



INTOXICACIONES DE BOVINOS POR TOXINAS DEL *Claviceps paspali*. 1) ESTUDIO DEL CICLO BIOLÓGICO DEL HONGO

D'Espósito, R.E.

Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad
Nacional de Rosario. Casilda.
Santa Fe. Argentina.

RESUMEN

Paspalum dilatatum, (pasto miel) es una excelente forrajera de producción estival, que durante el proceso de floración es atacado por un hongo parásito, *Claviceps paspali*, que muestra una marcada especificidad por las gramíneas de este género.

Los objetivos de este trabajo fueron: Estudiar su ciclo biológico, tanto sexual como asexual, conocido en base al del *Claviceps purpurea* (comezuelo del centeno) puesto que se verificaron diferencias importantes entre ambos. Se comprobó que entre otras características morfológicas menores, *Claviceps paspali* es capaz de reiniciar su fase asexual desde el esclerote, aumentando enormemente su difusión.

SUMMARY

Paspalum dilatatum («honey grass») is an excellent forage grass of summer production; it is attacked by a parasite fungus, *Claviceps paspali*, which shows a marked specificity to gramineous of this genus.

The aims of this work were: To study its biologic cycle, both sexual and asexual, known from *Claviceps purpurea* cycle (ergot), because important differences were verified between them.

It was proven that among other minor morphologic characteristics, *Claviceps paspali* is able to begin again its asexual phase from the sclerotium, so hugely increasing its spreading.

INTRODUCCIÓN

En los departamentos del sur de la provincia de Santa Fe la ganadería ha sido desplazada por la agricultura hacia las zonas marginales de esta región, generalmente hacia áreas colindantes con ríos, arroyos y lagunas. Estos terrenos de suelos con dificultades de drenaje, húmedos y pesados registran abundante presencia de pasto miel (*Paspalum dilatatum*) de excelente aptitud pastoril.

En el otoño, sobre todo cuando es muy húmedo, las inflorescencias de estas gramíneas presentan gran número de esclerotes de *Claviceps paspali*. Éstos son portadores de toxinas tremorgénicas que al ser ingeridas por el ganado producen una sintomatología nerviosa típica. La intoxicación posee un índice de morbilidad de 1 entre el 15 y el 30 % según el grado de contaminación de la pradera, siendo la mortalidad casi nula, pero la pérdida de peso muy significativa.

Las toxinas del *C. paspali* actúan específicamente sobre las células de Purkinje del cerebelo alterando la acción moduladora del mismo sobre la partida de estímulos nerviosos desde el cerebro. Son características de esta intoxicación la ataxia, astacia, disimetría e hipermetría. Los animales presentan hiperexcitabilidad y se tornan agresivos, sus orejas están erectas y efectúan constantemente movimientos de negación con la cabeza. Se verifican

tremores en las grandes masas musculares del tronco, cuello y extremidades. Si se los excita caen en decúbito adoptando posiciones anormales como pleurostótono y opistótono.

El síndrome es reversible remitiendo los síntomas al retirar los animales de la pradera.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el estudio del ciclo biológico del hongo en la naturaleza de una pradera donde se presentaron casos de animales intoxicados, se seleccionaron grupos de 6 a 10 plantas adultas, que se rodearon con un alambrado para evitar el pastoreo del ganado. Con el fin de controlar el enmalezamiento y favorecer la visualización de las plantas, se utilizó el herbicida Glifosato al 4% durante el mes de noviembre.

Se recogieron plantas adultas que se plantaron en maceta y se alojaron en invernáculos durante el mes de septiembre. Al emitir sus inflorescencias se realizó la infección artificial con la secreción melosa recogida de alguna flores, diluyéndolas en agua destilada y rociándolas con atomizador sobre flores de *Paspalum* en estado de anthesis.

Varios grupos de plantas fueron cubiertos con jaulas de tela metálica para corroborar el papel del viento y los insectos en la difusión del hongo y en el estudio de la germinación del esclerote, además de la observación a campo, fueron colocados en cajas de Petri, sobre arena húmeda estéril a 5° C durante 75 días. Posteriormente fueron llevados a 26° C en presencia de luz, hasta su germinación.

En la coloración de conidios presentes en la secreción melosa y previo a la observación, se utilizaron extendidos de la misma coloreados con azul de metileno al 3 % durante 5 minutos, lavados con agua destilada.

Se disgregaron cabezuelas estromáticas maduras contenidas en agua destilada y fueron coloreadas con el mismo colorante para visualizar peritecios, ascos y ascosporas.

Se utilizó como medio de cultivo agar-papa-dextrosa para sembrar pequeños trozos de médula de esclerotes y se incubó a 26° C con el objeto de observar el desarrollo micelial del hongo.

RESULTADOS

Los estudios permitieron establecer claramente tanto el ciclo asexual del hongo (*Sphacelia deliquesens*) que se desarrolla en las inflorescencias del pasto miel, como el ciclo sexual sobre el suelo a partir de los esclerotes.

Ciclo asexual: comienza con la llegada de las ascosporas a los órganos femeninos de las flores. Éstas germinan mientras van penetrando hacia el ovario siguiendo el desarrollo del tubo polínico a través del estilo, donde generan un micelio blanco, algodonoso que se cubre de acérvulos con conidióforos cortos, que producen gran número de conidios ovales culminando con la necrosis del embrión de la semilla.

Mientras desarrolla, el hongo exuda una secreción densa, pegajosa, color ámbar clara, muy semejante a la miel que se acumula sobre la espiga y marca el primer indicio de la invasión por *C. paspali*.

Entre una semana y diez días el exudado meloso co-



mienza a perder transparencia notándose en su masa grumos blanquecinos que van aumentando de tamaño y consistencia hasta llegar en quince a veinte días a formar un esclerote esférico, duro, color pardo claro de 2 a 5 mm de diámetro con superficie irregular, que ocupa el lugar correspondiente a la semilla sobre la espiga.

El concepto generalizado sostiene que con la formación del esclerote culmina la fase sexual; sin embargo, se comprobó que el ciclo asexual puede continuar, como ocurre cuando la temperatura y humedad otoñal son altas. En estas condiciones desde las grietas presentes en la superficie del esclerote, se forman células conidiales que producen gran cantidad de conidios inmersos en una secreción melosa idéntica a la que se observa sobre las inflorescencias. Se pudo registrar también que sobre la superficie del esclerote puede crecer un micelio con las mismas características morfológicas que el cultivado in vitro o el desarrollado en el ovario. Aparentemente estas dos últimos aspectos, son privativos de esta especie.

Ciclo sexual: se inicia a partir de los esclerotes que han pasado todo el invierno semienterrados en el suelo, luego de caer de las espigas.

En el mes de diciembre con condiciones ideales de humedad y temperatura, las plantas de pasto miel liberan sus cañas florales, en tanto los esclerotes inician su proceso de germinación. El proceso comienza cuando los mismos evidencian sobre su superficie la formación de dos a cuatro mamelones estromáticos amarillos que crecen hasta formar un pedicelo de aproximadamente 0,8 cm de altura y un diámetro de 1 mm, que presenta en su extremo el esferidio, mas ancho y oscuro, de 3 mm de diámetro.

Dentro del esferidio se forman pequeñas cavidades rodeadas de tejido estromático denominadas peritecios. Estos muestran un opérculo que sobresale de la superficie, el ostíolo. En el interior del peritecio se identifican los ascos en número variable, cilíndricos, alargados, unitunicados que alojan en su interior 8 ascosporas filiformes, hialinas y céviles de 60 a 90 μ de largo por 1 μ de diámetro.

Cuando el esferidio ha madurado los ascos quedan en libertad y las ascosporas son expulsadas en forma activa, quedando libres para ser transportadas mayoritariamente por los insectos hasta las flores, germinando entre 24 y 36 horas después para reiniciar nuevamente el ciclo.

CONCLUSIONES

El estudio del ciclo vital de *C. paspali* permite afirmar, que no obstante ser semejante a la otra especie del género (*C. purpúrea*) presenta como diferencia biológica, el hecho de poder continuar la fase asexual una vez formados los esclerotes, a través de la exudación de una secreción melosa rica en conidios, sobre los mismos. Además, en su superficie se puede desarrollar un micelio blanquecino con hifas generalmente estériles.

Se pudo comprobar que los insectos son mucho más importantes que el viento en la difusión del hongo, ya que las plantas cubiertas con tela metálica casi no registraron infección.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Brownie, C. F.; Prasad, R. D. (1978). Suspected convulsive ergotins in beef calves on overgrow dallis grass. (*Paspalum dilatatum*) pasture.- Veterinarian Human Toxicol. Manhattan, Kan: American Academy of Veterinary and Comparative Toxicology.- Vol 29.- (3). :257-258
- 2.- Carrera, C. J. M. (1962).- Microorganismos parásitos de plantas cultivadas o silvestres; causales de trastornos tóxicos. INTA. Publicación Técnica N° 110
- 3.- Coppock, R. W.; Nostrom, M. S.; Simon, J.; Mc Kenna, D. J.; Jacobsen, B.; Szlachta, H. L. (1989). «*Paspalum stagger* and tremorgen intoxication in calves». Journal of the American Veterinary Medical Association Vol 194 N° 4: 549-541
- 4.- Crenovich, H.; Nigro, C.; Noste, J. J. (1990). Aspectos epidemiológicos de algunas intoxicaciones vegetales en el área de influencia de la EEA Balcarce. Revista A.P.A. 10 (5): 383-388
- 5.- Grasso, V.; Tonolo, A. (1965). Alcuni aspetti biologici della *Claviceps paspali* Stev et Hall. Giornale Italiano.
- 6.- Grisolia, J. O.; (Vallejo, L. C. (170). Micotoxicosis por *Claviceps paspali*. Revista de Medicina Veterinaria. 51: 97-102
- 7.- Lopez, T. A.; Ordriozola, E. R.; Mutti, G. (1986). Efectos tóxicos de *Paspalum dilatatum* (Pasto miel) contaminado por *Claviceps paspali* en bovinos. Veterinaria Argentina. 3: 863-870
- 8.- Luttrell, E. S. (1977). The disease cycle and fungus-host relationships in dalligrass ergot. Phytopathology. Vol. 67 N° 12: 1461-1468
- 9.- Marchionato, J. B. (1937). Nota biológica sobre el *Claviceps paspali*. Revista Argentina de Agronomía. Tomo. 4 Vol. 3. 3:3, 101-106
- 10.- Oddo, N. (1967). Origin and formation of perithecia of *Claviceps paspali* Stev et may. Anales Institute Superiori di Sanita' :13-27
- 11.- Riet Correa, F.; Schild, A. L.; Mendez, F.; Tavares, A.; Rodriguez, J. O. (1983). Intoxicação por *Claviceps paspali* em bovinos no Rio Grande Do Sul. Pesquisa Veterinaria Brasileira. 3: 59-65
- 12.- Tyler, J. M.; Shelby, R. A.; Sartin, E. A.; Wolfe, D. E.; Steiss, J. J. E.; Sorjonen, D. C.; Pone, T. A.; Spano, J. A. (1992). Naturally occurring neurologic disease in calves fed *Claviceps paspali*. Infected dallis grass hay and pasture. Progress in veterinary-neurology
- 13.- Cole, R.; Dorner, J.; Lansden, J.; Cox, R.; Pape, C.; Cunfer, B.; Nicholson, S.; Beolell, D. (1997). *Paspalum Staggers*: Isolation and Identification of Tremorgenic Metabolites from Sclerotia of *Claviceps paspali*. Agricultural food Chemistry - 25, 1197: 1201-
- 14.- Dorner, J. W.; Cole, R. J.; Cox, R. H.; Cunfer, B. M. (1984). Paspalitrein c, a new metabolite from sclerotia of *Claviceps paspali*. U. S. Department of Agricultural, National. Penaut Research Laboratory, Dawson, Georgia. 31742.-
- 15.- Raynal, G. (1996). Presence of *Claviceps paspali* Stev et Hall on *Paspalum distichum*. L, in France and corresponding ergotins in cattle. INAPG - INRA, Laboratoire de Phatologie Végétale, F-78850, Thiverval Grignon France
- 16.- Raynal, G. (1996). *Paspalum ergot*: a risk for cattle in the south of France. Lab. de Phatologie Végétale, INAPG-INRA, F-78850, Thiverval Grignon France
- 17.- Mantle, P. G.; Mortimer, P. H.; White, E. P. (1977). Mycotoxic tremorgens of *Claviceps paspali* and *Penicillium paxilli*. A comparative study of effects on sheep and cattle in relation to natural stagger syndromes. Research in veterinary Science. 24: 449-56



INTOXICACIONES DE BOVINOS POR TOXINAS DEL *Claviceps paspali*. 2) AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE TOXINAS DEL *Claviceps paspali*

D'Espósito, R. E.

Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad
Nacional de Rosario. Casilda. Santa Fe.
Argentina.

RESUMEN

Paspalum dilatatum, (pasto miel) es una excelente forrajera de producción estival, que durante el proceso de floración es atacado por un hongo parásito, *Claviceps paspali*, que muestra una marcada especificidad por las gramíneas de este género.

Los objetivos de este trabajo fueron: Extraer, aislar e identificar las toxinas responsables del cuadro tóxico, desde las vacuolas lipídicas ubicadas dentro de los esclerotes. Las características morfológicas de este hongo se estudiaron en ambiente natural, y por medios artificiales.

Se desarrolló un protocolo para la extracción, aislamiento e identificación de estas toxinas presentes en los esclerotes. Así se aislaron cuatro fracciones que fueron identificadas por distintos métodos y resultaron ser las toxinas tremorgénicas paspalina, paspalinina, paspalitrema A y B.

SUMMARY

Paspalum dilatatum («honey grass») is an excellent forage grass of summer production; it is attacked by a parasite fungus, *Claviceps paspali*, which shows a marked specificity to gramineous of this genus.

The aims of this work were: To extract, to isolate and to identify the toxins responsible of the intoxication from the lipidic vacuoles within the sclerotia. The morphobiologic characteristics of this fungus were studied in a natural environment and by artificial methods.

A protocol was developed for the extraction, isolation and identification of these toxins present in the sclerotia. Thus, four fractions were identified by different methods and they resulted to be the tremorgenic toxins paspaline, paspalinine, and paspalitrema A and B.

INTRODUCCIÓN

En los departamentos del sur de la provincia de Santa Fe la ganadería ha sido desplazada por la agricultura hacia las zonas marginales de esta región, generalmente hacia áreas colindantes con ríos, arroyos y lagunas. Estos terrenos de suelos con dificultades de drenaje, húmedos y pesados registran abundante presencia de pasto miel (*Paspalum dilatatum*) de excelente aptitud pastoril.

En el otoño, sobre todo cuando es muy húmedo, las inflorescencias de estas gramíneas presentan gran número de esclerotes de *Claviceps paspali*. Éstos son portadores de toxinas tremorgénicas que al ser ingeridas por el ganado producen una sintomatología nerviosa típica. La intoxicación posee un índice de morbilidad de 1 entre el 15 y el 30 % según el grado de contaminación de la pradera, siendo la mortalidad casi nula, pero la pérdida de peso muy significativa.

Las toxinas del *C. paspali* actúan específicamente sobre las células de Purkinje del cerebelo alterando la acción

moduladora del mismo sobre la partida de estímulos nerviosos desde el cerebro. Son características de esta intoxicación la ataxia, astacia, dismetría e hipermetría. Los animales presentan hiperexcitabilidad y se tornan agresivos, sus orejas están erectas y efectúan constantemente movimientos de negación con la cabeza. Se verifican temores en las grandes masas musculares del tronco, cuello y extremidades. Si se los excita caen en decúbito adoptando posiciones anormales como pleurostótono y opistótono.

El síndrome es reversible remitiendo los síntomas al retirar los animales de la pradera.

MATERIALES Y MÉTODOS

1) Para el aislamiento e identificación de las toxinas de este hongo, se pesaron 200g de esclerotes secos y libres de restos vegetales, provenientes de una pradera de pasto miel donde se registraron numerosos casos de intoxicación de bovinos.

Los esclerotes fueron finamente molidos hasta llevarlos a un polvo de fina granulometría. Se colocaron en recipiente de vidrio y agregaron 250 cm³ de cloroformo y la mezcla se llevó a agitador rotatorio durante 24h a 37° C. La mezcla se filtró y se incorporó a un evaporador rotatorio, donde rápidamente se obtuvo un residuo viscoso color ámbar oscuro.

2) Con el objeto de separar los componentes lipídicos de las toxinas, ya que son liposolubles, el residuo fue disuelto en una mezcla de dicloexano-metanol-agua (80:120:32), que se incorporó a una ampolla de decantación, se agitó bruscamente y se dejó reposar, luego de lo cual se separaron dos fases una superior con el dicloexano y los lípidos que fue desechada y una inferior más clara, con el metanol-agua y las toxinas en caso de estar presentes. Esta fase se llevó a evaporador rotatorio durante 80 minutos a 52°C hasta secado total, obteniéndose así el extracto seco, listo para separar las toxinas.

3) Para verificar la existencia de micotoxinas en el extracto seco y continuar con el proceso, se tomó una pequeña fracción de éste, se disolvió en cloroformo deuterado y se le realizaron espectros de resonancia magnética nuclear (MNR) para protones (¹H).

4) Asimismo, para identificar el número de posibles toxinas presentes en el extracto, se realizaron cromatografías en capa delgada (TLC), sembrando una pequeña fracción del mismo sobre placas de sílica gel utilizando como fase móvil benceno-acetato de etilo-cloroformo (40:20:40). Tras la corrida se visualizaron cuatro manchas al ser reveladas con el revelador de Danishefsky. Esto permitió conocer los R_f de cada fracción.

5) Se separaron las distintas fracciones presentes en el extracto realizando una cromatografía de columna preparativa empaquetada con sílica gel, donde se sembró el extracto y se fueron pasando sucesivas fases móviles de 20 cm³ cada una de cloroformo-benceno-acetato de etilo, con un gradiente lineal que aumentaba el 1 % de acetato de etilo con cada volumen agregado a la columna, aumentando así progresivamente la polaridad de la misma.

La fase móvil eluida de la columna fue recibida en 100 tubos de ensayo colocados sobre un aparato colector de fracciones automático, donde cada tubo recibió 500 go-



tas.

6) Para identificar entre qué tubos se ubicaba cada fracción, se marcó en forma cuadrículada una placa de sílica gel donde se sembró con capilar una pequeña fracción de cada tubo. Posteriormente, la placa fue revelada reconociendo así los tubos que contenían a las distintas fracciones. Éstos fueron juntados y evaporados, obteniendo así el extracto seco correspondiente a cada fracción.

7) Para la identificación de cada una de estas fracciones se realizaron:

a) Espectrometría de resonancia magnética nuclear (MNR), ^1H y ^{13}C , para establecer la estructura química de cada fracción, en base al análisis de sus señales.

b) Espectrometría de masas con el objeto de obtener los pesos moleculares de cada fracción.

c) Espectrometría ultravioleta. Las muestras se disolvieron en alcohol metílico al 95% y se calcularon sus absorbancias y longitud de onda para establecer los picos de cada fracción.

RESULTADOS

Las pruebas identificatorias realizadas permitieron constatar que las cuatro fracciones aisladas se correspondían con la estructura indol-alcaloidea propia de estas toxinas. Una parte de las mismas esta formada por un núcleo indol y la otra por un diterpeno, el geranilgeraniol.

En una sola extracción se aislaron e identificaron cuatro toxinas paspalina, paspalinina, paspalitremo A y paspalitremo B.

La fracción 1 con un Rf de 0,77 corresponde a paspalina ($\text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{O}_2\text{N}$). Su peso molecular es de 421,238, su espectro ultravioleta absorbe medianamente a 280 m μ .

La fracción 2 con una Rf de 0,58 corresponde a Paspalitrem A ($\text{C}_{32}\text{H}_{39}\text{O}_4\text{N}$). Su peso molecular es de 501,287. su espectro ultravioleta presenta un pico de absorción a λ_{max} 235 m μ y otro de baja intensidad de absorción a una longitud de onda $>$ max 280 m μ .

La fracción 3 corresponde a paspalinina ($\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{O}_4\text{N}$). Su Rf es de 0,40. su peso molecular de 433,225 y su espectro ultravioleta presenta una banda intensa a 254 m μ debida a la presencia de la acetona α,β insaturada cíclica y un pico de absorción de 310 m μ que se extiende hasta 330 m μ .

La fracción 4 corresponde al paspalitremo B ($\text{C}_{32}\text{H}_{39}\text{O}_5\text{N}$). Su Rf es de 0,20. Su peso molecular de 517,287 y su espectro ultravioleta presenta la misma banda de absorción que el A aunque de menor intensidad a 235 m μ .

Técnicas de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) permitieron identificar las cuatro toxinas citadas. Dentro de la fracción 4 se identificó otro compuesto, probablemente una nueva toxina, isómero o epímero derivado de aquél. Se logro aislarlo, pero a razón de su inestabilidad, la fracción se descompuso y la escasa cantidad obtenida no permitió realizar las pruebas identificatorias que se hicieron sobre las anteriores.

CONCLUSIONES

El primer indicio de la infección de gramíneas por *C. paspali* es la presencia de un exudado meloso sobre las inflorescencias de las plantas. En esta secreción ya se registran la presencia de metabolitos secundarios, aunque nunca comprobamos la intoxicación del ganado por su consumo, aun siendo éste masivo. Todo lo contrario ocurre cuando la secreción se consolida en un esclerote y este sufre un proceso de maduración, en este caso es

alto el porcentaje de animales que manifiestan los signos típicos de la intoxicación, lo cual indica que las toxinas tremorgénicas se ubican en el esclerote, donde mantienen su poder tóxico por el término de un año y medio.

Se puede afirmar que la concentración y el número de metabolitos biológicamente activos depende del grado de maduración del esclerote. En la secreción melosa se encuentran metabolitos carentes de actividad tremorgénica, que se constituirían en los precursores de las verdaderas toxinas.

Todos los principios dotados de actividad tremorgénica tienen como característica común la presencia de un grupo oxidrilo (OH) en el carbono número 19 de la molécula, por lo que éste debe ser considerado como un marcador de la actividad biológica de estas toxinas. Los metabolitos no tremorgénicos carecen del mismo, pero serían sus precursores.

Se pudo comprobar que estas toxinas son sumamente lábiles e inestables, descomponiéndose fácilmente, por lo que es muy importante realizar el trabajo de extracción, purificación e identificación en el tiempo más breve posible.

El bajo peso molecular de estas toxinas y su liposolubilidad facilitarían su pasaje a través de la membrana hematoencefálica, accediendo al sistema nervioso central donde desarrollan su actividad.

Las manifestaciones clínicas de la intoxicación, se produce por la ingestión de los esclerotes del hongo y se presentan entre los meses de abril a junio.

La actividad biológica de estas toxinas tienen como blanco las células de Purkinge de la corteza cerebelar, a este nivel bloquean los receptores gabaminérgicos de estas células, impidiendo de este modo la incorporación del cloruro al interior de las mismas. De esta forma no se produce la hiperpolarización celular y por consiguiente, no envían sus potenciales post-sinápticos inhibitorios; que regularían los estímulos excitatorios que reciben las células de los núcleos profundos. Esta actividad justifica la sintomatología clínica típica.

Si bien estas toxinas afectan a varias especies, el bovino es la más vulnerable por su comportamiento alimenticio, ya que al consumir el forraje alto, ingiere gran número de espigas y con ellas los esclerotes, conduciéndolos a su intoxicación.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Brownie, C. F.; Prasad, R. D. (1978). Suspected convulsive ergotins in beef calves on overgrow dallis grass. (*Paspalum dilatatum*) pasture.- *Veterinarian Human Toxicol.* Manhattan, Kan: American Academy of Veterinary and Comparative Toxicology.- Vol 29.- (3). :257-258
- 2.- Carrera, C. J. M. (1962).- Microorganismos parásitos de plantas cultivadas o silvestres; causales de trastornos tóxicos. INTA. Publicación Técnica N° 110
- 3.- Coppock, R. W.; Nostrom, M. S.; Simon, J.; Mc Kenna, D. J.; Jacobsen, B.; Szlachta, H. L. (1989). «*Paspalum stagger and tremorgen intoxication in calves*». *Journal of the American Veterinary Medical Association* Vol 194 N° 4: 549-541
- 4.- Crenovich, H.; Nigro, C.; Noste, J. J. (1990). Aspectos epidemiológicos de algunas intoxicaciones vegetales en el área de influencia de la EEA Balcarce. *Revista A.P.A.* 10 (5): 383-388
- 5.- Grasso, V.; Tonolo, A. (1965). Alcuni aspetti biologici della *Claviceps paspali* Stev et Hall. *Giornale Italiano.*
- 6.- Grisolia, J. O.; (Vallejo, L. C. (170). Micotoxicosis por *Claviceps paspali*. *Revista de Medicina Veterinaria.* 51:



97-102

7.- Lopez, T. A.; Ordriozola, E. R.; Mutti, G. (1986). Efectos tóxicos de *Paspalum dilatatum* (Pasto miel) contaminado por *Claviceps paspali* en bovinos. *Veterinaria Argentina*. 3: 863-870

8.- Luttrell, E. S. (1977). The disease cycle and fungus-host relationships in dalligrass ergot. *Phytopatology*. Vol. 67 N° 12: 1461-1468

9.- Marchionato, J. B. (1937). Nota biológica sobre el *Claviceps paspali*. *Revista Argentina de Agronomía*. Tomo. 4 Vol. 3. 3:3, 101-106

10.- Oddo, N. (1967). Origin and formation of perithecia of *Claviceps paspali* Stev et may. *Anales Institute Superiori di Sanita'* :13-27

11.- Riet Correa, F.; Schild, A. L.; Mendez, F.; Tavares, A.; Rodriguez, J. O. (1983). Intoxicacao por *Claviceps paspali* em bovinos no Rio Grande Do Sul. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*. 3: 59-65

12.- Tyler, J. M.; Shelby, R. A.; Sartin, E. A.; Wolfe, D. E.; Steiss, J. J. E.; Sorjonen, D. C.; Pone, T. A.; Spano, J. A. (1992). Naturally occurring neurologic disease in calves fed *Claviceps paspali*. Infected dallis grass hay and pasture. *Progress in veterinary-neurology*

13.- Cole, R.; Dorner, J.; Lansden, J.; Cox, R.; Pape, C.;

Cunfer, B.; Nicholson, S.; Beolell, D. (1997). *Paspalum* Staggers: Isolation and Identification of Tremorgenic Metabolites from Sclerotia of *Claviceps paspali*. *Agricultural food Chemistry* - 25, 1197: 1201-

14.- Dorner, J. W.; Cole, R. J.; Cox, R. H.; Cunfer, B. M. (1984). Paspalitrems, a new metabolite from sclerotia of *Claviceps paspali*. U. S. Department of Agricultural, National. Penaut Research Laboratory, Dawson, Georgia. 31742.-

15.- Raynal, G. (1996). Presence of *Claviceps paspali* Stev et Hall on *Paspalum distichum*. L, in France and corresponding ergotisms in cattle. INAPG - INRA, Laboratoire de Phatologie Végétale, F-78850, Thiverval Grignon France

16.- Raynal, G. (1996). *Paspalum ergot*: a risk for cattle in the south of France. Lab. de Phatologie Végétale, INAPG-INRA, F-78850, Thiverval Grignon France

17.- Mantle, P. G.; Mortimer, P. H.; White, E. P. (1977). Mycotoxic tremorgens of *Claviceps paspali* and *Penicillium paxilli*. A comparative study of effects on sheep and cattle in relation to natural stagger syndromes. *Research in veterinary Science*. 24: 449-56