

**FUNGOS ENDÓFITOS DOS AZEVENS E DAS FESTUCAS: EFEITOS DA
SIMBIOSE GRAMÍNEA-ENDÓFITO NOS ANIMAIS E NAS PLANTAS**

MANUEL A.M. DO VALLE RIBEIRO

Teagasc

Oak Park Research Centre

Carlow, Ireland

RESUMO

O grande interesse presentemente dedicado ao estudo dos fungos endófitos das gramíneas pratenses Lolium perenne (azevém), L. multiflorum (azevém italiano) e Festuca arundinacea (festuca alta) é uma consequência das investigações que provaram a sua associação com doenças dos ruminantes, especialmente o síndrome de verão nas pastagens de festuca (Bacon et al. 1977) e uma neurotoxicose causada pelo azevém infectado (Fletcher e Harvey, 1981).

Como preâmbulo faz-se uma descrição concisa das características dos endófitos Acremonium coenophialum, Acremonium lolii e duas espécies semelhantes respectivamente a Gliocladium e Phialophora que infectam aquelas gramíneas e dos sintomas das doenças causadas nos bovinos e ovinos alimentados em pastos infectados.

O objectivo principal desta comunicação é rever sumariamente os efeitos nocivos e benéficos dos fungos endofíticos nos azevens e festucas, e nos ruminantes mantidos em pastagens infectadas. Assim discute-se a relação entre as gramíneas infectadas e as toxicoses dos animais, a natureza da interacção gramínea-fungo e os resultados de ordem económica que a inclusão de cultivares com ou sem endófito pode ter para a indústria pecuária.

PALAVRAS CHAVE: Fungos endófitos, Acremonium coenophialum, A. lolii, Gliocladium, Phialophora, Festuca arundinacea, Lolium perenne, L. multiflorum, doenças do gado, síndrome de verão, neurotoxicoses, bovinos, ovinos, alcaloides, lolinas, lolitrems, ergotinas, simbiose gramínea-endófito, produção de forragem, produção de carne e leite, resistência aos insectos, adaptação a condições adversas

1 - INTRODUÇÃO

Os fungos designados por endófitos que infectam as gramíneas pratenses foram descritos há muitos anos por vários autores (Neill, 1941 e Sampson, 1933). As espécies Acremonium coenophialum e Acremonium lolii que infectam respectivamente a Festuca arundinacea (festuca alta) e o Lolium perenne (azevém) são, como foi referido por Siegel, Latch e Johnson (1985), verdadeiros endófitos, isto é, completam os seus ciclos biológicos nas plantas hospedeiras sem produzirem nelas quaisquer sinais externos de infecção. Investigações descritas por Bacon et al. (1977) mostraram que existe uma relação estreita entre o endófito que infecta a festuca alta e a doença dos bovinos nomeada por toxicose da festuca ou síndrome de verão. Poucos anos depois Fletcher e Harvey (1981) referiram uma associação semelhante entre em endófito que infecta o azevém, presentemente identificado como A. lolii, e uma doença que na Nova Zelândia causa graves perturbações nos movimentos dos ovinos, designada em inglês por "ryegrass staggers". Estes dois acontecimentos sem dúvida tiveram uma importância tremenda pois demonstraram que as interacções gramínea-endófito tem sérias implicações na produção animal e consequentemente são responsáveis pelas avultadas somas actualmente dispendidas nos inúmeros projectos de investigação relacionados com o estudo dos complexos gramínea-endófito. O objectivo desta comunicação é rever muito sumariamente os efeitos nocivos e benéficos dos fungos endofíticos nos azevems e festucas, e nos ruminantes mantidos em pastos infectados.

2 - TAXONOMIA E DESCRIÇÃO DOS ENDÓFITOS

Os endófitos que infectam o azevém, o azevém italiano (Lolium multiflorum) e a festuca alta estão incluídos na tribo Balansiae da família Clavicipitaceae. A taxonomia destes endófitos cuja fase sexuada não foi ainda encontrada continua a ser objecto de grande controvérsia. Morgan-Jones e Gams (1982) criaram a secção Albo-lanosa dentro do género Acremonium na qual incluíram o endófito encontrado na F. arundinacea que designaram por Acremonium coenophialum. Subsequentemente endófitos isolados nas espécies de Festuca e Lolium foram incluídos na mesma secção. Assim Latch, Christensen e Samuels (1984) classificaram o endófito do azevém como Acremonium lolii. Estes fungos endofíticos podem estar relacionados com o género Epichloe mas perderam possivelmente há muitos milénios a capacidade de produzirem esporos.

As seguintes espécies de endófitos foram identificadas em L. perenne, L. multiflorum e F. arundinacea:

Acremonium lolii

Acremonium coenophialum

Espécie semelhante a Gliocladium

Espécie semelhante a Phialophora

Para tornar a exposição mais clara os dois últimos fungos serão descritos no texto simplesmente como Gliocladium e Phialophora. As plantas infectadas pelos quatro endófitos não exibem quaisquer sintomas externos de infecção, isto é, o micélio desenvolve-se sistémicamente nos espaços intercelulares dos tecidos do hospedeiro e termina invadindo as camadas de aleurona da semente sem afectar a viabilidade da mesma.

Duas técnicas são normalmente usadas para determinar a presença do endófito na graminéa hospedeira:

(a) Observação ao microscópio do micélio, na bainha da folha e na semente, depois de corado com azul de algodão em lactofenol.

(b) Teste ELISA ("enzyme-linked immunosorbent assay").

No segundo método antisoros preparados a partir de culturas de A. coenophialum e A. lolii são usados para determinar a presença de antígenos dos fungos nas plantas de F. arundinacea e L. perenne. Embora o teste ELISA seja menos moroso que o primeiro é contudo menos eficiente pois não permite distinguir os dois endófitos. Os quatro endófitos têm sido encontrados na parte aérea das plantas hospedeiras mas só os micélios de Gliocladium e Phialophora foram observados nas raízes.

O micélio das espécies de Acremonium é constituído por hifas septadas, grossas, sinuosas, raramente ramificadas, que se desenvolvem nos espaços intercelulares em geral paralelamente ao eixo longitudinal da bainha da folha e do colmo. Na Irlanda, o autor (não publicado) observou em plantas de híbridos L. multiflorum x F. arundinacea a presença dum endófito com hifas semelhantes às de Acremonium spp mas com um número elevado delas formando ângulos de amplitude variável com o eixo longitudinal da bainha da folha. Este facto parece confirmar a hipótese formulada por Latch, Potter e Tyler (1987) de que os endófitos que infectam L. multiflorum e L. perenne pertencem a espécies diferentes. Segundo Latch et al. (1987) as hifas de A. lolii são ligeiramente menos sinuosas do que as de A. coenophialum. Os fungos Gliocladium e Phialophora que infectam respectivamente o azevém e a festuca alta tem micélios com hifas profusamente

ramificadas e as constrictões dos septos tão pronunciadas que as hifas parecem formadas por contas semelhantes às dum rosário. Os micélios destes dois endófitos não se distinguem in vivo e ainda não se conseguiram produzir em culturas in vitro.

Os quatro endófitos são unicamente transmitidos pela semente da gramínea e a infecção de plantas sem endófito não ocorre na natureza (Siegel et al. 1984; Valle Ribeiro, Bush e Hogan, 1988). Existe um acordo geral de que as plantas infectadas de Lolium spp e Festuca spp são provenientes dos centros de origem daquelas gramíneas no sul da Europa. A infecção deu-se certamente há muitos milénios antes dos fungos terem perdido a ababilidade de produzir esporos. O autor e Lowell Bush (não publicado) estudaram material colhido em ecótipos portugueses de F. arundinacea, amavelmente fornecidos pelo colega Tavares de Sousa, e verificaram que 80% das amostras continham teores elevados de alcaloides do grupo das lolinas (superiores a 500 ug g⁻¹ de matéria seca). Como estes alcaloides só são sintetizados na presença do endófito os números obtidos confirmam a existência dum nível de infecção relativamente elevado naqueles ecótipos.

3 - DOENÇAS DOS ANIMAIS ASSOCIADAS COM OS ENDÓFITOS

Como foi anteriormente referido as duas mais importantes doenças associadas com gramíneas infectadas pelos endófitos são o síndrome de verão dos bovinos causado pelas plantas de festuca alta infectadas pelo A. coenophialum (Bacon et al. 1977) e a neurotoxicose dos ovinos que afecta os animais mantidos em pastagens de azevém infectadas com A. lolii (Fletcher e Harvey, 1981).

Os sintomas do síndrome de verão estão associados com temperaturas elevadas que aumentam a susceptibilidade dos animais às toxinas

presentes na festuca alta. O comportamento anormal dos bovinos alimentados em pastos infectados caracteriza-se por um reduzido aumento de peso, fraca produção de leite, redução da quantidade de erva ingerida, pelagem irregular, salivação excessiva, aumento da taxa de respiração e temperatura rectal elevada. As plantas de festuca infectadas com o endófito podem também causar perturbações na reprodução dos bovinos (Siegel, Latch e Johnson, 1987).

Entre os alcaloides presentes na F. arundinacea as lolinas (N-acetyl loline e N-formyl loline) que só são sintetizadas na presença do endófito atingem concentrações de 0.8% por unidade de matéria seca. Contudo não se conseguiu provar que estes dois alcaloides são os factores de toxicidade responsáveis pelo síndrome de verão. Hemkem e Bush (1989) sugerem que os ergopeptidos isolados nas culturas do endófito podem ser causadores do síndrome de verão. Contudo afirmaram ser necessário efectuar um estudo profundo que prove claramente que os referidos alcaloides são os factores responsáveis.

As toxinas presentes nas plantas de azevém infectadas pelo A. lolii causam desordens neurológicas que afectam principalmente os ovinos mas também podem ocorrer nos bovinos, equídeos e veados (Mortimer e di Menna, 1985). Os animais doentes parecem normais mas quando são perturbados sofrem severos espasmos musculares que usualmente resultam em colapso seguido por uma recuperação aparentemente rápida. Em caso de epidemias graves, os animais perdem completamente o controlo dos movimentos e podem morrer em resultado de quedas ou afogados nos cursos de água. Esta doença ocorre no verão e outono e está normalmente associada com tempo quente e pastagem intensiva. Além dos sintomas descritos os animais que pastam azevém infectado com A. lolii apresentam

reduzidos aumentos de peso que são o resultado duma baixa ingestão de erva.

Suspeita-se que as neurotoxinas do grupo lolitrem são responsáveis por esta doença. As lolitrems não foram ainda identificadas em culturas de A. lolii, mas toxinas tremorgénicas com elas relacionadas tais como penitrems, janthitrems e aflatrems são produzidas por fungos (Gallagher et al. 1984).

4 - INTERACAO GRAMÍNEA-ENDÓFITO

Os fungos endófitos que infectam os azevens e a festuca alta são biotróficos, isto é, obtêm as substâncias nutritivas necessárias para o seu crescimento nos tecidos vivos do hospedeiro.

Adoptando o esquema de classificação dos fungos biotróficos estabelecido por Lewis (1973) os endófitos Acremonium são considerados como simbioses biotróficos e mutualísticos (Siegel et al. 1987).

Baseados no conceito de mutualismo Bacon e Siegel (1988) e Siegel et al. (1987) sugerem que os endófitos Acremonium que infectam o azevem e a festuca alta estabelecem uma relação com as gramíneas respectivas que beneficia mutuamente o hospedeiro e o fungo.

4.1 - Benefícios para o endófito

Os endófitos beneficiam claramente da associação com os seus hospedeiros que lhes fornecem os elementos nutritivos necessários ao seu desenvolvimento. Além disso o hospedeiro dá-lhes uma protecção a longo prazo, promove a sua disseminação (via semente) e aumenta a sua sobrevivência.

O efeito do hospedeiro na nutrição e reprodução do endófito é demonstrado pelo facto do micélio ser muito mais denso na bainha da folha e na semente, o que é provavelmente devido aos níveis elevados de hidratos de carbono e reservas azotadas naquelas

partes da planta.

4.2 - Benefícios para a planta hospedeira

As características desejáveis possuídas pelas graminéas infectadas pelos endófitos são o maior crescimento das plantas, isto é, maior número de colmos e acumulação de matéria seca; melhor adaptação a condições de secura e calor excessivo; maior vigor e persistência; tolerância ao ataque dos insectos e ao pastoreio excessivo pelos ruminantes.

No Texas, Read e Camp (1986) verificaram que as pastagens de festuca alta com níveis de infecção elevados produziram mais matéria seca e foram mais persistentes do que aquelas em que o A. coenophialum não estava presente. Contudo em Kentucky, Siegel et al. (1984) mostraram não haver diferenças nas produções de forragem e de semente, e na persistência de talhões da cv. Kenhy com 7 e 75% de infecção respectivamente.

O estabelecimento e crescimento inicial da cv. Ky.31 não foram afectados pela presença do endófito numa experiência em vasos pequenos realizada em Oak Park. Contudo ao fim 16 semanas as plantas jovens infectadas tinham um número de caules e um peso de matéria seca mais elevados do que os das plantas sem endófito (Bush et al. 1988).

A adaptação a condições adversas do meio (secura, calor excessivo, ataques dos insectos e o pastoreio excessivo) é outro benefício que a graminéa recebe da simbiose.

A resistência aos ataques dos insectos que existe nas plantas de azevém e festuca alta infectadas pelos endófitos é sem dúvida uma das características mais valiosas da associação graminéa-fungo.

A presença do A. coenophialum nas plantas de F. arundinacea impede os ataques dos afídios Rhopalosiphum padi e Schizaphis graminum

e segundo Johnson, Bush e Siegel (1986) os alcaloides do grupo pyrrolizidine (N-acetyl loline e N-formyl loline) são responsáveis pela resistência. A infecção do azevém pelo A. lolii protege as pastagens contra os ataques do coleóptero Listronotus bonariensis ("argentine stem weevil") e Rowan e Gaynor (1986) atribuem a resistência à presença do alcaloide peramine.

Embora a baixa ingestão de erva pelos animais observada nas pastagens infectadas pelos endófitos não agrade aos criadores de gado, tal facto tem efeitos benéficos para a gramínea porque reduz o efeito nocivo do pastoreio intensivo nas plantas e consequentemente aumenta a sua persistência.

5 - CONSEQUÊNCIAS ECONÓMICAS DA AUSÊNCIA OU PRESENÇA DO ENDÓFITO NAS PASTAGENS

Com respeito aos efeitos nocivos do A. coenophialum nas pastagens de F. arundinacea, Pedersen et al. (1986) afirmaram que mesmo que o aumento da carga animal pudesse equilibrar o baixo aumento diário de peso de novilhos castrados mantidos em pastos infectados o capital necessário para aumentar a número de cabeças certamente desencorajaria o uso de pastagens infectadas. Por isso os avultados prejuízos causados à indústria pecuária norte americana estão a ser reduzidos com a introdução de cultivares melhoradas de festuca alta completamente isentas do endófito ou com níveis de infecção inferiores a 5%.

Embora o emprego de cultivares sem infecção esteja já a produzir resultados económicos positivos nos E.U.A. os problemas criados pela associação gramínea-fungo são muito complexos. Assim tendo em vista o conceito de mutualismo que sugere que nenhum participante numa simbiose pode sobreviver isoladamente, deve-se considerar que a eliminação do fungo pode causar a perda de

características valiosas nas plantas.

O melhor exemplo da necessidade da presença do fungo para a sobrevivência da gramínea é a associação azevém - A. lolii. Assim verificou-se que quando uma cultivar sem endófito foi introduzida na Nova Zelândia a maioria das plantas não sobreviveu devido ao efeito conjunto do pastoreio excessivo pelos ruminantes e do ataque do "argentine stem weevil". Deste modo os agricultores neo-zelandêses chegaram à conclusão de que a eliminação do fungo lhes causaria certamente prejuízos económicos muito mais avultados do que os originados pelas neurotoxicoses (Rowan e Gaynor, 1986). Em conclusão os estudos das associações gramínea-fungo necessitam de ser cada vez mais aprofundados. Só assim será possível tornar numa realidade a sugestão de Bacon e Siegel (1988) de que endófitos geneticamente melhorados contendo unicamente alcaloides desejáveis, como por exemplo os que conferem a resistência aos ataques dos insectos, possam ser obtidos e introduzidos nas plantas de festuca ou de azevém.

BIBLIOGRAFIA

- BACON, C.W.; PORTER, J.K.; ROBBINS, J.D.; LUTRELL, E.S. (1977): Epichloe typhina from toxic tall fescue grass. Appl. Environ. Microbiol. **34** : 576-81
- BACON, C.W.; SIEGEL, M.R. (1988): The endophytes of tall fescue. J. Production Agriculture **1** : 45-55.
- BUSH, L.P.; VALLE RIBEIRO, M.A.M.; HOGAN, J.; BURRUS, JR., P.B. (1988): Growth and development of host in the tall fescue - endophyte association. Agron. J. p. 159.
- FLETCHER, L.R.; HARVEY, I.C. (1981): An association of a Lolium endophyte with ryegrass staggers. N.Z. Vet. J. **29**: 185-86.

GALLAGHER, R.T.; HAWKES, A.D.; STEYN, P.S.; VLEGGAAR, R. (1984): Tremorogenic neurotoxins from perennial ryegrass causing staggers disorder : Structure and elucidation of lolitrem B. J. Chem. Soc. Chem. 614-16.

HEMKEN, R.W.; BUSH, L.P. (1989): Toxic alkaloids associated with tall fescue toxicosis. In Press.

JOHNSON, M.C.; BUSH, L.P.; SIEGEL, M.R. (1986): Aphid feeding deterrence associated with pyrrolizidine alkaloids present in endophyte-infected tall fescue. Phytopathology **76** 1057 (Abstr.)

LATCH, G.C.M.; CHRISTENSEN, M.J.; SAMUELS, G.J. (1984): Five endophytes of Lolium and Festuca in New Zealand. Mycotaxon **20** : 535-50.

LATCH, G.C.M.; POTTER, L.R.; TYLER, B.F. (1987): Incidence of endophytes in seeds from collections of Lolium and Festuca species. Ann. Appl. Biol. **111** : 59-64.

LEWIS, D.H. (1973): Concepts in fungal nutrition and the origin of biotrophy. Biol. Rev. **48** : 261-78.

MORGAN-JONES, G.; GAMS, W. (1982): Notes on Hyphomycetes. XLI. An endophyte of Festuca arundinacea and the anamorph of Epichloe typhina, new taxa in one of the two new sections of Acremonium. Mycotaxon **15** : 311-18.

MORTIMER, P.H.; di MENNA, M.E. (1985): Interactions of Lolium endophyte on pasture production and perennial ryegrass staggers disease. Trichothecenes and other mycotoxines, ed. J. Lacey, p. 149-58. Chichester/New York : Wiley 571 pp.

NEILL, J.C. (1941): The endophytes of Lolium and Festuca, N.Z.J. Sci. Technol. **23A** : 185-95.

PEDERSEN, J.F.; MCGUIRE, J.A.; SCHMIDT, S.P.; KING, JR., C.C.; HOVELAND, C.S.; SMITH, L.A. (1986): Steer performance as

affected by tall fescue cultivar and level of Acremonium coenophialum infection. N.Z. J. of Exp. Agric. **14** : 307-12.

READ, J.C.; CAMP, B.J. (1986): The effect of the fungal endophyte Acremonium coenophialum in tall fescue on animal performance, toxicity and stand maintenance. Agron. J. **78** : 848-50.

ROWAN, D.D.; GAYNOR, D.L. (1986): Isolation of feeding deterrents against Argentine stem weevil from ryegrass infected with the endophyte Acremonium loliae. J. Chem. Ecol. **12** : 647-58.

SAMPSON, KATHLEEN (1933): The systemic infection of grasses by Epychloe typhina (Pers.) sp. Tul. Trans. Br. Mycol. Soc. **18** : 30-47.

SIEGEL, M.R.; JOHNSON, M.C.; VARNEY, D.R.; NESMITH, W.C.; BUCKNER, R.C. (1984): A fungal endophyte in tall fescue : Incidence and dissemination. Phytopathology **74** : 932-37.

SIEGEL, M.R.; LATCH, G.C.M.; JOHNSON, M.C. (1985): Acremonium fungal endophytes of tall fescue and perennial ryegrass : significance and control. Plant Dis. **69** : 179-83.

SIEGEL, M.R.; LATCH, G.C.M.; JOHNSON, M.C. (1987): Fungal endophytes of grasses. Ann. Rev. Phytopathol. **25** : 293-315.

VALLE RIBEIRO, M.A.M. (1988). Research on fungal endophytes of grasses. Proc. 12th General Meeting European Grassland Federation p. 363-67.

ENDOPHYTIC FUNGI OF RYEGRASSES AND FESCUES: EFFECTS OF THE GRASS-ENDOPHYTE SYMBIOSIS ON ANIMALS AND PLANTS

ABSTRACT

Renewed interest in the study of fungal endophytes of grasses particularly Lolium perenne, L. multiflorum and Festuca arundinacea resulted from investigations which showed their

association with animal maladies, particularly the summer syndrome in tall fescue pastures (Bacon et al. 1977) and ryegrass staggers (Fletcher and Harvey, 1981).

A brief description of the characteristics of Acremonium coenophialum, Acremonium lolii, Gliocladium - like and Phialophora - like endophytes is made. Symptoms of those diseases on cattle and sheep grazing infected pastures are also described.

The objective of this paper is to review summarily the harmful and beneficial effects of endophytic fungi on ryegrasses and fescues and on ruminants grazing infected pastures. Thus, the relationship between infected grasses and animal toxicoses, the nature of grass-fungus interaction and the economical value of infect and noninfected cultivars are discussed.

*

* *

O autor deseja exprimir os seus agradecimentos aos Professores Lowell P. Bush e Ms Patricia O'Donnel pela valiosa ajuda na preparação desta comunicação.