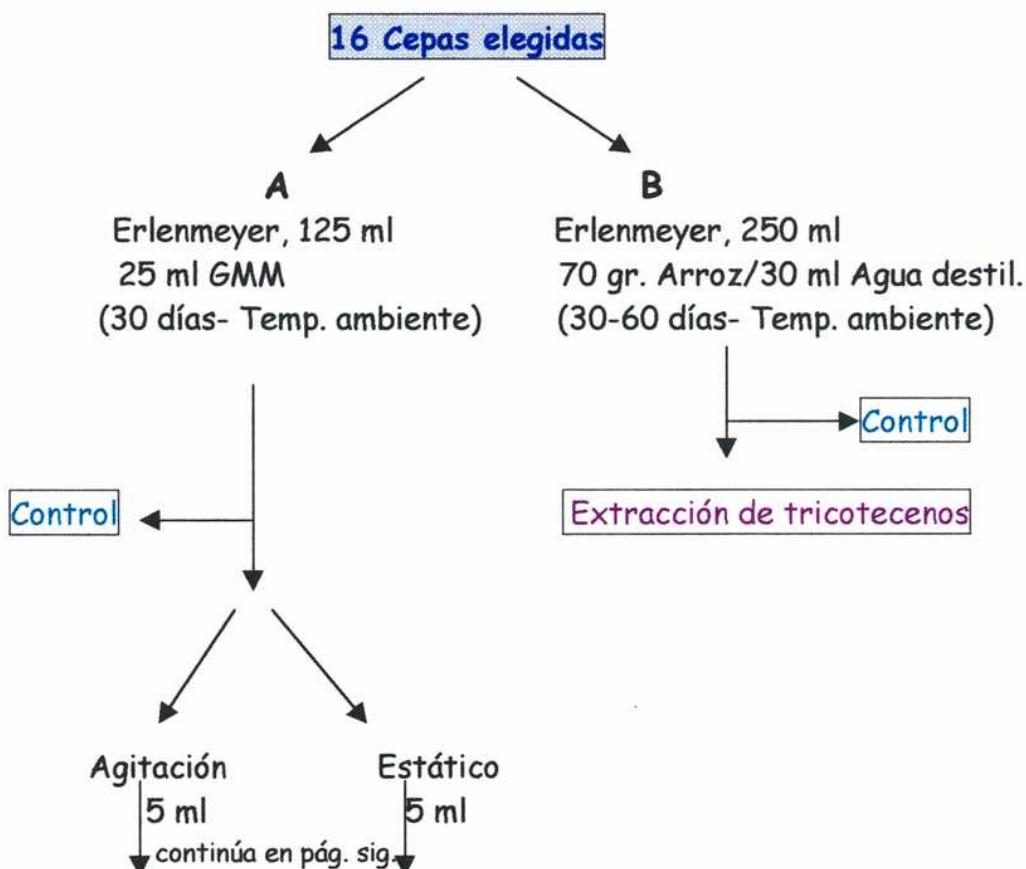
### A-En medio líquido:

Las cepas se cultivan en Erlenmeyers de 125 ml con 25 ml de medio GMM (Glucosa 15,6 gr y Melaza de Maíz 10 ml/l de agua destilada) y se incuban durante 30 días a temperatura ambiente. Luego se transfieren 5 ml del medio a Erlenmeyers de 125 ml con 35 ml de Extracto de Papa (metodología de Jarvis *et al.*, 1987c). Los cultivos se incuban durante 30-60 días a temperatura ambiente.

Se estudian dos condiciones de cultivo distintas: Estático y en agitación (Shaker a 120 rpm, 24°C.) (ver diagrama).

### B-En medio sólido:

Las mismas cepas se cultivan en Erlenmeyers de 250 ml con 70 gr de arroz y 30 ml de agua destilada. Los cultivos se incuban durante 30-60 días a temperatura ambiente (Jarvis *et al.*, 1987c) (ver diagrama).



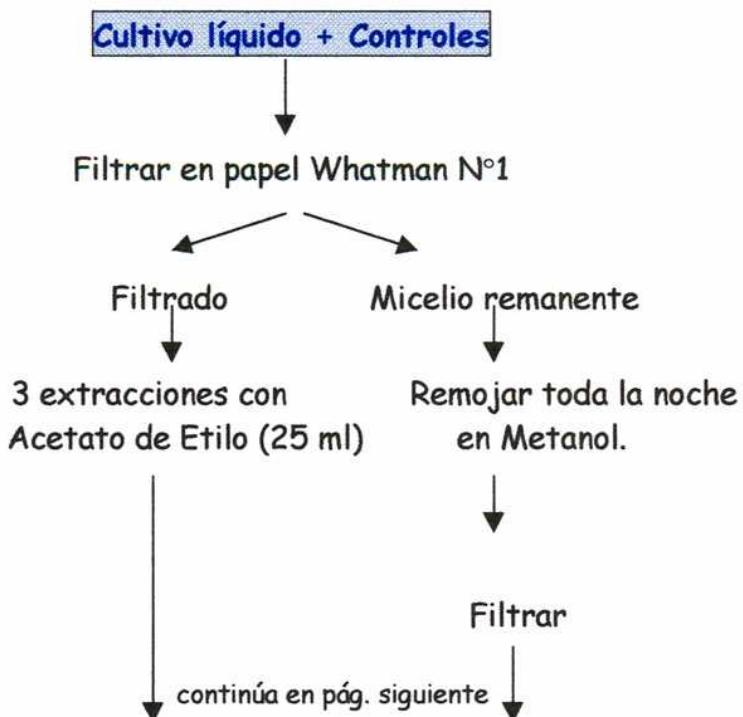
viene de pág. anterior  
 ↓  
 Erlenmeyer, 125 ml, 35 ml  
 Extracto de papa.  
 (30-60 días- Temp. Ambiente)

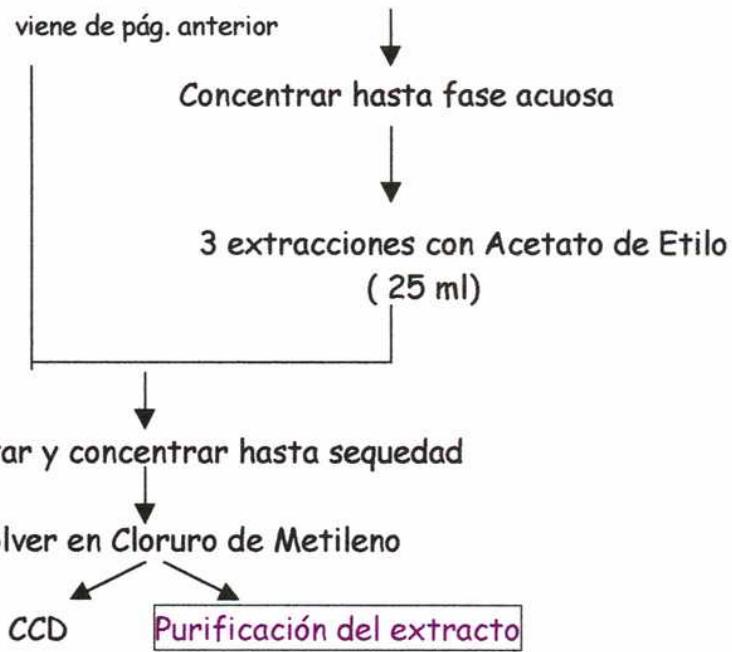


### Extracción de tricotecenos

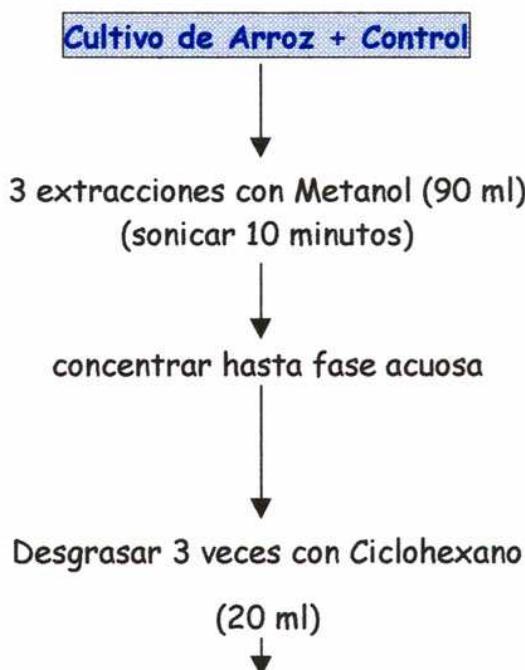
**A-** Los cultivos líquidos se filtran en papel Whatman Nº 1, el filtrado se extrae 3 veces con 25 ml de acetato de etilo. El micelio remanente se remoja toda la noche en metanol, se filtra y se concentra hasta fase acuosa. Luego se extrae 3 veces con 25 ml de acetato de etilo.

Los extractos de acetato de etilo se juntan y concentran hasta sequedad, siendo éste el extracto de tricotecenos (Jarvis *et al.*, 1987c) (ver diagrama).





B- Los cultivos sólidos se extraen 3 veces con 90 ml de metanol en sonicador durante 10 minutos, se combinan los extractos y concentran hasta obtener una fase acuosa. Luego se desgrasan 3 veces con 20 ml de ciclohexano. Se extraen 3 veces con 20 ml de acetato de etilo y se concentran hasta sequedad, siendo éste el extracto de tricotecenos (Jarvis *et al.*, 1987c) (ver diagrama).





Ambos extractos (**A** y **B**) de tricotecenos se disuelven en cloruro de metileno y se analizan por CCD de sílica gel 60 F<sub>254</sub>, usando como solvente cloruro de metileno: acetona (93:7).

Las placas de CCD se revelan con ácido sulfúrico 50% y vainillina 1% en ácido sulfúrico concentrado.

Se comparan las manchas en CCD con el testigo productor de tricotecenos macrocíclicos (*Myrothecium verrucaria*), y con un testigo comercial de verrucarina A (Sigma). Las placas de CCD muestran que los cultivos crecidos en arroz (**B**) tienen muchas impurezas que interfieren en la visualización de los tricotecenos macrocíclicos, por lo tanto se descarta como medio y el aislamiento de las toxinas se hace a partir de los cultivos líquidos (**A**). Se comparan por CCD los extractos de crecimiento en condiciones estáticas y en agitación. En ambos cultivos se observan las mismas manchas, sólo que en agitación se obtiene mayor cantidad de masa (masa del extracto agitación = 58,2 mgr/640 ml Medio de cultivo; masa del extracto estático = 50,2 mgr/ 1130 ml de medio de cultivo).

Teniendo en cuenta esto y siendo crítica la cantidad de material para el análisis, se juntan ambos extractos (agitación y estático) para tener así mayor cantidad de masa y se procede a la purificación y aislamiento de las toxinas.

De las 16 cepas cultivadas, se realizaron los correspondientes extractos y se analizaron por CCD para seleccionar una cepa productora de tricotecenos macrocíclicos.

### **Purificación y aislamiento de los tricotecenos macrocíclicos**

Se pone a punto la técnica de purificación usando las cepas de *Myrothecium verrucaria* ya que son de crecimiento más rápido que el epibionte de *Baccharis coridifolia*.

El extracto (108,7 mgr) se purificó por cromatografía en columna seca de sílica gel H (10-40 $\mu$ ) utilizando ciclohexano (ver diagrama), mezclas de ciclohexano:acetona (90%, 80%, 70%, 60% y 50%) y finalmente metanol como solventes de elución. Se obtuvieron 21 fracciones, las cuales se analizaron por cromatografía en capa delgada (CCD) de sílica gel 60 F<sub>254</sub> (solvente de desarrollo: cloruro de metileno:acetona 93:7).

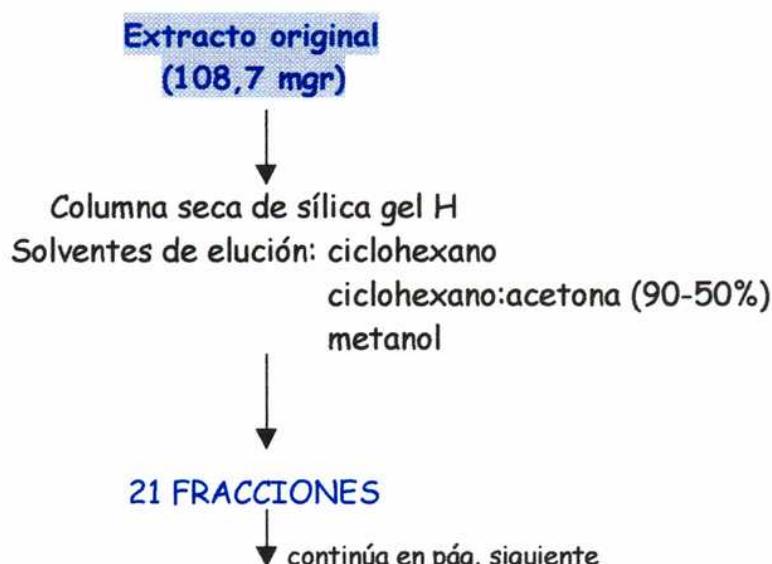
Las fracciones 7 (42,0 mgr) y 8 (10,6 mgr) presentaron manchas de tricotecenos macrocíclicos por CCD mientras que la fracción 4 reveló con características diferentes a los tricotecenos macrocíclicos en cuanto a su coloración con ác. sulfúrico/ vainillina, presentando también absorción al UV ( $\lambda$  254 nm).

La fracción 4 fue purificada por cromatografía en columna de sílica gel (32-63 $\mu$ ) utilizando cloruro de metileno como solvente de elución, aislándose 4,5 mg de una sustancia pura. El análisis por espectroscopía de RMN <sup>1</sup>H y de <sup>13</sup>C de esta fracción reveló que no es un tricoteceno macrocíclico. En el espectro de RMN <sup>13</sup>C se observan 26 señales, de las cuales una corresponde a un carbono carbonílico,

tres a carbonos insaturados, una a carbono unido a oxígeno y varias señales a carbonos de grupos metilo. Estas observaciones se corresponden con el espectro de RMN  $^1\text{H}$ , en donde se observan varias señales entre  $\delta$  0,60 y 0,92 ppm (protones de grupos metilo), una señal compleja a  $\delta$  3,50 ppm (-CH<sub>2</sub>OH) y varias señales de protones olefínicos entre  $\delta$  5,1 y 5,6 ppm. Estos datos no son suficientes para elucidar su estructura y se requiere una mayor cantidad de sustancia para realizar otros experimentos de RMN y espectrometría de masa para completar su elucidación estructural.

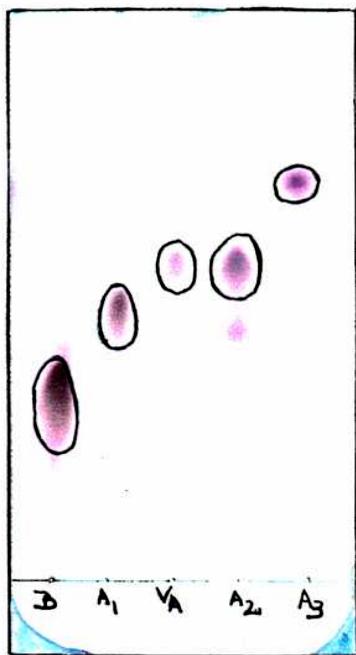
Las fracciones 7 y 8 se juntaron y purificaron por columna de sílica gel (32-63 $\mu$ ), eluyendo con cloruro de metileno, mezclas de metileno:metanol (99,5%, 99% y 98%) y finalmente metanol. Todas las fracciones obtenidas se analizaron por CCD. De acuerdo a su similitud se agruparon en dos nuevas fracciones: fracción 7/8 A (25,3 mgr) y fracción 7/8 B (9,7 mgr), siendo esta última una sustancia pura.

La fracción 7/8 A fue purificada por CCD de sílica gel 60F<sub>254</sub> preparativa (solvente de desarrollo: cloruro de metileno:acetona 93:7), aislando tres fracciones: 7/8 A<sub>1</sub> (12,5 mgr), 7/8 A<sub>2</sub> (2,9 mgr) y 7/8 A<sub>3</sub> (2,7 mgr).



Se analizaron por *CCD* las cuatro sustancias puras contra un testigo comercial de verrucarina A (Figura 3).

**Figura 3.** Cromatografía en capa delgada de sílica gel 60 F<sub>254</sub> de las cuatro sustancias puras y del testigo comercial (Sigma).



- B, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>: Las cuatro sustancias puras aisladas.
- V<sub>A</sub>: Testigo comercial de verrucarina A (Sigma).

Las estructuras de las cuatro sustancias puras se determinaron por resonancia magnética nuclear (RMN).

### Resonancia magnética nuclear

Los espectros de RMN <sup>1</sup>H y de <sup>13</sup>C se realizaron en dos equipos Bruker ACE-200 y 500, utilizando CDCl<sub>3</sub> como solvente deuterado.

## *Resultados*

## Cultivo de meristemas

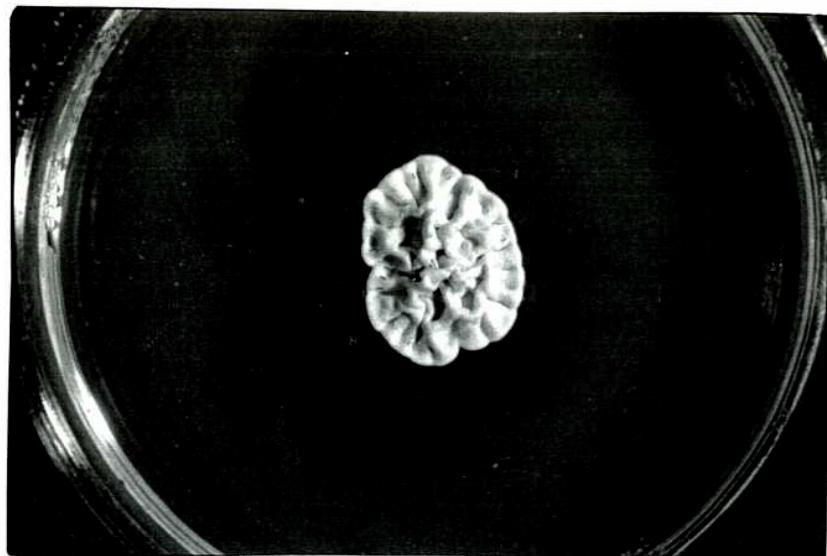
A los 30 días de cultivo de los meristemas en Agar Agua 2% se observa el crecimiento del epibionte. El micelio crece cubriendo total o parcialmente los meristemas. Aproximadamente después de 60 días de incubación se observa que el micelio sólo crece unos pocos mm alrededor del meristema. En cultivo forma una colonia de color blanco, con hifas aéreas compactas, de crecimiento lento, con un diámetro de 12-16 mm después de 30 días de incubación (Figura 4). En cultivo no produce conidios u otra estructura de reproducción.

En secciones de meristema infectado se observa que el micelio es completamente superficial sobre el domo del meristema, especialmente en la cara interna del primordio foliar y en las axilas (Figuras 5 y 6). Las hifas son predominantemente no ramificadas y están adheridas a la superficie del huésped.

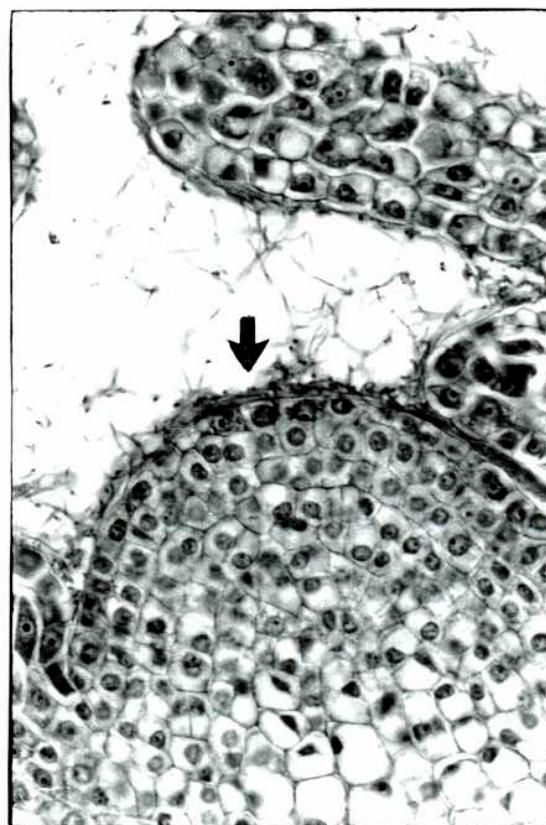
En la Tabla 1 se observa el porcentaje de infección que varía entre un 30% a un 85%. Estos porcentajes coinciden con los previamente encontrados por Bertoni *et al.* (op. cit.) durante el aislamiento del epibionte.

**Tabla 1.** Detección del epibionte fúngico en meristemas de *Baccharis coridifolia*.

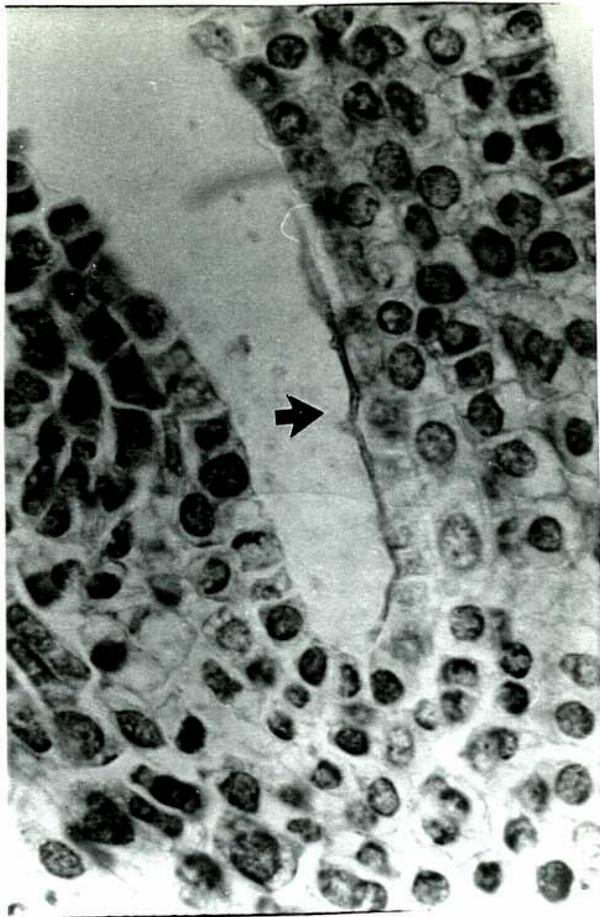
Localidad	Mes de muestreo	Número de meristemas	Número con Epibionte	% de detección
Brasil	Julio	13	4	31%
Corrientes	Julio	16	6	38%
Brasil	Agosto	19	11	58%
Corrientes	Agosto	22	19	86%
?	Julio	9	6	66%
?	Julio	11	7	63%



**Figura 4.** Colonia del epibionte de *Baccharis coridifolia* sobre EMA, X8.



**Figuras 5.** Sección longitudinal del meristema de *Baccharis coridifolia*. La flecha muestra hifas adheridas al domo del meristema en un cultivo de dos semanas, X630.

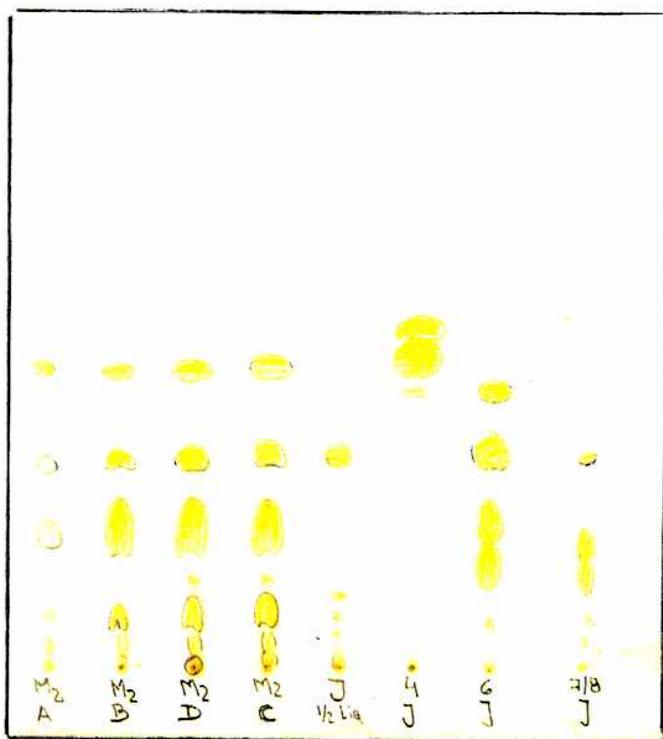


**Figura 6.** Sección longitudinal del meristema de *Baccharis coridifolia*. La flecha muestra las hifas del epibionte sobre las axilas de los primordios foliares del meristema sin cultivar, X 1000.

## Producción y extracción de tricotecenos macrocíclicos

Como se indicó en los materiales y métodos el primer paso en este trabajo fue realizar el cultivo de 16 cepas en medio líquido, para determinar si el epibionte de *Baccharis coridifolia* producía tricotecenos macrocíclicos. Los extractos obtenidos de estos cultivos y de *Myrothecium verrucaria* (utilizados como testigo) se siembran en una placa de CCD. El resultado de la placa (Fig. 7) evidenció que todas las cepas del epibionte producen los mismos tipos de compuestos, siendo algunos de ellos coincidentes con los producidos por *Myrothecium verrucaria*.

**Figura 7.** Comparación de las extractos de las cepas del epibionte fúngico (CCD de sílica gel 60 F<sub>254</sub>).



-A, B, C, D: Cepas del epibionte.

-J (4, 6, 7/8): Distintas fracciones de *Myrothecium verrucaria*.

A partir de este resultado elegimos la cepa No. 699 (BAFC) para el cultivo en masa del epibionte y producción de tricotecenos macrocíclicos, para luego aislar y caracterizar estas toxinas.

### **Aislamiento y caracterización de los tricotecenos macrocíclicos**

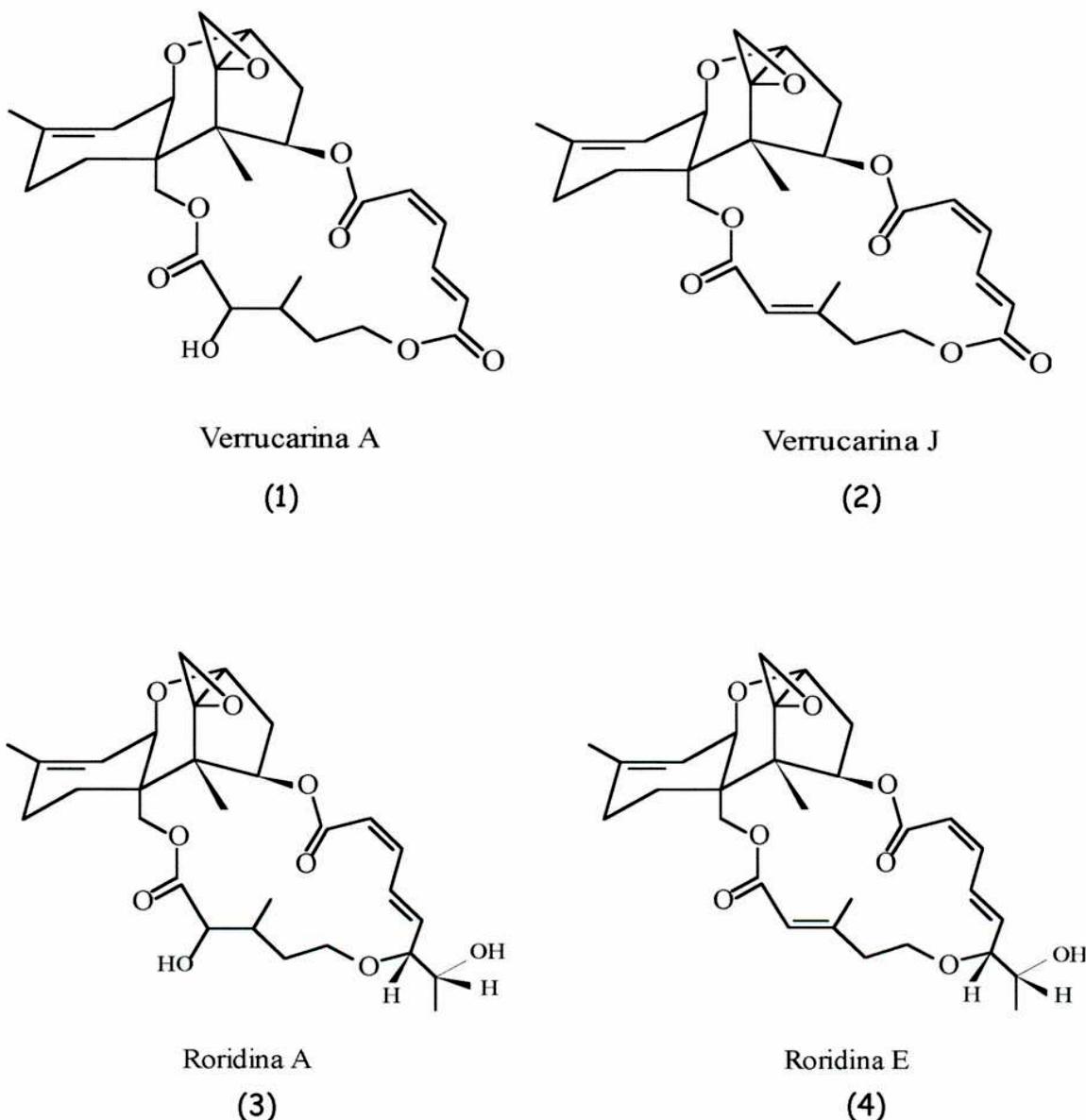
Para el cultivo de la cepa 699 (BAFC), se utilizó el medio líquido (ya mencionado) y se dejó crecer durante 30 días. Al cabo de este período se realizó el extracto y purificación del mismo por cromatografía en columna y en placa preparativa, según los diagramas de las páginas 16 a 17 y 20 a 21 de materiales y métodos. De esta manera se aislaron cuatro tricotecenos macrocíclicos, los cuales fueron identificados como: roridinas A y E y verrucarinas A y J a partir del análisis de sus espectros de RMN  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  (tabla 2). Estos compuestos son los mismos que los hallados en extractos de plantas de *Baccharis coridifolia* (Habermehl *et al.*, 1985a).

**Tabla 2. Presencia y cantidad de tricotecenos macrocíclicos en las distintas fracciones**

Tricotecenos Macrocíclicos	Peso (mg)	Fracción	Estructura
<b>Verrucarina A</b>	2,9	A <sub>2</sub>	1
<b>Verrucarina J</b>	2,7	A <sub>3</sub>	2
<b>Roridina A</b>	9,7	B	3
<b>Roridina E</b>	12,5	A <sub>1</sub>	4

Las estructuras químicas elucidadas a partir de los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  se muestran en la figura 8 y en los espectros correspondientes.

**Figura 8.** Estructura de los 4 tricotecenos macrocíclicos aislados del epibionte fúngico.



El análisis por RMN  $^{13}\text{C}$  (Tabla 3) y RMN  $^1\text{H}$  (Tabla 4) y la comparación de los desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm) y de las constantes de acoplamiento ( $J$ , Hz) con datos de literatura (Jarvis *et al.*, 1996; Habermehl *et al.*, 1985a; Sharma y

Salunkhe, 1991) permitió asignar las estructuras correspondientes a Verrucarina A (1), Verrucarina J (2), Roridina A (3) y Roridina E (4) (Figura 8).

Los cuatro tricotecenos macrocíclicos presentan señales características para el anillo macrólido, destacándose las correspondientes a H-2, H-3 (a y b), H-4, H-10, H-11, H-13 (a y b), H-15 (a y b) y los grupos metilo de C-14 y C-16 (Tabla 4). Las resonancias correspondientes a los protones del sistema diénico (H-7', H-8', H-9' e H-10') son características de este tipo de compuestos. En las verrucarinas A y J, H-7' e H-10' aparecen como dos dobletes a  $\delta$  6,01 y 6,12 ppm (verrucarina A) y 5,97 y 6,07 ppm (verrucarina J). El H-9' aparece como un triplete a  $\delta$  6,6 ppm y el H-8' como un doble doblete a  $\delta$  8,0 ppm en ambas verrucarinas. Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  de las roridinas A y E se diferencian de los correspondientes a ambas verrucarinas en los valores de desplazamiento químico de H-8' (7,63 ppm- roridina A y 7,49 ppm- roridina E) y de H-10' (5,76 ppm- roridina A y 5,71 ppm- roridina E) y en la presencia de un doblete a  $\delta$  1,16 ppm correspondiente al grupo metilo de C-14.

La presencia de un grupo hidroxietilo ( $\text{CHOHCH}_3$ ) en las roridinas A y E, introduce dos señales adicionales en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Tabla 3) a  $\delta$  70,8 ppm (C-13') y 18,2 ppm (C-14'), las cuales no se observan en los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  de las verrucarinas A y J.

En los tricotecenos macrocíclicos que presentan un hidrógeno en C-3' (verrucarina A y roridina A) el metilo de C-12' aparece como un doblete a  $\delta$  0,85 ppm en la verrucarina A y  $\delta$  1,05 ppm en la roridina A.

En cambio, cuando la posición C-2'-C-3' está insaturada (roridina E y verrucarina J) el metilo de C-12' se presenta como un singulete a  $\delta$  2,2 ppm y en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Tabla 3) se observan dos señales adicionales a campos bajos correspondientes a C-2' (118,7 ppm en verrucarina J y 118,9 ppm en roridina E) y

C-3' (156,6 ppm en verrucarina J y 159,1 ppm en roridina E), las cuales no se observan en los espectros de la verrucarina A y la roridina A.

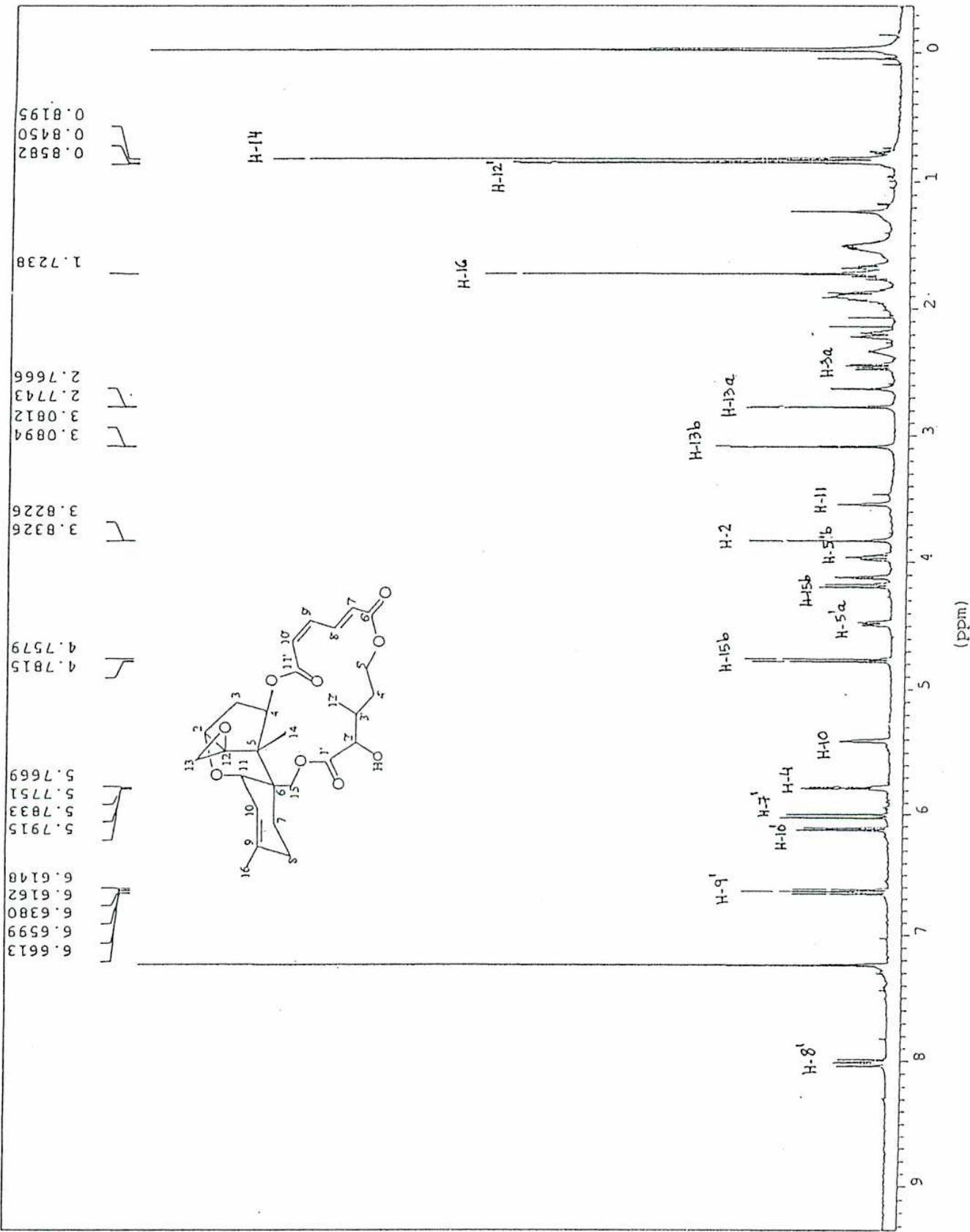
**Tabla 3.** Datos de RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ ,  $\delta$  en ppm) de Verrucarina A (1), Verrucarina J (2), Roridina A (3) y Roridina E (4).

C	1	2	3	4
2	78,9	79,1	79,0	79,2
3	34,9	35,2	34,8	35,8
4	74,2	75,4	74,3	74,2
5	49,5	48,9	49,3	48,4
6	44,2	43,1	43,8	42,7
7	20,0	20,8	20,2	21,6
8	27,5	27,7	27,7	27,7
9	141,1	140,4	140,9	140,2
10	117,9	118,2	118,2	117,8
11	66,9	67,3	67,2	67,2
12	65,2	65,2	65,2	65,6
13	47,8	48,1	47,7	48,1
14	7,3	7,0	7,5	6,7
15	63,5	63,4	64,5	63,7
16	23,3	23,2	23,3	23,2
1'	174,7	165,8	174,8	165,8
2'	75,5	118,7	75,6	118,9
3'	32,2	156,6	37,1	159,1
4'	33,1	40,2	33,1	41,2
5'	61,1	60,4	69,8	69,9
6'	166,1	165,8	84,0	83,9
7'	127,5	127,4	139,2	138,0
8'	138,9	139,5	126,1	126,6
9'	138,8	139,2	143,9	143,6
10'	125,8	125,6	117,5	117,2
11'	165,4	165,8	166,5	166,4
12'	10,0	17,2	14,7	20,3
13'	-	-	70,8	70,7
14'	-	-	18,2	18,2

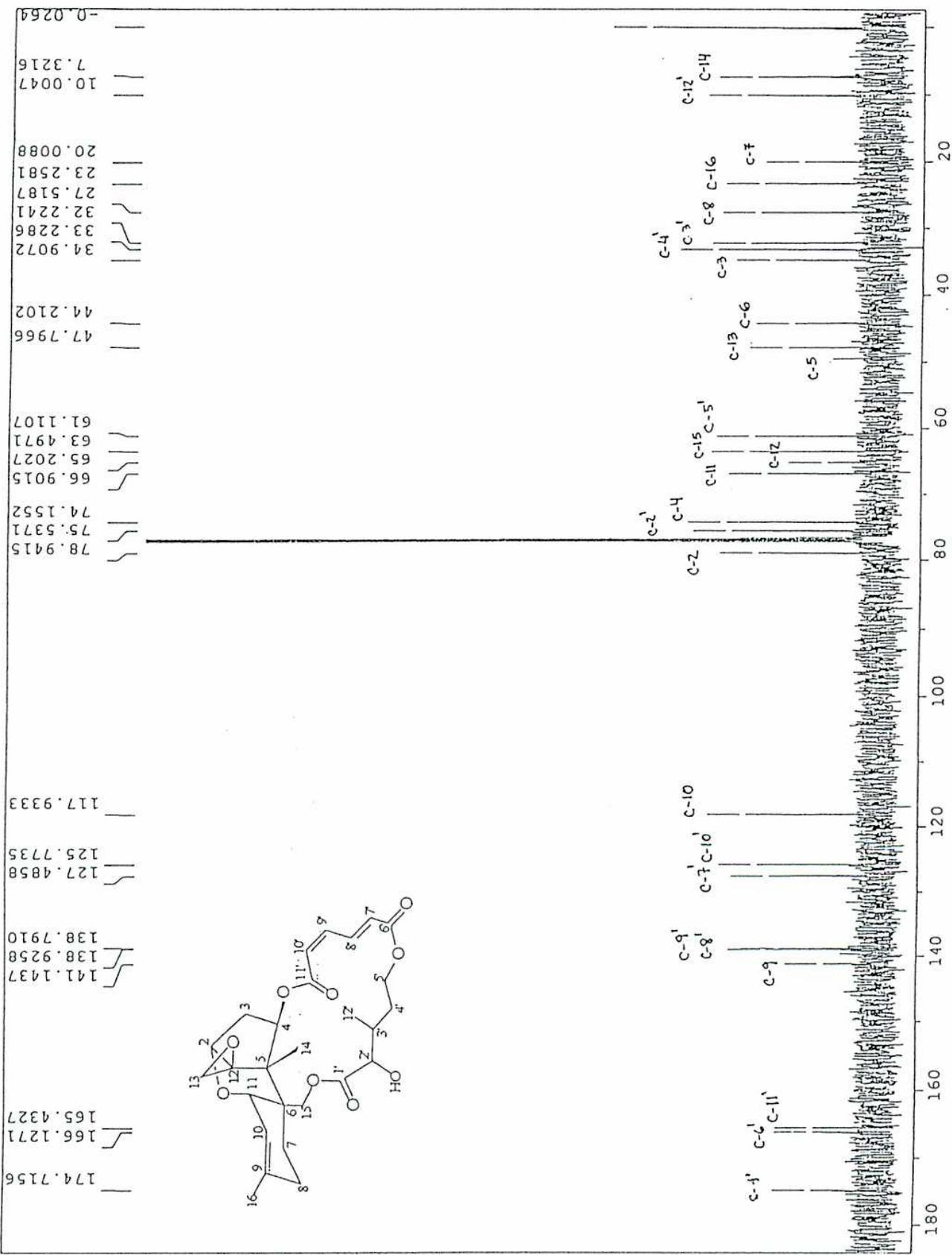
**Tabla 4.** Datos de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  en ppm) de Verrucarina A (1), Verrucarina J (2), Roridina A (3) y Roridina E (4).

H	1	2	3	4
2	3,83 d (5,3)	3,82 d (5,1)	3,81 d (5,0)	3,81 d (5,3)
3 a	2,20 dt (15,5;4,3)	2,13 dt (15,3;4,8)	2,18 dt (15,3;4,8)	2,22 m
3 b	2,45 dd (15,5;8,2)	2,45 m	2,41 dd (15,3; 8,2)	2,52 m
4	5,78 dd (8,2;4,1)	5,95 m	5,76 m	6,18 dd (8,2;3,9)
7	1,66 m	1,64 m	1,60 m	1,9-2,1 m
8	1,76 m	1,77 m	1,75 m	1,9-2,1 m
10	5,40 d (4,4)	5,42 d (4,4)	5,39 d (4,4)	5,44 d (5,5)
11	3,54 da (5,3)	3,73 da (5,1)	3,56 (5,4)	3,82 da (5,5)
13 a	2,77 d (3,9)	2,80 d (4,0)	2,76 d (4,1)	2,78 d (4,1)
13 b	3,09 d (4,1)	3,10 d (4,0)	3,08 d (4,1)	3,10 d (4,1)
14	0,82 s	0,80 s	0,77 s	0,76 s
15 a	4,18 d (12,1)	3,95 (12,8)	4,40 s	3,91 d (12,5)
15 b	4,77 d (12,1)	4,38 (12,8)		4,28 d (12,5)
16	1,72 s	1,69 s	1,70 s	1,68 s
2'	4,12 dd (7,1;1,6)	5,8 sa	4,06 sa	5,93 sa
3'	2,62 d (7,3)	-	2,0 m	-
4'	1,90 m	2,48 m	1,85 m	2,50 m
5'a	4,48 m	4,43 m	3,50 m	3,50-3,70 m
5'b	3,96 td (11,9;3,4)	4,13 m		3,50-3,70 m
6'	-	-	3,50 m	3,50-3,70 m
7'	6,01 d (15,8)	5,97 d (15,9)	5,96 dd (15,5;3)	5,87 dd (15,5;3)
8'	8,00 ddd (15,7;11,6;0,9)	8,00 dd (15,9;11,6)	7,63 dd (15,5;11,6)	7,49 dd (15,7;11,4)
9'	6,64 t (11,2)	6,58 t (11,2)	6,61 t (11,4)	6,54 t (11,4)
10'	6,12 d (11,2)	6,07 d (10,9)	5,76 d (10,5)	5,71 d (11,4)
12'	0,85 d (6,6)	2,25 s	1,05 d (6,9)	2,23 s
13'	-	-	3,61 m	3,50-3,70 m
14'	-	-	1,16 d (6,2)	1,16 d (6,2)

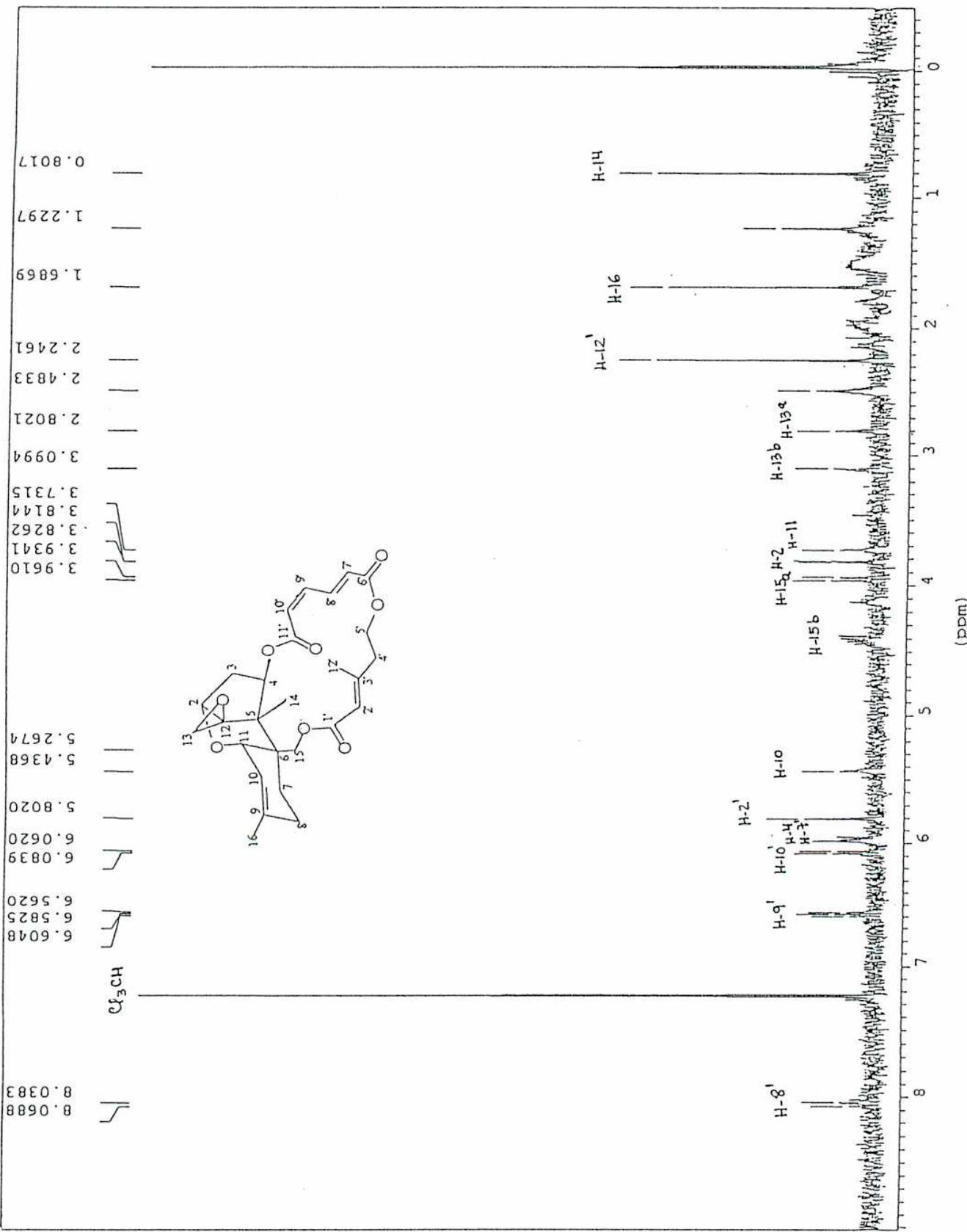
-d: doblete, da: doblete ancho, dd: doblete doblete, dt: doblete triplete, ddd: triplete doblete, t: triplete, m: multiplete, s: singulete.



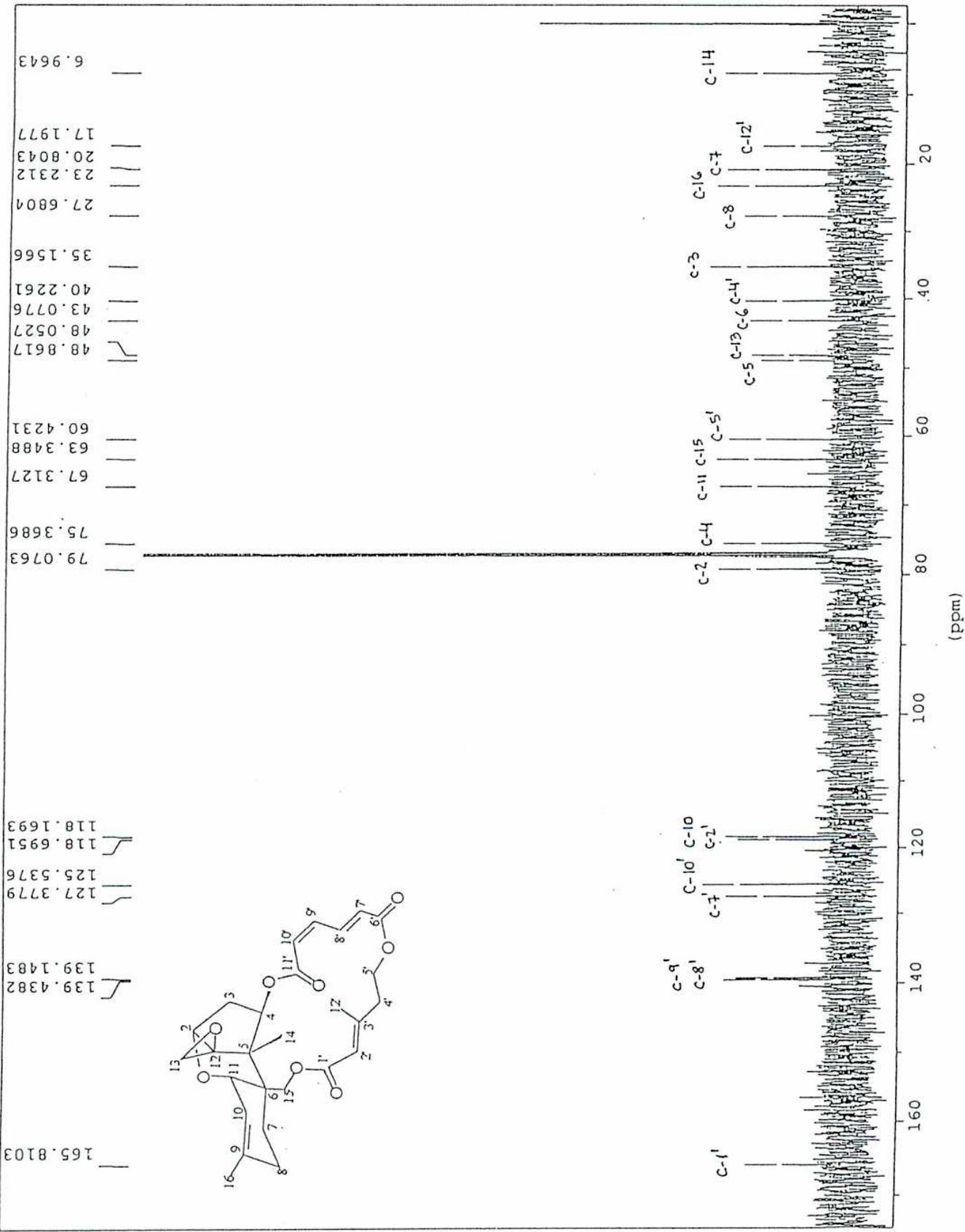
VERRUCARINA A RMN13C

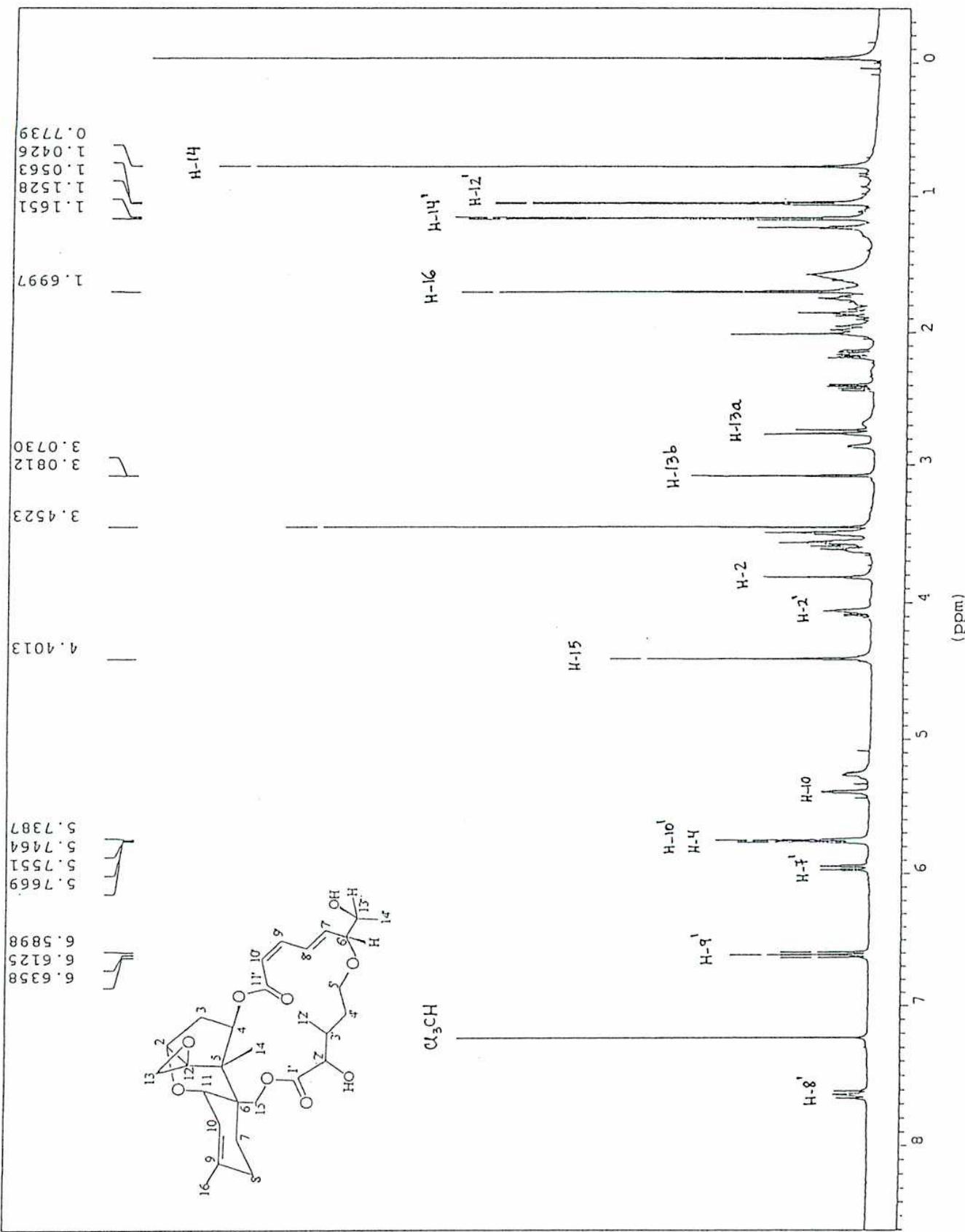


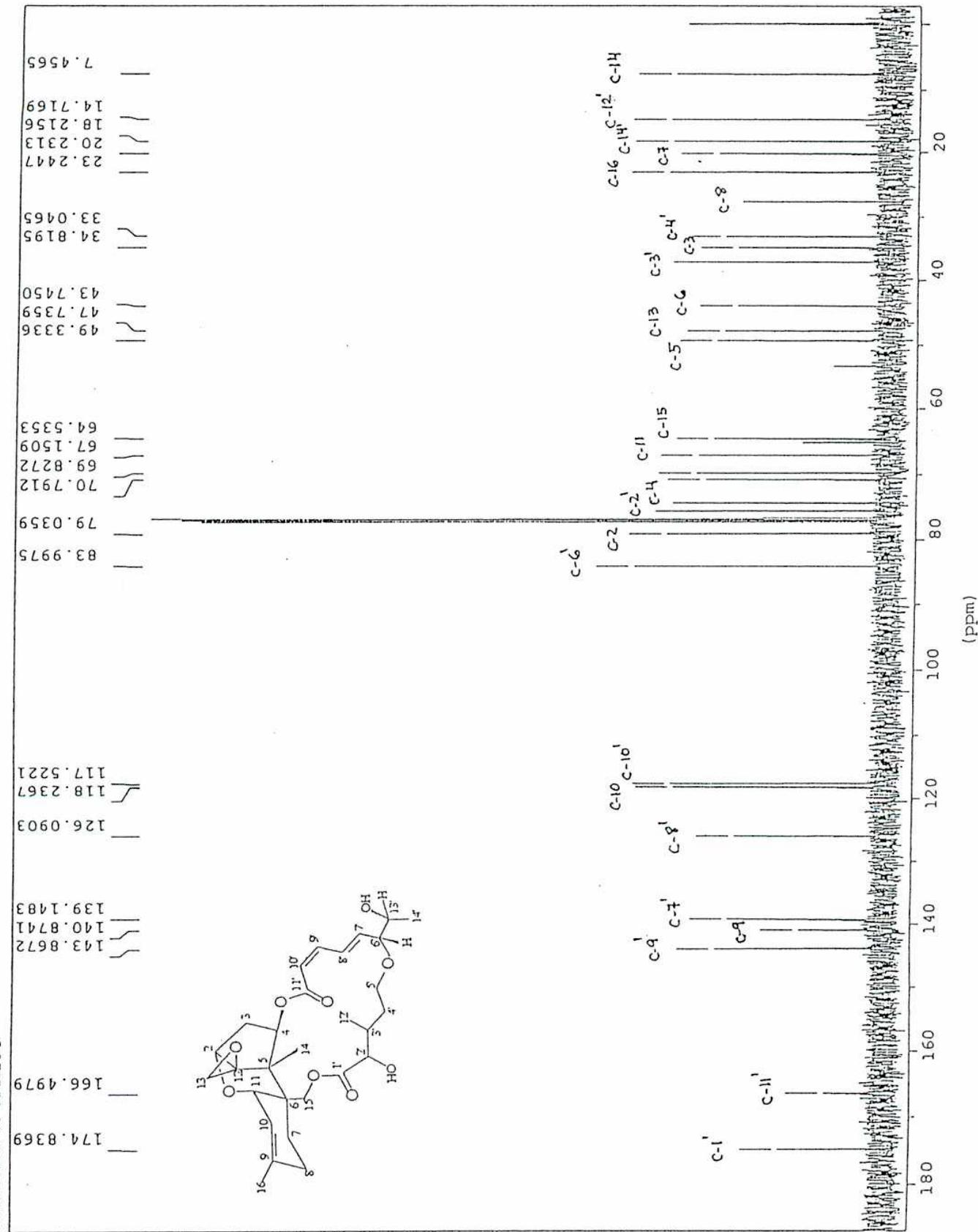
VERRUCARINA J RMNH



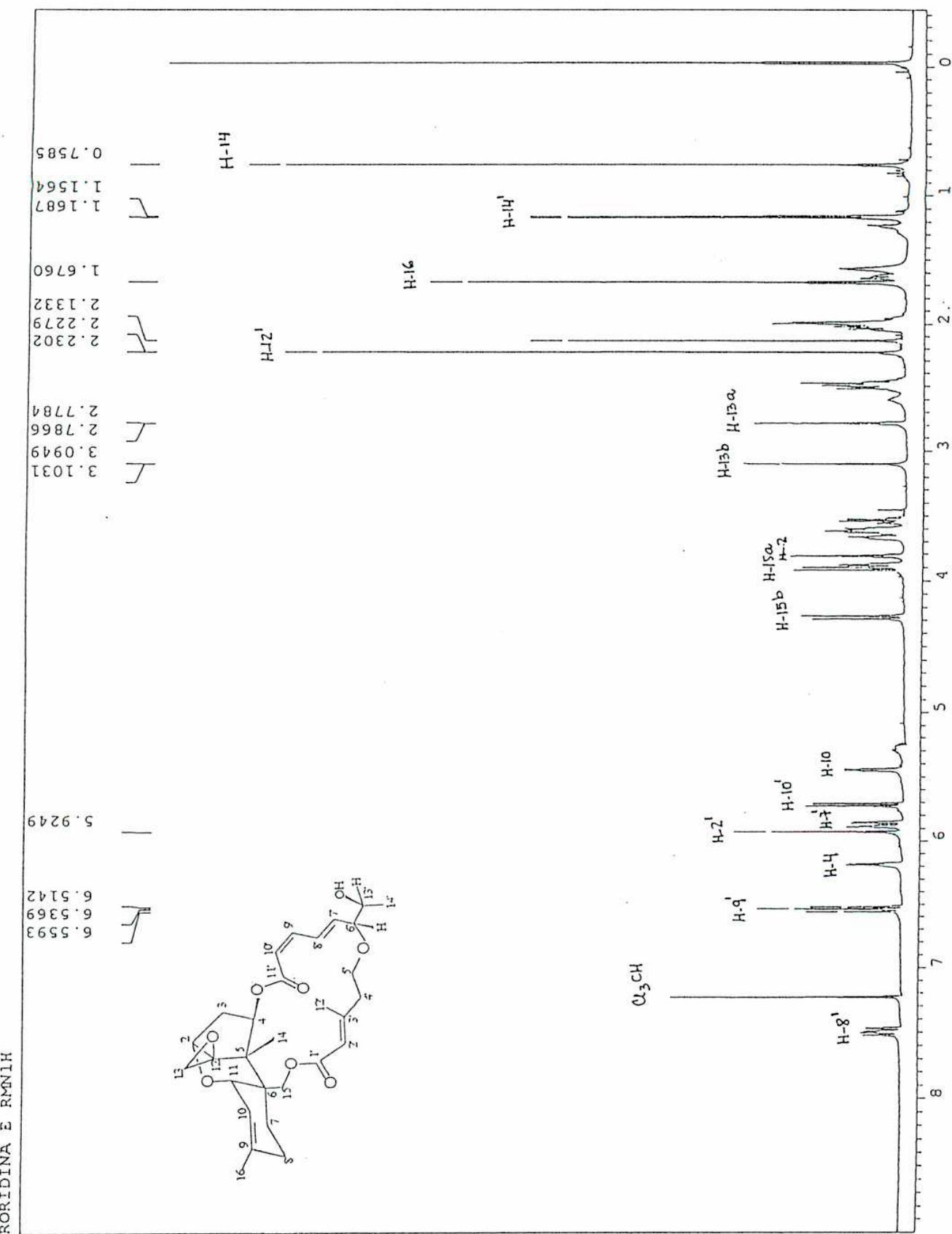
VERRUCARINA J RMN 13C

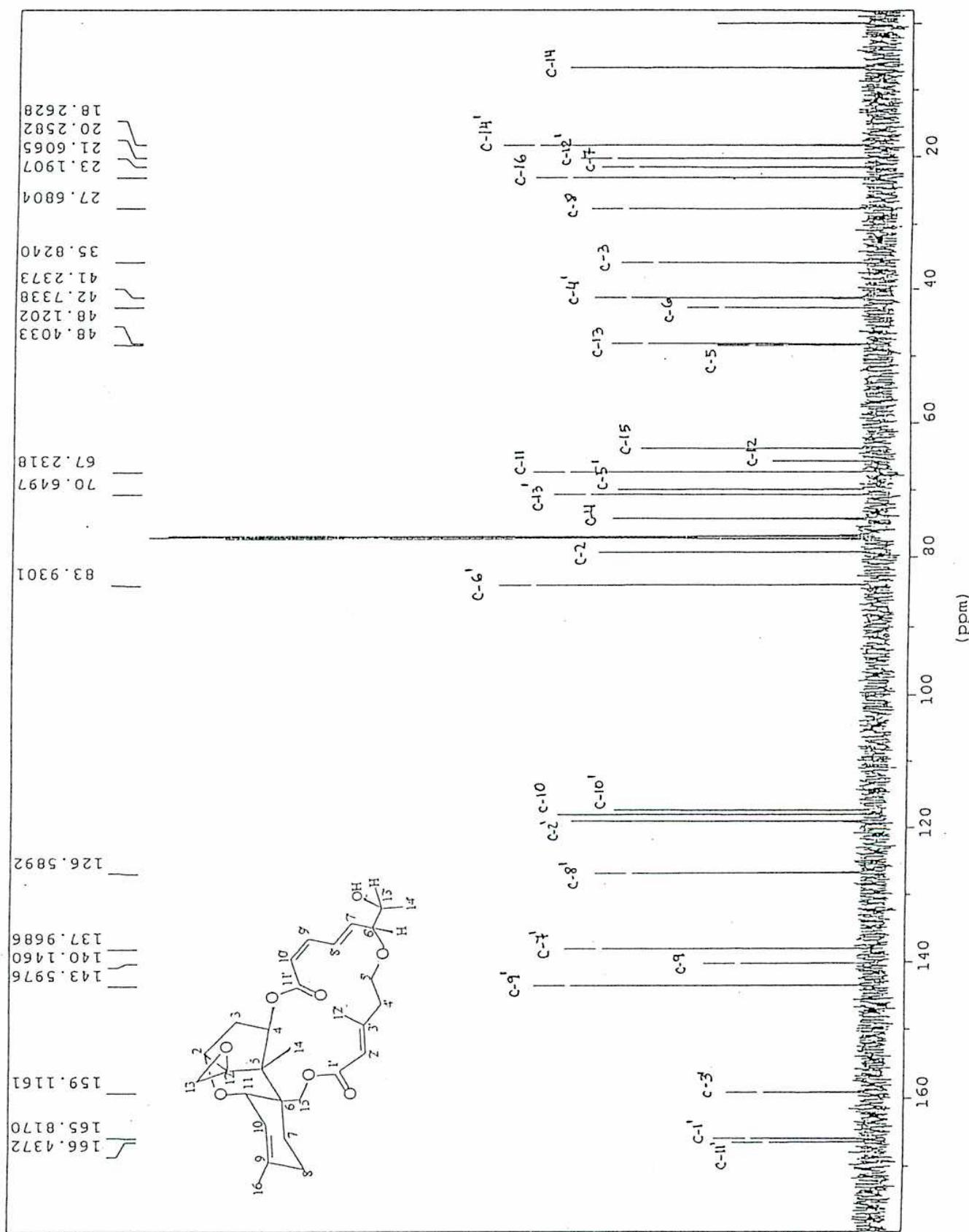






RORIDINA A RMN13C





## ***Discusión***

En 1997 se determinó que el epibionte fúngico de *Baccharis coridifolia* pertenece al orden Hypocreales (Bertoni *et al.*), como los epibiontes asociados a meristemas *Myriogenospora atramentosa*, *Atkinsonella hypoxylon*, *A. texensis*, *Balansia cyperi*, *B. pilulaeformis* y *B. pallida* de la familia Clavicipitaceae. Estos últimos producen toxinas que causan enfermedades al ganado que consume pastos infectados (Bacon *et al.*, 1986; Clay y Hammond, 1985; Clay, 1986). Esta asociación se considera mutualista ya que las plantas son resistentes a mamíferos herbívoros, insectos y hongos patógenos gracias a los compuestos producidos por el epibionte. También pertenecen al orden Hypocreales *Fusarium*, *Myrothecium* y *Stachybotrys* que son productores de tricotecenos (Sharma and Slunke, 1991).

El presente trabajo de investigación determinó que el epibionte de *B. coridifolia* produce los mismos tricotecenos macrocíclicos que los hallados en las plantas: roridinas A, E y verrucarinas A, J. La localización del epibionte en los meristemas lo ubica en una posición ideal para la colonización de las partes maduras de la planta como por ejemplo las hojas, tallos, flores y semillas. Como ya mencionamos en la introducción, éstas son las zonas de la planta que resultan tóxicas para el ganado y donde fueron detectados los tricotecenos macrocíclicos.

La posición del epibionte en los meristemas, su capacidad de producir los mismos tricotecenos macrocíclicos que se detectaron en las plantas, y los antecedentes de epibiontes productores de toxinas en pastos, apoyan la hipótesis inicial de que este epibionte establecería una relación **mutualista** con *Baccharis coridifolia*, porque:

- La planta se vería favorecida en la resistencia a herbívoros, insectos y patógenos gracias a los tricotecenos macrocíclicos producidos por el epibionte, tóxicos para todos los organismos eucariotas.
- El epibionte estaría favorecido por la ubicación y protección en el meristema, que le facilita la captación de nutrientes, y por una diseminación

eficiente, ya que el epibionte fue aislado de las plantas en distintas épocas del año y de distintas poblaciones, en un porcentaje que varía entre un 30-85% (Bertoni *et al.*, 1997; el presente trabajo).

De acuerdo al análisis de los tricotecenos macrocíclicos en *Baccharis coridifolia*, resulta que la mayor concentración de toxinas en la planta se halla especialmente en la pared del aquenio y en el endosperma (Jarvis *et al.*, 1988 a; b; 1991). La pared del aquenio sería posiblemente la zona de la semilla colonizada por el epibionte debido a las condiciones favorables de humedad y nutrientes en el interior de capítulo (Dr. Palacios, com. pers.). Si bien se observaron hifas fúngicas en la pared de aquenio y en los pelos del papus, los ensayos para aislar el epibionte de *B. coridifolia* a partir de la pared del aquenio, papus y semillas fracasaron por la alta concentración que éstos poseen de hongos oportunistas de crecimiento rápido (Dra. Bertoni com. pers.). Si el epibionte se encuentra en la pared del aquenio y en zonas adyacentes, de allí podría colonizar nuevos meristemas cuando germinan las semillas y se inicia la plántula.

Si, por otra parte, del análisis genético de *B. coridifolia* resultara que la planta posee genes para la síntesis de tricotecenos macrocíclicos, quedaría por preguntarse: ¿cuál sería el sentido de la existencia de un epibionte fúngico productor de estas toxinas en los meristemas de la planta de *Baccharis coridifolia*? ¿Sería productor y a la vez resistente a las toxinas como para vivir en los meristemas de la planta?

En este sentido, por ejemplo: *Myrothecium verrucaria* es productor de tricotecenos macrocíclicos y a la vez resistente a las toxinas. Esta resistencia puede deberse a la ausencia del sitio de unión de los ribosomas con los

tricotecenos (Hobden and Cunliffe, 1980) o podría ser que las toxinas se secuestren en unidades subcelulares (Jarvis *et al.*, 1987a).

De acuerdo a lo anterior, que el epibionte sea productor de tricotecenos macrocíclicos, lo haría resistente para vivir en una planta que tiene estas toxinas.

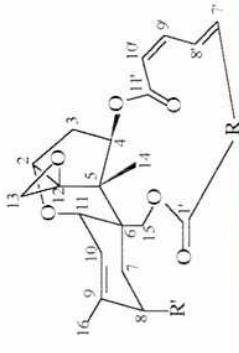
## *Conclusiones*

- ❖ El epibionte fúngico de *Baccharis coridifolia* produce tricotecenos macrocíclicos: **Verrucarinas A y J y Roridinas A y E.**
- ❖ Estos tricotecenos macrocíclicos son los mismos que los hallados en las plantas de *Baccharis coridifolia* (mío- mío o romerillo).
- ❖ El epibionte se localiza en los meristemas, posición ideal para colonizar todas las partes maduras de la planta donde se detectaron las toxinas: hojas, tallos, flores y semillas.
- ❖ Considerando los antecedentes de la asociación epibiontes fúngicos - pastos, sugerimos que el epibionte fúngico de *Baccharis coridifolia* establecería una relación **mutualista** con la planta porque:
  - La planta estaría favorecida en la resistencia a herbívoros, insectos y hongos patógenos gracias a los tricotecenos macrocíclicos producidos por el epibionte fúngico, tóxicos para todos los organismos eucariotas.
  - El epibionte estaría favorecido por la ubicación en los meristemas, debido a que le confiere mayor protección que el estar expuesto en las hojas maduras, facilitando la captación de nutrientes, y posibilitaría su diseminación eficiente.

## *Anexo*

**Tabla 1.** Estructura de algunas verrucarinas y roridinas.

Nombre	R	Organismos Productores	Referencias
Verrucarina A	CHOHCHCH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OOC=O	MV <sup>1</sup>	Tamm, 1974
Verrucarina B	CH=CCH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OOC=O O	MR <sup>2</sup> , MV, SA <sup>3</sup>	Tamm, 1974; Breitenstein <i>et al.</i> , 1979, Croft <i>et al.</i> , 1984
Verrucarina J	CH=CCH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OOC=O	MR, MV, SA	Tamm, 1974; Croft <i>et al.</i> , 1986
Roridina A	CHOHCHCH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH(CHOHCH <sub>3</sub> )	MR, MV	Tamm, 1974; Jarvis <i>et al.</i> , 1982b
Roridina D	CH=CCH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH(CHOHCH <sub>3</sub> )	MR, MV	Tamm, 1974; Jarvis <i>et al.</i> , 1982b
Roridina E	CH=CCH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH(CHOHCH <sub>3</sub> )	MR, MV, SA	Tamm, 1974; Still <i>et al.</i> , 1984
Roridina H	CH=CCH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH(OCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	MR, MV, C <sup>4</sup>	Tamm, 1974; Matsumoto, 1979
Roridina J	CH=CCH <sub>3</sub> CHOHCH(OCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	MV	Jarvis <i>et al.</i> , 1980



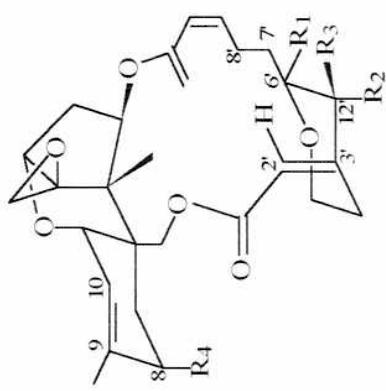
<sup>1</sup> MV: *Myrothecium verrucaria*

<sup>2</sup> MR: *Myrothecium roridum*

<sup>3</sup> SA: *Stachybotrys atra*

<sup>4</sup> C: *Cylindrocarpon*

**Tabla 2.** Estructura de Satratoxinas y compuestos relacionados.



Nombre	7', 8'	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	Organismos Productores	Referencias
Satratoxina F	C=C	COCH <sub>3</sub>	OH	H	H	SA <sup>1</sup>	Eppley <i>et al.</i> , 1980
Satratoxina G	C=C	CHOHCH <sub>3</sub>	OH	H	H	SA	Eppley <i>et al.</i> , 1980
Satratoxina H	C=C	CHOHCH <sub>3</sub>	OH	H	H	SA	Eppley <i>et al.</i> , 1977
Mitoxina A	-	COCH <sub>3</sub>	OH	H	H	MR <sup>2</sup>	Jarvis <i>et al.</i> , 1986
Mitoxina C	-	COCH <sub>3</sub>	H	OH	H	MR	Jarvis <i>et al.</i> , 1986
Mitoxina B	-	COCH <sub>3</sub>	OH	H	H	MR	Jarvis <i>et al.</i> , 1986
Mirotoxina A	-	-	OH	H	H	MR	Jarvis <i>et al.</i> , 1986; 1985 a
Mirotoxina B	-	-	OH	H	OA <sup>c</sup>	MR	Jarvis <i>et al.</i> , 1986; 1985 a
Mirotoxina C	-	-	-	OH	H	MR	Jarvis <i>et al.</i> , 1986

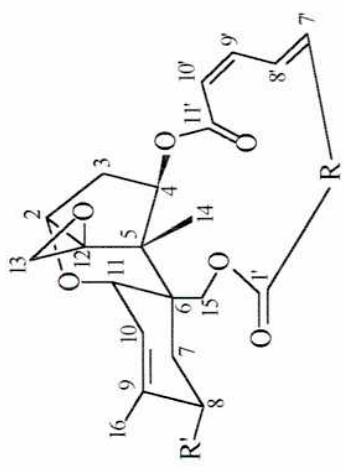
Mirotoxina D	-	H	OH	OAc	MR	Jarvis <i>et al.</i> , 1986
Vertisporina	-	CH(OH)CH(OH)O	H	H	VD <sup>3</sup>	Minato <i>et al.</i> , 1975
Roritoxina A	C=C	CH(OH)CH(OH)O	H	H	MR	Jarvis and Yatawara, 1986
Roritoxina B	C=C	CH(OH)CH(OH)O	H	H	MR	Jarvis and Yatawara, 1986
Roritoxina D	C=C	CH(OH)C(O)O	H	H	MR	Jarvis and Yatawara, 1986
Roritoxina C	C=C	CH(OH)C(O)O	H	H	MR	Jarvis and Yatawara, 1986

<sup>1</sup> *Stachybotrys atra*

<sup>2</sup> *Myrothecium roridum*

<sup>3</sup> *Verticimonosporium diffractum*

**Tabla 3.** Estructura de Tricotecenos Macrocíclicos en plantas<sup>1</sup>.



Nombre	R	R'	Referencias
Bacarinoide B1	$\text{CH}_2\text{CHCH}_3\text{CHOHCH}_2\text{OCH}(\text{CHOHCH}_3)$	OH	Jarvis <i>et al.</i> , 1987 a
B2	$\text{CH}_2\text{CHCH}_3\text{CHOHCH}_2\text{OCH}(\text{CHOHCH}_3)$	OH	Jarvis <i>et al.</i> , 1987 a
B3	$\text{CHOHCHCH}_3\text{CH}_2\text{OCH}(\text{CHOHCH}_3)$	OH	Jarvis <i>et al.</i> , 1987 a
B7	$\text{CHOHCHCH}_3\text{CH}_2\text{OCH}(\text{CHOHCH}_3)$	OH	Jarvis <i>et al.</i> , 1987 a
B4	$\text{CH-CCH}_3\text{CHOHCH}_2\text{OCH}(\text{CHOHCH}_3)$	OH	Kupchan <i>et al.</i> , 1977
B6	$\text{CH}-\text{CCH}_3\text{CHOHCH}_2\text{OCH}(\text{CHOHCH}_3)$	OH	Kupchan <i>et al.</i> , 1977
B5	como en B4	H	Kupchan <i>et al.</i> , 1977
B8	como en B6	H	Kupchan <i>et al.</i> , 1977
B9	$\text{CH=CCH}_3\text{CHOHCH}_2\text{OCH}(\text{CHOHCH}_3)$	H	Jarvis <i>et al.</i> , 1987 b
B10	$\text{CH=CCH}_3\text{CHOHCH}_2\text{OCH}(\text{CHOHCH}_3)$	H	Jarvis <i>et al.</i> , 1987 b
B13	como en B9	OH	Jarvis <i>et al.</i> , 1987 b
B14	como en B10	OH	Jarvis <i>et al.</i> , 1987 b



B12	$\text{H}$	
B21	$\text{OH}$	como en B12
B17	$\text{H}$	como en B12
B20	$\text{H}$	como en B2
B23	$\text{H}$	como en B1
B24	$\text{H}$	como en B2
B16	$\text{H}$	como en B14
B25	$\text{CH}=\text{CCH}_3\text{CHOHCH}_2\text{OC=O}$	
B27	$\text{OH}$	como en B14
Miotoxina A	$\text{H}$	como en B13
Miotoxina B	$\text{H}$	$\text{CH}_2\text{CHCH}_3\text{C(O)CH}_2\text{OCH}(\text{CHOHCH}_3)$
Miotoxina C	$\text{H}$	$\text{CH}_2\text{CCH}_3(\text{OH})\text{CHOHCH}_2\text{OCH}(\text{CHOAcCH}_3)$
Isomiotoxina D	$\text{H}$	como en B1
Miotoxina D	$\text{H}$	como en Isomiotoxina D pero epimérico en el C3'

<sup>1</sup> Bacarínoïdes de *Baccharis megapotamica* y miotoxinas de *Baccharis coridifolia*

## *Bibliografía*

- Anderson, D. W., Ashton, A. R., Black, R. M., Leigh, D. A., Slawin, A. M. Z., Stoddart, J. F., and Williard, D. J. 1988. The complexation properties of some and unnatural macrocyclic trichothecenes. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 904.
- Arreguine, V. (h). 1918. Contribución al estudio de *Baccharis coridifolia* D.C. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (Universidad de Buenos Aires). Buenos Aires.
- Arreguine, V. (h). 1918. Nota preliminar sobre el principio activo de *Baccharis coridifolia* D.C. Rev. Inst. Bacteriológico Dep. Nac. Hig. 1 (3). páginas:389.
- Bacon, C. W., P. C. Lyons, J. K. Porter and J. D. Robbins. 1986. Ergot toxicity from endophyte-infected grasses: a review. *Agronomy Journal* 78: 106.
- Bertoni, M. D., Romero, N., Reddy, P. V. and White, J. F. Jr. 1997. A hypocreal epibiont on meristems of *Baccharis coridifolia*. *Mycol. Res.* 89, 375.
- Breitenstein, W., Tamm, C., Arnold, E. V., and Clardy, J. 1979. Verrucarins and roridins. 36, the absolute configuration of the fungal metabolite verrucarin B. Biosynthetic consequences. *Helv. Chem. Acta* 62: 2699.
- Burkart, A. 1974. Flora ilustrada de Entre Ríos (Argentina). Colección Científica INTA, VI.
- Clay, K. 1984. The effects of the fungus *Atkinsonella hypoxylon* (Clavicipitaceae) on the reproductive system and demography of the grass *Danthonia spicata*. *New Phytol.* 98: 165.
- Clay, K. 1986. Grass endophytes. Pp. 188 - 204. In: *Microbiology of the phyllosphere*. Eds., N. J. Fokkema and J. van den Heuvel. Cambridge, London.
- Clay, K. and I. C. Frentz. 1993. *Balansia pilulaeformis*, an epiphytic species. *Mycología* 85: 527.

- Clay, K. and Frentz, Y. C. 1998. *Balansia pilulaeformis*, an epiphytic species. *Micología*. 85: 527.
- Clay, T. N., and A. M. Hammond, Jr. 1985. Fungal endophytes of grasses and their effects on an insect herbivore. *Oecologia* 66: 1.
- Clay, K. and J. P. Jones. 1984. Transmission of the fungus *Atkinsonella hypoxylon* (clavicipitaceae) by cleistogamous seed of *Danthonia spicata* (Gramineae). *Cand. J. Bot.* 62: 2893.
- Corely, D. G., Rottinghaus, G. E., Tracy, J. K., and Tempesta, M. S. 1986. New trichothecene mycotoxins of *Fusarium sporotrichioides* (MC-72083). *Tetrahedron Lett.* 27: 4133.
- Croft, W. A., Jarvis, B. B., and Yatawa, C. S. 1986. Airbone outbreak of trichothecene toxicosis. *Atmos. Environ.* 20: 549.
- Cundliffe, E., Cannon, M., and davis, J. 1974. Mechanism of inhibition of eukaryotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71: 30.
- Cutler, H. G., and Jarvis, B. B. 1985. Preliminary observations on the effects of macrocyclic trichothecenes on plant growth. *Environ. Exp. Bot.* 25: 115.
- Cutler, H. G., and LeFiles, J. H. 1978. Trichodermin: Effects on plants. *Plant Cell Physiol.* 19:177.
- Eppley, R. M., Mazzola, E. P., Highet, R. J. and Bailey, W. J. 1977. Structure of satratoxin H, a metabolite of *Stachybotrys atra*. Application of proton and carbon-13 nuclear magnetic resonance. *J. Org. Chem.* 42: 240.
- Eppley, R. M., Mazzola, E. P., Stack, M. E., and Reifress, P. A. 1980. Structures of satratoxin F and satratoxin G, metabolites of *Stachybotrys atra*: application of proton and carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Org. Chem.* 45: 2522.

- Feinberg, B. and McLaughlin, C. S. 1989. Biochemical mechanism of action of trichothecene mycotoxin. In Trichothecene Mycotoxicosis: Pathophysiologic Effects, Vol. I, Beasley, V. R., Ed., CRC Press, Boca Raton, Fl, 27.
- Flores, C. y Houssay, B. A. 1917. Estudios sobre mó-mó, nío o romerillo (*Baccharis coridifolia* D.C.). Rev. Inst. Bacteriológico Dep. Nac. Hig. 1 (1). páginas: 59.
- Freeman, G. G., and Morrison, R. I. 1948. Trichothecin: an antifungal metabolic product of *T. Roseum* Link. Nature 162: 30.
- Gallo, G. G. 1987. Plantas tóxicas para el ganado en el cono sur de América. Edit. Hemisferio Sur, 213 pp..
- Greenhalgh, R., Blackwell, B. A., and Savard, M. E. 1989. The nmr spectra of trichothecenes and related fungal metabolites. Tetrahedron 45: 2373.
- Habermehl, C., L. Busan, P. Heydel, D. Mebs, C. Torkania, J. Dobereiner, and Spraul. 1985a. Macroyclic trichothenes: Cause of livestock poisoning by the Brazilian plant *Baccharis coridifolia*. Toxicon 23: 731.
- Habermehl, G. G., Busan, L., and Spraul, M. 1985b. Miotoxin D and isomiotoxin D, two new macrocyclic trichothecenes from *Baccharis coridifolia* DC. Liebigs Ann. Chem., 633.
- Habermehl, G. G., and Busam, L. 1984. Miotoxin B and C, two new macrocyclic trichothecenes from *Baccharis coridifolia* DC. Liebigs Ann. Chem. 1746.
- Habermehl, G. G., Bausan, L., and Stegemann, J. 1984. Micotoxin-A: a novel macrocyclic trichothecene from the Brazilian plant *Baccharis coridifolia*. Z. Naturforsch. 39c: 212.

- Hobden, A. N., and Cundliffe, E. 1980. Ribosomal resistance to the 12,13-epoxytrichothecene antibiotics in the producing organism *Myrothecium verrucaria*. Biochem. J. 190: 765.
- Isaka, M., Punya J., Lertwerawat Y., Tanticharoen, M., and Thebtaranonth, Y. 1999. Antimalarial activity of macrocyclic trichothecenes isolated from the fungus *Myrothecium verrucaria*. J. Nat. Prod. 62: 329.
- Jarvis, B. B., S. Cömezoglu, H. Ammon, C. Breedlove, R. Miller, M. Woods, D. Streelman, A. Sneden, R. Dailey, and S. Kupchan. 1987a. New macrocyclic trichothecenes from *Baccharis megapotamica*. J. Natr. Products 50: 815.
- Jarvis, B. B., Cömezoglu, F. T., Lee, Y. W., Flippen- Anderson, J. L., Gilardi, R. D., and George, C. F. 1986. Novel macrocyclic trichothecenes from *Myrothecium roridum*. Bull. Soc. Chim. Belg. 95: 681.
- Jarvis, B. B., Cömezoglu, S. N., Rao, M. M., Pena, N. B., Boettner, F. E., Tara, Williams, M., Forsyth, G., and Epling, B. 1987b. Isolation of macrocyclic trichothecenes from a large scale extract of *Baccharis megapotamica*. J. Org. Chem. 52: 45.
- Jarvis, B. B., Kuti, J. O., and Bean, G. A. 1988 a. Phytotoxicity of macrocyclic trichothecenes toward *Baccharis* cell lines. Proc. Jpn. Assoc. Mycotoxicol. 1: 199.
- Jarvis, B. B., Lee, Y. W., Cömezoglu, F. T., Cömezoglu, S. N., and Bean, G. A. 1985a. Myrotoxins, a new class of macrocyclic trichothecenes. Tetrahedron Lett. 26: 4859.
- Jarvis, B. B., and Mazzola, E. P. 1982a. Macrocylic trichothecenes: their structure, synthesis, and biological significance. Acc. Chem. Res. 15: 388.

- Jarvis, B., J. Midiwo, G. Bean, M. Aboul-Nasr, and C. Barros. 1988 b. The mystery of trichothecene antibiotics in *Baccharis* species. *J. Nat. Prod.* 51: 736.
- Jarvis, B. B., Midiwo, J. O., Flippen-Anderson, J. L., and Mazzola, E. P. 1982b. Stereochemistry of the roridins. *J. Nat. Prod.* 45: 440.
- Jarvis, B. B., N. Mokhatari-Rejali, E. P. Schenkel, C. S. Barros & N. Y. Matzenbacher. 1991. Trichothecene mycotoxins from Brazilian *Baccharis* species. *Phytochemistry* 30: 789.
- Jarvis, B. B., Pavanarasivam, G., and Bean, G. A. 1985b. Mycotoxin production from *Myrothecium* species. In *Trichothecenes and others mycotoxins*, Lacey, J., Edit., John Wiley and Sons, London, 221.
- Jarvis, B. B., Stahly, G. P., Pavanarasavam, G., and Mazzola, E. P. 1980. Structure of roridin J, a new macrocyclic trichothecene from *Myrothecium verrucaria*. *J. Antibiot.* 33: 256.
- Jarvis, B. B., Wang, S., Rao, M. M., Philip, V., Varaschin, M. S., Barros, C. S. 1996. Brazilian *Baccharis* toxins: livestock poisoning and the isolation of macrocyclic trichothecene glucosides. *Nat. Toxins*, 4 (2): 58.
- Jarvis, B. B., K. Wells, Y. Lee, G. Bean, T. Kommedahl, C. Barros, and S. Barros. 1987c. Macrocylic trichothecenes mycotoxins in Brazilian species of *Baccharis*. *Phytopathol.* 77: 980.
- Jarvis, B. B., and Yatawara, C. S. 1986. Roritoxins new macrocyclic trichothecene from *Myrothecium roridum*. *J. Org. Chem.* 51: 2906.
- Kishaba, A. N., Sankland, D. L., Curtis, R. W., and Wilson, M. C. 1962. Substances inhibitory to insect feeding with insecticidal properties from fungi. *J. Econ. Entomol.* 52: 211.

- Kupchan, S., B. Jarvis, R. Dailey, Jr., W. Bright, R. Bryan, and Y. Shizuri. 1976. Baccharin, a novel potent antileukemic trichothecene triepoxide from *Baccharis megapotamica*. *J. Amer. Chem. Soc.* 99: 7092.
- Kupchan, S., D. Streelman, B. Jarvis, R. Dailey, and A. Sneden. 1977. Isolation of potent new antileukemic trichothecene from *Baccharis megapotamica*. *J. Org. Chem.* 42: 4221.
- Kuti, J.O., Jarvis, B. B., Mokhtari-Rejali, N. and Bean, G. 1990. Allelochemical regulation of reproduction and seed germination of two Brazilian *Baccharis* species by phytotoxic trichothecenes. *J. Chem. Ecol.* Vol 16 (12): 3441.
- Latch, G. C. M., W. F. Hunt, and D. R. Musgrave. 1985. Endophytic fungi affect growth of perennial ryegrass. *N. Z. J. Agric. Res.* 28: 165.
- Leuchtman, A., and K. Clay. 1988a. *Atkinsonella hypoxylon* and *Balansia cyperi*, epiphytic members of the Balansiae. *Mycología* 80: 192.
- Leuchtman, A., and Clay, K. 1988b. Experimental infection of host grasses and sedges with *Atkinsonella hypoxylon* and *Balansia cyperi* (Balansiae, Clavicipitaceae). *Mycología* 80: 291.
- Leuchtman, A., and K. Clay. 1989. Morphological, cultural and mating studies on *Atkinsonella* including *A. texensis*. *Mycología* 81: 692.
- Luttrell, E. S., and C. W. Bacon. 1977. Classification of *Myriogenospora* in the Clavicipitaceae. *Cand. J. Bot.* 55: 2090.
- McLaughlin, C. S., Vaughn, M. H., Campbell, J. M., Wei, C. M., Stafford, M. E., Hansin, B. S. 1977. Inhibition of protein synthesis by trichothecenes. In: Rodricks HV, Hesseltine CW, Mehlman MA (eds) *Mycotoxins in human and animal health*. Pathotoxin Publishers, Park Forest, pp 263.

- Malagarriga Heras, R. D. P. 1976. Nomenclature *Baccharinarum* omnium. Men. Soc. Cienc. Nat. La Salle 37: 129.
- Matsumoto, M. 1979. Structures of isororidin E, Epoxyroridin H, and Diepoxyroridin H, new metabolites isolated from a Species of *Cylindrocarpon*. J. Sci. Hiroshima Univ. A43: 107.
- Mazzola, E. P. And Jarvis, B. B. 1987. Structure and characterization of trichothecenes. In Recent Advances in Organic NMR Spectroscopy, Lambert, J. B. and Rittner, R., Norell Press, Landisville, N. J., 152.
- McPhail, A. T., and Sim, G. A. 1966. Fungal metabolites. VI, Structure of verrucarin A: X-ray analysis of verrucarin A p-iodobenzene sulfonate. J. Chem. Soc. (C), 1394.
- Minato, H., Katayama, T., and Tori, K. 1975. Vertisporin, a new antibiotic of *Verticimonosporium diffractum*. Tetrahedron LeH. 16: 2579.
- Monticelli, J. V. 1941. Diario "La Nación". Buenos Aires, Argentina. pág. 20.
- Murray, Ch. 1862. Notas sobre el mío-mío. Rev. Farm. 5 (3), página: 25.
- Nesheim, S., and Trucksess, M. W. 1987. Thin-layer chromatography/ high performance thin-layer chromatography as a tool for mycotoxin determination. In Modern Methods in the Analysis and Structural Elucidation of Mycotoxins. Cole, R. J., Ed., Academic Press, New York, 240.
- Nesom, G. 1988. *Baccharis monoica* (Compositae: Asterae), a monoecious species of the *Baccharis salicifolia* complex from Mexico and Central America. Phytologia 65: 160.
- Okazaki, K., Kimura, S., and Yoshizawa, T. 1988. Antiviral activity of T-2 Toxin and related compounds against Herpes simplex virus Type 2 in vitro. Proc. Jpn. Assoc. Mycotoxicol. 28: 11.

- Okazaki, K., Yoshizawa, T., and Kimura, S. 1989. Antiviral activity of macrocyclic trichothecene mycotoxins and related compounds baccharinoids B-4 and B-5 against Herpes simplex virus Type 2. *Agric. Biol. Chem.* 53: 1441.
- Read, J. C., and B. J. Camp. 1986. The effect of fungal endophyte *Acremonium coenophialum* on animal performance, toxicity, and stand performance. *Agron. J.* 78: 848.
- Reggs, M., Viggiano, M., Rondina, R. V. D., Coussio, J. D., Stéfano, F. J. E. 1984. Procedimientos para la determinación de la toxicidad de *Baccharis coridifolia* (Compositae). *Rev. Invest. Agrop. INTA*. Vol. XIX (3): 265.
- Rykard, D. M., C. W. Bacon, and E. S. Luttrell. 1985. Host relations of *Myriogenospora atramentosa* and *Balansia epichoë* (Clavicipitaceae). *Phytopathology* 75: 1095.
- Samples, D., Hill, D. W., Bridges, C. H., and Camp, B. J. 1984. Isolation of mycotoxin (rоридин A) from *Phomopsis* ssp. *Vet. Hum. Toxicol.* 26: 21.
- Sanson, D. R., Corley, D. G., Barnes, C. L., Searles, S., Schlemper, E. O., Tempesta, M. S., and Rottinhaus, G. E. 1989. New mycotoxins from *Fusarium sambucinum*. *J. Org. Chem.* 54: 4313.
- Shepherd, M. J. 1986. High-performance liquid chromatography and its application to the analysis of mycotoxins. In *Modern Methods in the Analysis and Structural Elucidation of Mycotoxins*, Cole, R. J., Ed., Academic Press, Orlando, Fl, 293.
- Sharma, R. P., and D. K., Salunkhe. 1991. *Mycotoxins and phytoalexins*. CRC Press, Boca Raton, Florida. 800 pp..

- Smith, K. T., Bacon, C. W., Luttrell, E. S. 1984. Reciprocral translocation of carbohydrates between host and fungus in Bahiagrass infected with *Myriogenospora atramentosa*. *Phytopathology* 75 (4): 407.
- Still, W. C., Gennari, C., Noguez, J. A., and Pearson, D. A. 1984. Synthesis of macrocyclic trichothecanoids: baccharin B5 and roridin E. *J. Am. Chem. Soc.* 106: 260.
- Tamm, C. I. 1974. The antibiotic complex of the verrucarins and roridins. *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* 31: 63.
- Teodoro-Luis, Y. 1955. Porque hay en América del Sur dos centros de expansión de las *Baccharidinae*. *Contr. Inst. Geobiol. (Brazil)* 5: 1.
- Tokarnia, C. and J. Döbereiner. 1976. Intoxicacao experimental em ovinos por "mio- mio", *Baccharis coridifolia*. *Pesq. Agropec. Brasil, Ser. Vet.* 11: 19.
- Trapp, S. C., Hohn, T. M., McCormick, S. and Jarvis, B. B. 1998. Characterization of the gene cluster for biosynthesis of macrocyclic trichothecenes in *Myrothecium roridum*. *Mol Gen Genet.* 257 (4): 421.
- Turner, W. B., and Aldridge, D. C. 1983. *Fungal metabolites*, Vol. II, Academic Press, New York, 236.
- Ueno, Y. 1983. *Trichothecene: Chemical, Biological, and Toxicological Aspects*. Kodansa Press, Tokyo. p. 313.
- White, J. F. 1993. Endophyte host associations in grasses. XIX. A Systematic study of some sympatric species of *Epichloë* in England. *Mycología* 85: 444.
- White, J. F., and J. R. Owens. 1992. Stromal development and mating system of *Balansia epichoë*, a leaf-colonising endophyte of warm- season grasses. *Appl. Environn. Microbiol.* 58: 513.



Tesista  
María Luciana Rosso



Directora  
Dra. María Delia Bertoni



Codirectora  
Dra. Marta Silvia Maier

