

1. Wprowadzenie. 2. Charakterystyka grzybów z rodzaju *Neotyphodium*. 3. Metody identyfikacji. 4. Alkaloidy wytwarzane przez endofity. 5. Choroby zwierząt wywołane przez alkaloidy produkowane przez grzyby z rodzaju *Neotyphodium*. 6. Wpływ alkaloidów na odporność traw na stesy. 6.1. Stesy abiotyczne. 6.2. Stesy biotyczne. 7. Występowanie endofitów w Polsce i na świecie. 8. Podsumowanie

### Grass endophytes of the *Neotyphodium* genus

**Abstract:** Endophytes are fungi of the genus *Neotyphodium*, that live in symbiosis with grasses. The effects of this symbiosis can be both negative and positive. The negative effect may be due to alkaloids produced by endophytes, that in higher concentrations are toxic to animals. On the other hand, the effect of symbiosis can be beneficial to plants, because the grass becomes more resistant to biotic and abiotic stresses such as drought, pests or diseases. The most common alkaloid produce by *Neotyphodium* fungi are ergovaline and lolitrem B.

Current state of knowledge on the settlement of grasses by these fungi in Poland is rather small. These fungi are usually present in the seeds of *Festuca ovina*, *F. pratensis*, *F. arundinacea* and *Lolium perenne*. Endophytes were found in plants of permanent grasslands. The most often infected plants were from: *Festuca pratensis*, *F. arundinacea*, *F. rubra*, *F. ovina* and *Lolium perenne*. Traces of endophyte presence was also found in the ecotypes of *Deschampsia caespitosa*, *F. capillata*, *F. gigantea*, *L. multiflorum*, *Poa pratensis* and *Phleum pratense*. It was observed that fungi from the genus *Neotyphodium* occurring in the pasture sward can produce alkaloids, but its production is a variable trait, even within a single ecotype. The average ergovaline content in grass from the permanent pasture in some areas exceeded the threshold level above which disease symptoms in animals may occur.

1. Introduction. 2. Characterization of fungi from *Neotyphodium* genus. 3. Identification methods. 4. Alkaloids produced by endophytes. 5. Animal diseases caused by alkaloids produced by fungi of the genus *Neotyphodium*. 6. Effect of alkaloids on grass resistance to stress. 6.1. Abiotic stresses. 6.2. Biotic stresses. 7. The occurrence of endophytes in Poland and in the world. 8. Summary

**Słowa kluczowe:** choroby zwierząt, endofity, ergowalina, lolitrem B, odporność na choroby

**Key words:** animal diseases, disease resistance, endophytes, ergovaline, lolitrem B

## 1. Wprowadzenie

Grzyby endofityczne to mikroorganizmy, które w części lub przez cały swój cykl życiowy są zdolne zasiedlać bezobjawowo tkanki roślin gospodarzy [83]. Żyją one przede wszystkim w przestrzeniach międzykomórkowych wegetatywnych organów traw oraz w ich nasionach. Dotychczasowe badania wskazują, że endofity mogą rozprzestrzeniać się wyłącznie z nasionami [90] (rys. 1). W roślinach traw zasiedlają najczęściej podstawę pochwy liściowej, stożki wzrostu i młode liście [46]. Śladowe ilości ich grzybni znajdowano także w blaszkach liściowych starszych liści oraz w korzeniach traw [43].

Współżycie endofitów z roślinami opiera się na trzech rodzajach zależności:

– pasożytnictwo: współżycie dwóch różnych organizmów polegające na tym, że jeden z nich jest pasożytem i pobiera pokarm od drugiego bez jakichkolwiek wzajemnych świadczeń (np. *Epichloë*),

– komensalizm: zależność pokarmowa polegająca na tym, że jeden organizm korzysta z zasobów pokarmowych drugiego, lecz nie czyni mu w ten sposób krzywdy, ale też nie przynosi korzyści (niektóre endofity),

– mutualizm: ścisłe współżycie dwóch organizmów przynoszące wzajemne korzyści. Organizmy te są ze sobą tak ściśle powiązane, że nie mogą żyć bez wzajemnej pomocy (*Neotyphodium* spp.).

Liczne badania wskazują, że grzyby endofityczne są bardzo zróżnicowane genetycznie co pozwala im zasiedlać wiele gatunków roślin, ponadto częstotliwość ich występowania jest bardzo duża [80]. Większość z nich zasiedla wewnętrzne tkanki liści, korzeni, łodyg i kory. Rozmnażają się poziomo przez zarodniki, chociaż zdarza się, przeważnie w trawach, że występują w postaci układowego zakażenia nadziemnych tkanek i rozprzestrzeniają się wtedy poprzez zakażone nasiona.

Do typowych endofitów występujących na trawach zaliczane są gatunki grzybów z rodzaju *Neotyphodium* takie jak: *N. lolii* Latch, Christensen & Samuels współżyczący z *L. perenne*, *N. coenophialum* Morgan-Jones & Gams współżyczący z *F. arundinacea* i *N. uncinatum* Gams, Petroni & Schmidt występujący u *F. pratensis* [69]. Charakterystycznie powijana grzybnia wzrasta międzykomórkowo nie penetrując komórek (rys. 2). Wzrost liścia i endofita jest zsynchronizowany [17, 86], a grzyb przypuszczalnie uzyskuje substancje odżywcze,

\* Autor korespondencyjny: Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, 05-870 Błonie; tel. 22 7334584; e-mail: b.wiewiora@ihar.edu.pl

z komórek gospodarza. Ponadto roślina stanowi dla niego schronienie i daje możliwość przenoszenia się do kolejnego pokolenia rośliny poprzez nasiona [59]. Zasiedlone ziarniaki nie posiadają widocznych objawów obecności tych grzybów [95], a grzybnia zasiedla głównie warstwę aleuronową, chociaż jej rozmieszczenie w nasionach bywa różne.

Współżycie traw z grzybami znane jest od dawna, ale wiedza o grzybach endofitycznych i ich rozprzestrzenieniu przez długi okres czasu była niewielka. W dużej mierze, wpływ na rosnące na świecie zainteresowanie grzybami endofitycznymi miało odkrycie szkodliwości traw, zasiedlonych endofitami, dla bydła [5, 28] oraz związek endofitów z odpornością traw na stresy biotyczne i abiotyczne [7, 32]. Intensywny rozwój badań nad endofitami nastąpił na początku lat 80-tych ubiegłego stulecia, głównie w Stanach Zjednoczonych, Nowej Zelandii i Australii [28, 33, 83, 90].

Efekty asocjacji traw z grzybami endofitycznymi mogą być różne, zarówno pozytywne jak i negatywne. Obecność endofitów w trawach może wpływać korzystnie na roślinę wzbudzając np. mechanizmy tolerancji na suszę oraz regeneracji uszkodzeń po długotrwałej suszy, jak również wpływając na oszczędną gospodarkę azotem czy lepszą przyswajalność fosforu [55]. Poza tym trawy zasiedlone przez endofity są odporne na szkodniki, nicienie oraz niektóre choroby [83]. Z drugiej strony rośliny, w których znajdują się te grzyby mogą stanowić zagrożenie dla zdrowia i życia zwierząt roślinożernych. Stwierdzono, że niektóre z wytwarzanych przez te grzyby alkaloidów są toksyczne, a ich nagromadzenie w paszy może wpływać na stan zdrowotny zwierząt gospodarskich. U bydła karmionego paszą zawierającą ergowalinę, czy lolitrem B, może nastąpić spadek produkcji mleka, obniżenie wagi ciała, zmniejszenie aktywności (zwierzęta są osowiałe i unikają słońca). W skrajnych przypadkach może wystąpić tzw. kołowacizna rajgrasowa (ryegrass staggers syndrome) wywołwana obecnością lolitremu, czy też można zaobserwować objawy neurotoksyczności (fescue toxicosis) powodowanej przez nagromadzenie ergowaliny i jej pochodnych [83].

Dotychczasowe, nieliczne badania nad endofitami w Polsce wskazują, że grzyby z rodzaju *Neotyphodium* zasiedlają nasiona polskich odmian traw [62, 63]. Występowanie tych grzybów stwierdzano także w roślinach pochodzących z polskich użytków zielonych (frekwencja na poziomie 20–60%) [52, 66]. Jednak brak jest kompleksowej wiedzy o obecności endofitów zarówno w nasionach odmian traw, jak i w roślinach na trwałych użytkach zielonych w kraju. Nie wiadomo również, czy możliwe jest nagromadzenie szkodliwych alkaloidów w roślinach na pastwiskach w stopniu powodującym zagrożenie dla zdrowia zwierząt. Także w hodowli traw nie zwraca się uwagi na endofity, chociaż w procesach hodowli ekotypy stosowane są jako materiały wyjściowe. Dane z piśmiennictwa wskazują zaś na znacznie silniej-

sze zasiedlenie przez endofity dzikich populacji traw, w porównaniu do pochodzących z plantacji zakładanych z użyciem nasion kwalifikowanych [30].

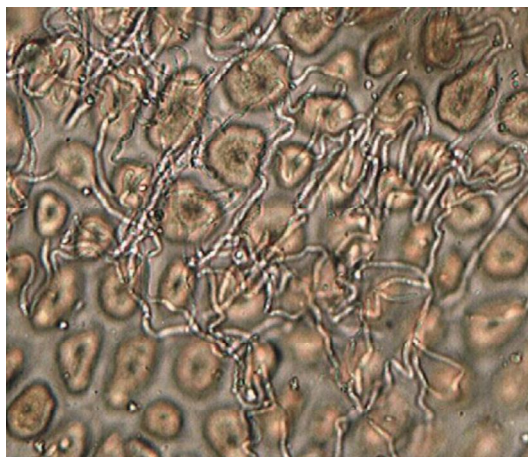
## 2. Charakterystyka grzybów z rodzaju *Neotyphodium*

Grzyby endofityczne zasiedlające trawy należą do workowców (*Ascomycota*), rodziny *Clavicipitaceae* i są zakwalifikowane do siedmiu rodzajów: *Atkinsonella*, *Balansia*, *Balansiopsis*, *Echinodochis*, *Epichloë*, *Myriogenospora* i *Parepichloë* [91, 94]. Większość gatunków należących do tych rodzajów może rozmnażać się płciowo za pomocą wytwarzanych zarodników workowych.

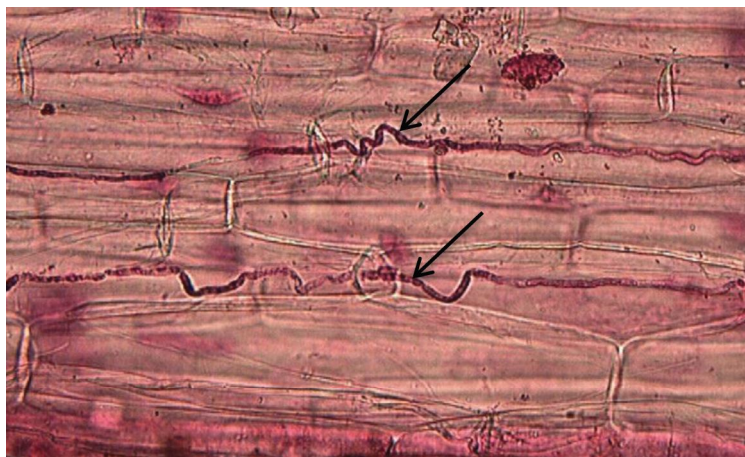
Grzyby endofityczne początkowo były zakwalifikowane do sekcji *Albo-lanosa* rodzaj *Acremonium* przez Morgan-Jones i Gams [58], w której umieszczono anamorficzne (niedoskonałe) stadium *Epichloë* spp., powodujące bezobjawowe porażenie traw w podrodzynie *Poaideae* [78]. Glenn i wsp. [34] przeklasyfikowali rodzaj *Acremonium* sekcji *Albo-lanosa* w nowy rodzaj *Neotyphodium* wydzielający sporosporowe grzyby *Acremonium* (e-endofity) od innych pokrewnych gatunków *Acremonium* (zwykle saprotrofów). Bazując na analizach sekwencji DNA *Acremonium coenophialum*, *A. typhinum*, *A. lolii*, *A. chisosum*, *A. starrii* i *A. uncinatum* zostały przeklasyfikowane w *Neotyphodium coenophialum*, *N. typhinum*, *N. lolii*, *N. chisosum*, *N. starrii* i *N. uncinatum*. Bezpłciowe formy endofitów – anamorfy, czyli grzyby w stadium konidialnym należące do rodzaju *Neotyphodium*, rozwijają się w dojrzewających nasionach zainfekowanego gospodarza [93], zapewniając w ten sposób pionowe rozprzestrzenianie się symbiozy na następne pokolenia roślin. Niektóre endofity z tego rodzaju posiadają stadium epifityczne, w którym grzybnia rośnie na powierzchni liści [85]. W sprzyjających warunkach z anamorfy rozwija się podkładka telemorfy (stadium doskonałe *Epichloë*), niemniej oba stadia stanowią genetyczną jedność. Anamorfa, która utraciła możliwość przejścia w stadium telemorfy staje się aseksualnym endofitem mutualistycznym. Czasami może także następować hybrydyzacja poprzez łączenie się sąsiadujących ze sobą strzępek, jednak takie hybrydy nie mogą tworzyć konidiów. Są to więc aseksualne endofity żyjące jedynie w przestrzeniach międzykomórkowych żywiciela w postaci „unieszkodliwionych pasożytów”, zbudowanych z długich strzępek pozbawionych haustoriów (ssawek) [16].

U endofitów posiadających cykl płciowy (telemorfy, np. gatunki z rodzaju *Epichloë*), wektorami poziomej transmisji zarodników mogą być owady i wiatr [11] (rys. 3). W przypadku anamorf (stadium bezpłciowe) transmisja na następne pokolenie następuje jedynie za pomocą zainfekowanych nasion. Rozprzestrzenianie się tych grzybów może więc następować zarówno





Rys. 1. Grzybnia *Neotyphodium* sp. widoczna w warstwie aleuronowej ziarniaka



Rys. 2. Międzykomórkowo rosnąca charakterystyczna grzybnia

w cyklu bezpłciowym jak i płciowym, przy czym oba rodzaje rozmnażania mogą wystąpić jednocześnie na danej roślinie [97].

Większość badań na świecie poświęconych jest rozpowszechnianiu się endofitów z rodzaju *Epichloë* i *Neotyphodium* oraz zasiedlonym przez te grzyby trawom [4, 73, 79]. Najczęściej występują one u gatunków z rodzaju *Lolium* i *Festuca*, które są szczególnie ważne zarówno dla upraw pastewnych oraz trawnikowych [30, 88]. Są doniesienia o zasiedlaniu także *Bromus* spp., *Agrostis* spp., *Phleum pratense* L. i innych gatunków traw z rodzajów *Elymus*, *Anthoxanthum*, *Deschampsia*, *Koeleria*, *Holcus* występujących na naturalnych użytkach [88]. Leuchtman [49] podaje, że 290 gatunków traw jest zasiedlonych przez endofity i sugeruje, że 20–30% gatunków traw na świecie może być przez nie zasiedlonych. Márquez i wsp. [56] dokładnie opisali endofity zasiedlające rośliny *Dactylis glomerata* pochodzące z 10 różnych rejonów Hiszpanii. W wielu pracach znaleźć można informacje o 100% porażeniu traw na pastwiskach [27, 70]. Lewis [51] donosi, że w wielu europejskich krajach trawy, a w szczególności dzikie populacje *Lolium perenne*, są często zasiedlane przez grzyby endofityczne. W Polsce badania nad endofitami dotyczyły jedynie kilku odmian *L. perenne* oraz jednej odmiany *F. pratensis* [62, 63]. Uzyskane wyniki wykazały stosunkowo niskie zasiedlenie ziarniaków u odmian życicy trwałej, a dość wysokie u kostrzewy łąkowej odmiany Pasja (52%).

### 3. Metody identyfikacji

Grzybnia endofitów z rodzaju *Neotyphodium* zasiedla warstwę aleuronową ziarniaków oraz warstwę epidermalną dojrzałych roślin, a zakażone trawy nie wykazują zewnętrznych objawów obecności endofitów. Z tego względu metody stosowane do ich wykrywania muszą być czułe i dostosowane do cyklu rozwojowego grzyba.



Rys. 3. Stroma *Epichloë* spp. na pędach kwiatostanowych wiechliny łąkowej

Dlatego też metody diagnostyczne są oparte głównie na technikach mikroskopowych (metody barwieniowe), serologicznych (metoda immunologiczna) lub molekularnych [95].

Do wykrywania obecności grzybów z rodzaju *Neotyphodium* na trawach podaje się następujący podział stosowanych metod [69]:

- a) metody bezpośrednie:
  - izolacja grzybów z pochwy liściowej lub ziarniaka,
  - badanie zawartości alkaloidów w nasionach i roślinach,
- b) metody mikroskopowe:
  - barwienie różem bengalskim,
  - barwienie błękitem anilinowym,
  - metoda fluorescencyjna,
- c) metody serologiczne:
  - ELISA,
  - immunologiczna,
- d) metody molekularne.

Powyższe metody różnią się pracochłonnością, kosztami, efektywnością i czułością wykrywania grzybni endofitów [69, 95], ale tylko stosując metodę fluorescencyjną i metody bezpośrednie można stwierdzić obecność żywej grzybni *Neotyphodium* w nasionach traw. Jednak dla oceny zasiedlenia nasion przez endofity, jedyną metodą zalecaną przez Międzynarodowy Związek Oceny Nasion – ISTA (International Seed Testing Association), jest metoda immunologiczna.

#### 4. Alkaloidy wytwarzane przez endofity z rodzaju *Neotyphodium*

Szkodliwość grzybów endofitycznych z rodzaju *Neotyphodium* w stosunku do zwierząt roślinożernych związana jest z wytwarzaniem niebezpiecznych dla zdrowia kręgowców alkaloidów, głównie lolitremu oraz ergowaliny [52]. W niektórych krajach, np.: Nowej Zelandii i Stanach Zjednoczonych, choroby zwierząt wywoływane przez te toksyny stanowią poważny problem gospodarczy [99]. Zainteresowanie prowadzeniem badań nad endofitami w Europie jest stosunkowo niewielkie, co jest związane z rzadkim występowaniem przypadków chorób, wywołanych przez alkaloidy produkowane przez te grzyby wśród bydła na tym terenie. Europejskie trwałe użytki zielone, istotne z punktu widzenia produkcji zwierzęcej, zawierają gatunki traw (np. *L. perenne*, *F. arundinacea*) powszechnie zasiedlane przez grzyby z rodzaju *Neotyphodium*, a liczba gatunków traw zasiedlonych przez endofity w Europie jest większa, niż w przypadku innych kontynentów. Jednak użytki te wykazują dużą różnorodność florystyczną, co może ograniczać potencjalny negatywny wpływ endofitów na zwierzęta [98].

Znanych jest kilka rodzajów alkaloidów, które mogą być wytwarzane przez grzyby endofityczne. Są to przede wszystkim tzw. alkaloidy ergotynowe (w tym ergowalina), nasycone aminopirrolpirazyny (loliny), indolditerpenoidy (lolitrem) i alkaloidy pirolopirazynowe (peramina) [20]. Alkaloidy ergotynowe znane są jako działające szkodliwie głównie na roślinożerne kręgowce, choć udokumentowany został również ich wpływ na niektóre owady [13]. Objawy zatrucia zwierząt są podobne do działania farmakologicznego tych alkaloidów (zwąężenie naczyń, trudności reprodukcyjne) [67]. Lolitrem jest toksyczny dla ssaków, zwłaszcza roślinożernych pasących się na terenach bogatych w zasiedloną przez endofity życię trwałą. Natomiast działanie peraminy w odróżnieniu do innych alkaloidów polega na odstraszeniu żerujących owadów [74].

Z danych literaturowych wynika, że karmienie bydła paszą zawierającą już 0,05 ppm ergowaliny (mg ergowaliny/kg s.m.) może istotnie wpływać na fizjologię zwierzęcia (np. wzrost temperatury ciała u bydła poddanego działaniu wysokiej temperatury powietrza w czasie upal-

nego lata) [22]. Progowe zawartości ergowaliny w diecie, które wywołują objawy kliniczne w USA zostały oszacowane na poziomie 0,4–0,7 ppm u bydła, 0,3–0,5 ppm u koni i 0,8–1,2 ppm u owiec. Graniczne wartości dla tego alkaloidu mogą jednak się zmieniać, ponieważ środowisko również odgrywa rolę w rozwoju klinicznych objawów choroby powodowanej przez ergowalinę [1]. Jakkolwiek już stężenie na poziomie 0,2–0,3 ppm może powodować wymierne efekty fizjologiczne tzw. toksyczność chroniczną objawiającą się np. zmniejszeniem produkcji mleka, czy zmniejszeniem masy ciała [65] i dlatego może być potencjalną przyczyną wpływającą na wydajność zwierząt gospodarskich.

Ważnymi czynnikami warunkującymi proces produkcji alkaloidów przez grzyby endofityczne, są warunki pogodowe (przede wszystkim ilość opadów atmosferycznych i temperatura powietrza) panujące na terenie, na którym występują trawy zasiedlone przez endofity [76]. Wzmóżona produkcja alkaloidów przez grzyby endofityczne odbywa się, gdy roślina zasiedlona przez endofita zostaje poddana stresowi suszy [98].

W wielu krajach prowadzone są badania nad endofitami, które nie wytwarzają szkodliwych dla zwierząt alkaloidów. Przy pomocy takich wyselekcjonowanych izolatów grzyba przeprowadza się inokulację traw [45], a w wielu przypadkach proces ten jest skomercjalizowany [41, 48]. Jednocześnie w badaniach znacznym zainteresowaniem cieszą się zagadnienia związane z tym, w jaki sposób wpłynąć na endofity, aby zaprzęstały wytwarzania szkodliwych alkaloidów. Badania dotyczące możliwości wyeliminowania ergowaliny z kompleksu endofit – trawa potwierdziły, że w wyniku genetycznych modyfikacji endofita można spowodować zahamowanie produkcji tego alkaloidu [60]. Następuje to poprzez oddziaływanie na geny warunkujące wytwarzanie syntetazy peptydowej niezbędnej do produkcji ergowaliny.

#### 5. Choroby zwierząt wywoływane przez alkaloidy produkowane przez grzyby z rodzaju *Neotyphodium*

Znane są dwie groźne choroby u bydła, których czynnikiem sprawczym są alkaloidy wytwarzane przez endofity współżyjące z trawami na pastwiskach: “ryegrass staggers syndrome” i “fescue toxicosis” [83]. Do tej pory zidentyfikowano kilka alkaloidów odpowiedzialnych za słaby rozwój zwierząt pasących się lub karmionych trawami zasiedlonymi przez endofity [68]. Należą do nich alkaloidy sporyszowe (klawiny, kwas lizergowy i jego amidy, ergopeptyny), które są odpowiedzialne za “fescue toxicosis” u zwierząt hodowlanych. Są one produkowane przez endofity zasiedlające kostrzewę trzcinową i życię trwałą, odpowiednio *N. coenophialum* i *N. lolli*. Objawami ich działania u zwierząt może być zmniejszone pobieranie paszy, mniejszy przyrost masy



ciała, obniżona produkcja mleka, wzrost temperatury ciała, wzmożone pocenie się i ślinienie czy obniżenie wydajności reprodukcyjnej [23]. Oprócz alkaloidów sporyszowych w roślinach życicy po raz pierwszy zidentyfikowano także lolitrem (diterpeny indolu, paxilina, paxitriole, lolitriol) i jego obecność powiązano z neurotoksycnością u zwierząt zwaną jako “ryegrass staggers” [55]. Choroba objawia się spadkiem produkcji mleka, zaburzeniami ze strony układu nerwowego (m.in.: porażenie tylnych kończyn, spazmy) [57]. Ponadto stwierdzono, że w zasiedlonych przez endofity roślinach życicy, kostrzewy trzcinowej i innych gatunków traw ma miejsce produkcja innego związku pirolopirazynowego – alkaloidu peraminy [82]. Peramina posiada właściwości odstraszające owady, jednocześnie nie wpływa ujemnie na zdrowotność zwierząt roślinożernych [13]. *Si e g e l* i wsp. [82] podają, że jest ona obecna w większości traw zasiedlonych przez endofity, które wytwarzają także alkaloidy sporyszowe (50%), lolinowe (35%) i lolitremy (10%).

Wykazano, że stężenie alkaloidów w roślinie zależy zarówno od genotypu rośliny, rodzaju komórki, jak i pory roku oraz abiotycznych warunków środowiska [20]. *L y o n s* i wsp. [54] stwierdzili, że koncentracja alkaloidów sporyszowych, do których należy ergowalina, w kostrzewie łąkowej była wyższa przy zwiększonej dawce nawozów azotowych oraz wyższa w pochwach liściowych w porównaniu do blaszek liściowych. Zawartość zarówno lolitremu B, ergowaliny jak i peraminy na pastwiskach wykazuje sezonowe zróżnicowanie [29]. Najniższe stężenia tych alkaloidów występuje się na przełomie zimy i wczesnej wiosny, zaś najwyższe ich ilości na przełomie lata i jesieni [6, 29]. Ponadto niższa koncentracja lolitremu B była w odrastających po ścięciu roślinach. Często okres, w którym alkaloidy występują w trawach w najwyższych stężeniach, nie pokrywa się z czasem wystąpienia objawów chorobowych u zwierząt. Powodem tego jest ich kumulowanie się w tkance tłuszczowej, a następujące potem stopniowe uwalnianie (np. pod wpływem wysokiej temperatury). Tłumaczy to występowanie objawów chorobowych po pewnym czasie u zwierząt przeniesionych z pastwiska o dużej zawartości tego alkaloidu, na pastwisko od niego wolne [57].

Alkaloidy produkowane przez endofity wpływają również na pobieranie pokarmu przez zwierzęta. Badania przeprowadzone w USA wykazały, że bydło wypasane na pastwiskach, gdzie rośliny były zakażone endofitami, spędzało mniej czasu na pobieraniu pokarmu niż bydło wypasane na pastwiskach wolnych od endofitów. Można zatem sądzić, iż zwierzęta preferowały rośliny wolne od grzybów endofitycznych [39]. Pobieranie paszy zawierającej szkodliwe alkaloidy nie pozostaje również bez wpływu na wydajność oraz jakość produktów pochodzenia zwierzęcego. Badania przeprowadzone w Australii [71] wykazały, że bydło wypasane na pastwi-

skach porośniętych życią trwałą z wysoką zawartością lolitremu B, wytwarzało gorszej jakości mleko. Zawierało ono mniej tłuszczu i białka, niż mleko pochodzące od zwierząt, które wypasane były na pastwiskach wolnych od endofitów.

Ważnymi czynnikami warunkującymi proces produkcji alkaloidów przez grzyby endofityczne są warunki pogodowe, a przede wszystkim ilość opadów atmosferycznych i temperatura powietrza [76]. Wzmożona produkcja alkaloidów odbywa się gdy roślina zasiedlona przez nie zostaje poddana stresowi suszy [98].

Występowanie symptomów chorobowych w dużej mierze zależy od stanu fizjologicznego zwierzęcia oraz od ekstremalnych temperatur panujących na danym terenie [24]. Gdy wraz ze spożyciem toksyny zwierzę jest jednocześnie poddane działaniu wysokich temperatur, to następuje brak kontroli temperatury ciała i równowagi wodnej. Ponadto takie zwierzę spożywa mniej pokarmu, a z tym wiąże się spadek masy ciała. W chłodniejszych warunkach zwierzęta mogą cierpieć na choroby kończyn, spowodowane prawdopodobnie skurczem naczyń hamującym przepływ krwi, a związanym z działaniem ergowaliny.

*K e m p* i wsp. [43] donoszą, że znaczne stężenie ergowaliny występuje tylko latem i jesienią i tylko w niektórych latach. Siano lub kiszonka, zebrane w tych okresach mogą potencjalnie zawierać duże jej ilości, ale jeśli jej obecność w paszy jest na poziomie, który nie przekracza 50% suchej masy całkowitej dziennej dawki żywieniowej, to mało prawdopodobne wydaje się wystąpienie u zwierząt objawów klinicznych. Ponadto ergowalina w dalszym ciągu jest obecna w paszy nawet po kilku latach magazynowania. W związku z tym, przechowywanie zainfekowanych roślin lub słomy nie wpływa na obniżenie zawartości ergowaliny, a co za tym idzie nie czyni takiej paszy bezpieczniejszej dla zdrowia zwierząt. Proces kiszenia także nie zmniejsza toksycności, ani stężenia tego alkaloidu [26].

Z punktu widzenia szkodliwości pastwisk zainfekowanych przez grzyby endofityczne, najważniejsze jest monitorowanie produkcji lolitremu B oraz ergowaliny, gdyż właśnie te dwa alkaloidy odpowiadają za występowanie chorób u bydła.

## 6. Wpływ alkaloidów na odporność traw na stresy

Oprócz niekorzystnego wpływu alkaloidów na zwierzęta hodowlane, substancje te działają pozytywnie na wzrost i rozwój traw np. na zwiększenie odporności na szkodniki, czy odporności na suszę [13, 72]. Wiadomo również, że endofity wykazują znaczne zróżnicowanie pod względem ilościowej i jakościowej produkcji alkaloidów, co decyduje o ich przydatności do celów pastewnych lub trawnikowych [18, 50]. W Stanach

Zjednoczonych, Nowej Zelandii oraz w krajach Europy przeprowadzono wiele badań, które dokumentują podwyższoną odporność zainfekowanych przez grzyby endofityczne traw na stresy zarówno biotyczne, jak i abiotyczne. Jednak nie zawsze otrzymane wyniki są jednoznaczne. Niewątpliwie najlepiej udokumentowano wpływ obecności endofitów, a w zasadzie produkowanych przez nie alkaloidów, na odporność traw na stres suszy. Jednak jest wiele doniesień dotyczących wpływu tych związków także na inne stresy abiotyczne i biotyczne. Znane są informacje o ich wpływie na zimotrwałość, oszczędną gospodarkę azotem, lepszą przyswajalność fosforu, odporność na *Listronotus bonariensis*, głównego szkodnika pastwisk [74], chrząszcza *Phaedon cochleariae* (F.), niektóre mszyce *Rhopalsiphum maidis* i *Drosophila melanogaster* czy gąsienice *Spodeptera frugiperda* [84]. Również prowadzone są badania dotyczące wpływu grzybów endofitycznych na rozwój innych mikroorganizmów występujących na trawach [61, 63, 89].

### 6.1. Stresy abiotyczne

Endofity wzbudzają w roślinach traw mechanizmy tolerancji na suszę, jednakże cecha ta zależna jest od gatunku, odmiany i fazy rozwojowej, w jakiej znajduje się roślina [64]. Duże znaczenie ma też lepsza zdolność do regeneracji uszkodzeń po suszy. Ten korzystny aspekt obecności grzybów endofitycznych w trawach został najlepiej udokumentowany w przypadku kostrzewy trzcinowej [2, 3]. U innych gatunków traw, np. życicy trwałej wyniki badań dotyczące odporności na suszę nie są tak jednoznaczne [15, 25, 38, 92]. Elberse i West [25] stwierdzili, że endofity mogą wpływać na większą retencję wody w liściach, co skutkuje lepszą ochroną rośliny przed wysuszeniem. Hill i wsp. [38] oraz White i wsp. [92] nie obserwowali różnic w tolerancji na stres suszy między roślinami E+ i E-kostrzewy trzcinowej, jednak sugerowali, że endofity mogą wpływać pośrednio na morfologiczne i fizjologiczne przystosowania rośliny do unikania suszy, za pomocą mechanizmów pozwalających na utrzymanie właściwego stanu wody. Zaś Cheplick i wsp. [15] obserwowali genotypową zmienność zdolności roślin do odrastania po okresie suszy, na który to proces endofity nie miały wpływu lub odgrywały w nim nieznaczną rolę.

Malinowski i Belesky [55] stwierdzili, że endofity wpływają na oszczędną gospodarkę azotem i lepszą przyswajalność fosforu, a także poprawiają żywotność siewek i ich krzewienie, co potwierdzają australijskie badania przeprowadzone w 1999 i 2000 roku nad życicą trwałą [71].

W europejskich warunkach klimatyczno-glebowych korzystne efekty występowania endofitów w trawach w porównaniu do roślin nie zasiedlonych przez te grzyby nie są jednoznaczne. Badania nad czynnikami

abiotycznymi, takimi jak deficyt wody, koszenie, zacielenie, niskie nawożenie azotem, lub niskie pH gleby wykazały zróżnicowane reakcje roślin, w zależności od układu genotyp rośliny – genotyp endofita [53].

### 6.2. Stresy biotyczne

Potencjalną przydatność *Neotyphodium* spp. do zwalczania chorób roślin przez ich zainfekowanie pożądanymi endofitami tego rodzaju, było badane w doświadczeniach *in vitro* [81]. Badania te wykazały, że izolaty tych grzybów wyhodowane na płytkach agarowych hamowały wzrost kolonii licznych grzybów chorobotwórczych traw, w tym *Rhizoctonia solani*, *R. zeae*, *Bipolaris sorokiniana* i *Colletotrichum graminicola*, a aktywność przeciwgrzybicza różniła się między poszczególnymi izolatami. Jednak w naturze dla wielu mikroorganizmów obserwuje się niską korelację między skutkami antybiozy pomiędzy kulturami grzybów w warunkach laboratoryjnych, a oddziaływaniem na choroby w polu [21]. Potwierdzają to doświadczenia polowe prowadzone przez Burre i Bouton [12], które wykazały, że obecność endofitów nie dała ochrony roślinom kostrzewy trzcinowej przeciwko występującemu w glebie patogenowi *R. solani*. Również zakażone endofitami siewki kostrzewy trzcinowej nie były chronione przed infekcją *B. sorokiniana* [87] oraz patogenami często obserwowanymi na trawnikach: *Magnaporthe poae* i *Pythium aphanidermatum* [9]. Obecność endofitów w kostrzewie trzcinowej, czy życicy trwałej nie wydaje się także chronić przed wystąpieniem lub nasileniem zgorzeli podstawy źdźbła i korzeni powodowanej przez *Fusarium oxysporum*, *F. equiseti* i *Pythium acanthicum* [40]. Są też wyniki mówiące o tym, że niektóre izolaty endofitów mogą wpływać na zwiększoną podatność traw na choroby, np. w badaniach Funke i wsp. [30] trawy zakażone grzybami endofitycznymi były bardziej podatne na chorobę powodowaną przez grzyby z rodzaju *Pythium*. Przypuszczalnie mogło to być pośrednim skutkiem wpływu endofitów na lepszy wzrost i wygląd trawnika, co z kolei sprzyjało rozwojowi choroby.

Dotychczasowe badania dokumentują odporność zainfekowanych przez grzyby endofityczne traw na 45 gatunków owadów należących do następujących rodzin: *Aphidiidae*, *Chrysomelidae*, *Cicadidae*, *Curculionidae*, *Gryllidae*, *Lygaeidae*, *Miridae*, *Noctuidae*, *Pyralidae*, *Scarabaeidae* i *Tenebrionidae*. Ponadto zasiedlone trawy są odporne na nicienie oraz niektóre choroby jak np. kostrzewa trzcinowa na grzyb *Rhizoctonia zeae* [63, 83]. Jednak oczywiste jest, że oddziaływanie pomiędzy endofitem i gospodarzem może być dosyć zmienne w zależności zarówno od warunków środowiska [75], jak i genotypu gospodarza [8, 25, 38].

Programy hodowlane mają na celu wprowadzanie użytecznych endofitów do odmian i populacji życicy

trwałej i kostrzew. Istniejące techniki inokulacyjne są odpowiednio udoskonalane do szybkiego rozwoju odmian zawierających endofity i do przenoszenia wskazanych endofitów pomiędzy gatunkami [47]. Techniki te są w dalszym ciągu modyfikowane, a ich efektywność kontrolowana w produkcji nasiennej. W czasie przechowywania dostosowuje się i kontroluje warunki środowiska zapewniające utrzymanie wysokiego poziomu żywotności endofitów [31]. Dodatkowo istniejąca wiedza odnośnie obecności endofitów i ich znaczenia sprawia, że ocena odmian i programy hodowlane przydatne do celów trawnikowych są bardziej efektywne i niezawodne.

## 7. Występowanie endofitów w Polsce i na świecie

Współzycie traw z grzybami znane jest od dawna, ale intensywny rozwój badań nad tą grupą organizmów nastąpił w latach 80-tych XX wieku. Badania przeprowadzone w wielu krajach potwierdziły wcześniejsze przypuszczenia o powszechnym występowaniu endofitów w trawach. Obecność tych grzybów stwierdzono w wielu krajach świata, jednak najwięcej informacji pochodzi z Ameryki Południowej, Nowej Zelandii i Australii, gdzie średnia zawartość endofitów w trawach na pastwiskach sięgała nawet 100% [27, 70]. Wysokie zasiedlenie traw w tych rejonach świata związane jest z częstym narażeniem roślin na stresy środowiskowe. Są również znane doniesienia o występowaniu endofitów w chłodniejszych rejonach np. w Finlandii [88], czy Japonii [44]. Lewis [52] w swojej pracy podaje, że w latach 1987–1997 obecność endofitów w trawach została potwierdzona w 22 krajach europejskich, w tym również w Polsce i występowały one w ok. 50% przebadanych dzikich populacji europejskich traw.

Krajowe badania dotyczące zasiedlenia runi grzybami z rodzaju *Neotyphodium* wybranych trwałych użytków zielonych na terenie Polski, wykazały, że organizmy te występują powszechnie na pospolitych gatunkach traw. Obecność grzybów endofitycznych stwierdzono w roślinach ekotypów życicy trwałej (*Lolium perenne* L.), życicy wielokwiatowej (*L. multiflorum* Lam.), kostrzewy łąkowej (*Festuca pratensis* Huds.), kostrzewy czerwonej (*F. rubra* L.), kostrzewy trzcinowej (*F. arundinacea* Schreb.), kostrzewy nitkowatej (*F. capillata* Lam.), kostrzewy olbrzymiej (*F. gigantea* L.), kostrzewy owczej (*F. ovina* L.), tymotki łąkowej (*Phleum pratense* L.), wiechliny łąkowej (*Poa pratensis* L.) oraz śmiałka darniowego (*Deschampsia caespitosa* (L.) P.B.) [64, 96, 100]. Wyniki badań przeprowadzonych w innych regionach Europy i świata potwierdzają, że wiele gatunków traw może być zasiedlanych przez endofity z rodzaju *Neotyphodium* [52, 77, 88, 99].

Ju i wsp. [42] twierdzą, że głównym czynnikiem wpływającym na wahania częstotliwości występowania

endofitów w roślinach jest temperatura. Ich badania wykazały, że niższa częstotliwość występowania tych grzybów w uprawach kostrzewy trzcinowej była zimą i wiosną, gdy średnie miesięczne temperatury były często poniżej minimalnej temperatury wzrostu endofitów, a powyżej minimalnej temperatury dla wzrostu roślin. Można jednak przypuszczać, że oprócz czynnika temperaturowego, może to być związane z jarowizacją, oraz fizjologicznymi i morfologicznymi zmianami zachodzącymi w roślinach. Interakcja pomiędzy endofitem i genotypem rośliny może wpływać na zmienność fenotypową populacji, faworyzując genotypy zasiedlone i przyczyniając się do tzw. zmian mikroewolucyjnych [14]. Trawy zasiedlone przez endofita mogą mieć podwyższoną przeżywalność oraz większą masę części generatywnych i wegetatywnych [19]. Wiosenny odrost roślin zasiedlonych przez endofity może przewyższać odrost roślin wolnych od grzybów symbiotycznych [89]. To z kolei może sprzyjać wypieraniu roślin nie zasiedlonych przez zasiedlone ze stanowisk, zwłaszcza tych o znacznym stopniu zróżnicowania. Ponadto obecność endofitów może wpływać na zahamowanie kiełkowania nasion w warunkach deficytu wodnego, ograniczając tym samym ryzyko wypadania siewek i straty związane ze słabszymi wschodami polowymi [35]. Jednocześnie stwierdzono, że obecność endofitów nie wpływa bezpośrednio na kiełkowanie, jednak ważny jest efekt pośredni, którym jest przedłużenie czasu wzrostu roślin mącznych w czasie rozwijania się i dojrzewania nasion [36].

Oprócz udokumentowanej obecności endofitów w roślinach traw, wiele badań dotyczyło obecności tych grzybów w nasionach [10, 18, 20, 30, 43, 46], gdyż jest to jedyny, jak do tej pory potwierdzony, sposób ich rozprzestrzeniania się. Wykazały one, że nasiona wielu gatunków traw są często zasiedlane przez endofity, a najczęściej obserwowano je u gatunków z rodzaju *Festuca* i *Lolium perenne*. Krajowe badania potwierdzają, że nasiona traw są często zasiedlane przez grzyby endofityczne, czasami w znacznych ilościach (nawet do 98% w przypadku nasion *Festuca ovina* odmiany Jolka) [62, 63, 95, 96]. Stwierdzić również należy, że wśród badanych gatunków traw zasiedlane przez endofity są zarówno nasiona odmian gazonowych, jak i pastewnych. Niepokojąca jest obecność tych grzybów zwłaszcza w odmianach pastewnych. Odmiany te stosowane są na łąki i pastwiska, a produkowane przez nie szkodliwe alkaloidy, mogą stwarzać zagrożenie dla zwierząt.

## 8. Podsumowanie

Od końca lat 90-tych XX wieku główną strategią jest poszukiwanie takich asocjacji endofit-roślina, które miałyby pozytywny wpływ na właściwości rolnicze traw, a nie wytwarzały alkaloidów (lolitremu i ergowaliny)



szkodliwych dla zwierząt. Prace w tym kierunku prowadzone są głównie w krajach, gdzie trawy, a zwłaszcza życica trwała i kostrzewa trzcinowa, są poddane poważnym stresom biotycznym i abiotycznym i gdzie istnieją oczywiste korzyści w uprawie traw zasiedlonych przez endofity [37]. Jedną ze strategii polega na znalezieniu w naturze takiego związku endofita z trawą, który pozwoliłby na zwiększenie pożądaných cech u rośliny, a zmniejszenie niepożądanych. Inną strategią jest usunięcie z rośliny endofita, który ją zasiedla i ponowne wprowadzenie izolatu wytwarzającego niewielkie ilości alkaloidów [10].

## Piśmiennictwo

- Aldrich C.G., Paterson J.A., Tate J.L., Kerley M.S.: The effects of endophyte infected tall fescue consumption on diet utilization and thermal regulation in cattle. *J. Anim. Sci.* **71**, 164–170 (1993)
- Arachevaleta M.C., Bacon C.W., Hoveland C.S., Radcliffe D.E.: Effect of the tall fescue endophyte on plant response to environmental stress. *Agronomy J.*, **81**, 83–90 (1989)
- Bacon C.W.: Abiotic stress tolerances (moisture, nutrients) and photosynthesis in endophyte-infected tall fescue. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **44**, 123–141 (1993)
- Bacon C.W., Hill N.S. eds.: *Neotyphodium/grass interactions*. Plenum Press, New York. (1997)
- Bacon C.W., Porter J.K., Robbins J.D., Luttrell E.S.: *Epichloë typhina* from toxic tall fescue grasses. *Appl. Environ. Microbiol.* **34**, 576–581 (1977)
- Ball O.J.P., Prestidge R.A., Sprosen J.M.: Interrelationships between *Acremonium lolii*, Peramine, and Lolitrem B in Perennial Ryegrass. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(4), 1527–1533 (1995)
- Barker G.M., Pottinger R.P., Adison P.J., Prestidge R.A.: Effect of *Lolium* endophyte fungus infections on behavior of adult Argentine stem weevil. *New Zealand J. Agric. Res.* **27**, 271–277 (1984)
- Belesky D.P., Devine O.J., Pallas J.E., Jr, Springer W.C.: Photosynthetic activity of tall fescue as influenced by a fungal endophyte. *Phyotosynthetica*, **21**, 82–87 (1987)
- Blank C. A., Gwinn K. D.: Soilborne seedling diseases of tall fescue: influence of the endophyte *Acremonium coenophialum*. *Phytopathology*, **82**, 1089 (1992)
- Bouton J.H., Hopkins A.A.: Commercial applications of endophytic fungi. In *Clavicipitalean fungi: Evolutionary biology, chemistry, biocontrol and cultural impacts*. White J.F., Bacon C.W., Hywel-Jones N., Spatafora J.W. eds.; Marcel Dekker, Inc. New York Basel. p. 495–516 (2003)
- Bultman T.L., White J.F.Jr., Bowdish T.I., Welch A.M., Johnston J.: Mutualistic transfer of *Epichloë* spermatia by *Phorbia* flies. *Mycologia*, **87**, 182–187 (1995)
- Burpee L. L., Bouton J. H.: Effect of eradication of the endophyte *Acremonium coenophialum* on epidemics of *Rhizoctonia* blight in tall fescue. *Plant Dis.* **77**, 157–159 (1993)
- Bush L.P., Wilkinson H.H., Schardl C.L.: Bioprotective alkaloids of grass-fungal endophyte symbioses. *Plant Physiol.* **114**, 1–7 (1997)
- Cheplick G.P., Cho R.: Interactive effects of fungal endophyte infection and host genotype on growth and storage in *Lolium perenne*. *New Phytologist*, **158**, 183–191 (2003)
- Cheplick G.P., Perera A., Koulouris K.: Effect of drought on the growth of *Lolium perenne* genotypes with and without fungal endophytes. *Functional Ecology*, **14**, 657–667 (2000)
- Chlebicki A.: Od pasożytnictwa do mutualizmu, konsekwencje długotrwałych interakcji. *Kosmos – Problemy Nauk Biologicznych*, **53**, 69–73 (2004)
- Christensen M.J., Bennett R.J., Schmid J.: Growth of *Epichloë/Neotyphodium* and p-endophytes in leaves of *Lolium* and *Festuca* grasses. *Mycol. Res.* **106**, 93–106 (2002)
- Christensen M.J., Leuchtmann A., Rowan A.A., Tapper B.A.: Taxonomy of *Acremonium* endophytes of tall fescue (*Festuca arundinacea*), meadow fescue (*F. pratensis*) and perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Mycol. Res.* **97**, 1083–1092 (1993).
- Clay K.: Comparative demography of the three graminoids infected by systemic, Clavicipitaceae fungi. *Ecology*, **71**(2), 558–570 (1990)
- Clay K., Schardl C.: Evolutionary Origins and Ecological Consequences of Endophyte Symbiosis with Grasses. *The American Naturalist (Suppl.)*, **160**, 99–127 (2002)
- Cook R. J., K. E. Baker.: The nature and practice of biological control of plant pathogens. Am. Phytopathological Soc., St. Paul, Minnesota. pp. 539 (1983)
- Cornell C.N., Lueker J.V., Garner G.B., Ellis J.L.: Establishing ergovaline levels for fescue toxicosis, with and without endoparasites, under controlled climatic conditions. In: Joost R.E., Quisenberry S.E. (Eds.). *Proceedings of the International Acremonium/Grass Interactions*. Louisiana Agricultural Experiment Station, Baton Rouge: 75–79 (1990)
- Cross D.L.: Toxic effects of *Neotyphodium coenophialum* in cattle and horses. *Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Neotyphodium/Grass Interaction Symposium*. 219–235 (2000)
- Dougherty C.T., Lauriault L.M., Bradley N.W., Gay N., Cornelius P.L.: Induction of tall fescue toxicosis in heat-stressed cattle and its alleviation with thiamin. *J. Anim. Sci.* **69**, 1008–1018 (1991)
- Elbersen H.W., West C.P.: Growth and water relations of field-grown tall fescue as influenced by drought and endophyte. *Grass and Forage Science*, **51**, 333–342 (1996)
- Fletcher L.R.: Managing ryegrass-endophyte toxicosis. In: Roberts C.A., West C.P., Spiers D.E. (eds), *Neotyphodium* in cool-season grasses. Blackwell Publ. 229–241 (2005)
- Fletcher L.R., Easton H.S.: Using endophytes for pasture improvement in New Zealand. *Proc. of the 4<sup>th</sup> International Neotyphodium/Grass Interactions Symposium*, Soest, Germany, 149–162 (2000)
- Fletcher L.R., Harley I.C.: An association of a *Lolium* endophyte with ryegrass staggers. *New Zealand Vet. J.* **29**, 185–186 (1981)
- Fletcher L.R., Lane G.A., Baird D.B., Davies E.: Seasonal variations of alkaloids concentrations in two perennial ryegrass-endophyte associations. *Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Neotyphodium/Grass Interactions Symposium*, 535–542 (2000)
- Funk C.R., Belanger F.C., Murphy J.A.: Role of endophytes in grasses used for turf and soil conservation. In: *Biotechnology of endophytic fungi of grasses*. Bacon Ch.W., White J.F.Jr. (eds). CRC Press., Boca Raton, 201–209 (1994)
- Funk C.R., Clarke B.B.: Turfgrass breeding – with special reference to turf-type perennial ryegrass, tall fescue and endophytes. *The 6<sup>th</sup> Internat. Turf Res. Conf.*, Tokio, July 31 August, 3–10 (1989)
- Funk C.R., White J.F.Jr.: Use of natural and transformed endophytes for turf improvement. In Bacon and Hill ed., *Neotyphodium/Grass Interactions*, Plenum Press, New York. (1997)
- Gallagher R.T., Hawkes A.D., Stewart J.M.: Rapid determination of the neurotoxin lolitrem B in perennial ryegrass by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromat.* **321**, 217–226 (1985)



34. Glenn A.E., Bacon C.W., Price R., Hanlin R.T.: Molecular phylogeny of *Acremonium* and its taxonomic implications. *Mycologia*, **88**, 369–383 (1996)
35. Gundel P.E., Maseda P.H., Vila-Aiub M.M., Ghersa C.M., Benech-Arnold R.: Effects of *Neotyphodium* fungi on *Lolium multiflorum* seed germination in relation to water availability. *Annals of Botany*, **97**, 571–577 (2006)
36. Gundel P.E., Maseda P.H., Ghersa C.M., Benech-Arnold R.: Effects of the *Neotyphodium* endophyte fungus on dormancy and germination rate of *Lolium multiflorum* seeds. *Austral Ecology*, **31**, 767–775 (2006)
37. Hill N.S., Bouton J.H., Thompson F.N., Hawkins C.S., Hoveland C.S., Cann M.A.: Performance of tall fescue germplasm bred for high and low ergot alkaloids. *Crop Sci.* **42**, 518–523 (2002)
38. Hill N.S., Pachon J.G., Bacon C.W.: *Acremonium coenophialum*-mediated short- and long-term drought acclimation in tall fescue. *Crop Sci.* **36**, 665–672 (1996)
39. Hopkins A.A., Alison M.W.: Stand persistence and animal performance of tall fescue endophyte combinations in South Central USA. *Agronomy J.*, **98**, 1221–1226 (2006)
40. Hume D.E., Quigley P. E., Aldaoud R.: Influence of *Neotyphodium* infection on plant survival of diseased tall fescue and ryegrass. p. 171–173. In C.W. Bacon, and N.S. Hill (ed.) *Neotyphodium/grass interactions*. C.W. Bacon, and N.S. Hill (ed.) Plenum Press, New York. 171–173 (1997)
41. Johnson M.C., Dahlman D.L., Siegel M.R., Bush L.P., Latch G.C.M., Potter D.A., Varney D.R.: Insect feeding deterrents in endophyte-infected tall fescue. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**(3), 568–571 (1985)
42. Ju H.J., Hill N.S., Abbott T., Ingram K.T.: Temperature influences on endophyte growth in tall fescue. *Crop Sci.* **46**, 404–412 (2006)
43. Kemp H., Bourke C.H., Wheatley W.: Endophytes of perennial ryegrass and tall fescue. *Primefacts*, **535**, 1–5 (2007)
44. Koga H., Tsukiboshi T., Uematsu T.: Incidence of the endophyte fungus *Acremonium uncinatum* in Meadow Fescue (*Festuca pratensis*) ecotypes in Hokkaido. *Bull. Natl. Grassl. Res. Inst.* **49**, 35–41 (1993)
45. Koga H., Hirai Y., Kanda K., Tsukiboshi T., Uematsu T.: Successive transmission of resistance to bluegrass webworm to perennial ryegrass and tall fescue plants by artificial inoculation with *Acremonium* endophytes. *Japan Agric. Res. Quart.* **31**, 109–115 (1997)
46. Latch G.C.M., Christensen M.J.: Ryegrass endophyte, incidence and control. *N.Z.J. Agric. Res.* **25**: 443–448 (1982)
47. Latch G.C.M., Christensen M.J.: Artificial infection of grasses with endophytes. *Ann. Appl. Biol.* **107**, 17–24 (1985)
48. Latch G.C.M., Hunt W.F., Musgrave D.R.: Endophytic fungi affect growth of perennial ryegrass. *N.Z.J. Agric. Res.* **28**, 165–168 (1985)
49. Leuchtmann A.: Systematics, distribution and host specificity of grass endophytes. *Natural Toxins* **1**, 150–162 (1992)
50. Leuchtmann A., Schmidt D., Bush L.P.: Different levels of protective alkaloids in grasses with stroma-forming and seed-transmitted *Epichloë/Neotyphodium* endophytes. *J. Chem. Ecol.* **26**, 1025–1036 (2000)
51. Lewis G.C.: A review of research on endophytic fungi worldwide, and its relevance to European grassland, pastures and turf. The 2<sup>nd</sup> International Conference on Harmful and Beneficial Microorganisms in Grassland, Pastures and Turf. Krohn K., Paul V.H. (eds.) *IOBC wprs Bulletin*, **19** (7), 17–25 (1996)
52. Lewis G.C.: *Neotyphodium* endophytes: incidence, diversity, and host in Europe. Proc. of the 4<sup>th</sup> International *Neotyphodium/Grass Interaction* Symposium. Soest, Germany. 123–130 (2000)
53. Lewis G.C.: Effects of biotic and abiotic stress on the growth of three genotypes of *Lolium perenne* with and without infection by the fungal endophyte *Neotyphodium lolii*. *Ann. Appl. Biol.* **144**, 53–63 (2004)
54. Lyons P.C., Plattner R.D., Bacon C.W.: Occurrence of peptide and clavinet ergot alkaloids in tall fescue grass. *Science*, **232**, 487–489 (1986)
55. Malinowski D.P., Belesky D.P.: Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: mechanisms of drought and mineral stress tolerance. *Crop Sci.* **40**, 923–940 (2000)
56. Márquez S.S., Bills G.F., Zabalgoizcoa I.: The endophytic community of *Dactylis glomerata*. In Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Symposium on Fungal Endophytes of Grasses, eds. A.J. Popay and E.R. Thom, pp. 69–73. Christchurch, New Zealand. New Zealand Grassland Association (2007)
57. Miyazaki S., Ishizaki I., Ishizaka M., Kanbara T., Ishiguro-Takeda Y.: Lolitrem B residue in fat tissues of cattle consuming endophyte-infected perennial ryegrass straw. *J. Vet. Diagn. Invest.* **16**, 340–342 (2004)
58. Morgan-Jones G., Gams W.: Notes on Hyphomycetes. XLI. An endophyte of *Festuca arundinacea* and the anamorph of *Epichloë typhina*, new taxa in one of two new sections of *Acremonium*. *Mycotaxon.* **15**, 311–318 (1982)
59. Müller Ch. B., Krauss J.: Symbiosis between grasses and asexual fungal endophytes. *Current Opinion Plant Biology*, **8**, 450–456 (2005)
60. Panaccione D.G., Johnson R.D., Wang J., Young C.A., Darrongkool P., Scott B., Schardl C.L.: Elimination of ergovaline from a grass-*Neotyphodium* endophyte symbiosis by genetic modification of the endophyte. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**(22), 12820–12825 (2001)
61. Pańka D.: Meadow fescue infestation with *Neotyphodium uncinatum* and influence of endophyte on growth of microorganisms in vitro. In: Lloveras J., Gonzales-Rodriguez A., Vazquez-Yanez O., Pineiro J., Santamaria O., Olea L., Poblaciones M.J. (eds). Sustainable Grasslands Productivity. *Grassland Science in Europe*, **11**, 469–471 (2006)
62. Pańka D., Sadowski C.: Occurrence of fungal endophytes in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) cultivars in Poland. In: Multi-functional grasslands quality forages, animal products and landscapes. Durand J.L. et al., (eds.). *Grassland Science in Europe* **7**, 540–541 (2002)
63. Pańka D., Podkówka L., Lamparski R.: Preliminary observations on the resistance of meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.) infected by *Neotyphodium uncinatum* to diseases and pests and native value. In: Proc. of the 5<sup>th</sup> International Symposium on *Neotyphodium/Grass Interactions*. Kallenbach R. et al. (eds.). Fayetteville, AR USA, May 23–26, 2004. **401**, 88–90 (2004)
64. Pańka D., Żurek G.: Występowanie grzybów endofitycznych w trawach gazonowych a ich podatność na stres suszy. *Łąkarstwo w Polsce*, **8**, 45–54 (2005)
65. Peters C.W., Grigsby K.N., Aldrich C.G., Paterson J.A., Lipsey R.J., Kerley M.S., Garner G.B.: Performance, forage utilization, and ergovaline consumption by beef cows grazing endophyte fungus infected tall fescue, endophyte tall fescue, or orchardgrass pastures. *J. Anim. Sci.* **70**, 1550–1561 (1992)
66. Pfanmüller M., Eggstein S., Schöberlein W.: Endophytes in European varieties of *Festuca* species. *IOBC wprs Bulletin*, **17/1**, 101–109 (1994)
67. Plowman T.C., Leuchtmann A., Blaney C., Clay K.: Significance of the fungus *Balansia cyperi* infecting medicinal species of *Cyperus* (Cyperaceae) from Amazonia. *Economic Botany*, **44**, 452–462 (1990)

68. Porter J.K.: Chemical constituents of grass endophytes. In: C.W. Bacon and J.F. White, Jr. (ed) *Biotechnology of endophytic fungi of grasses*. CRC Press, Boca Raton, FL. 103–123 (1994)
69. Prończuk M.: Endofity traw – znaczenie, występowanie i metody wykrywania. *Przegląd literatury. Biul. IHAR*, **235**, 297–309 (2005)
70. Reed K.M., Walsh J.R., McFarlane N.M., Cross P.A.: Australian perennial ryegrass pasture, endophyte frequency and associated alkaloid concentrations. *Proc. of the 4<sup>th</sup> International Neotyphodium/Grass Interactions Symposium*, Soest, Germany. 31–39 (2000)
71. Reed K.: The significance of the ryegrass endophyte, *Neotyphodium lolii*, in Victorian pasture. [www.animal-welfare.org.au/comm/download/abs02.html](http://www.animal-welfare.org.au/comm/download/abs02.html). (2002)
72. Richardson M.D., Hoveland C.S., Bacon C.W.: Photosynthesis and stomatal conductance of symbiotic and nonsymbiotic tall fescue. *Crop Sci.* **33**, 145–149 (1993)
73. Roberts C.A., West C.P., Spiers D.E. eds: *Neotyphodium in cool-season grasses*. Ames, IA: Blackwell Publishers. (2005)
74. Rowan D.D., Dymock J.J., Brimble M.A.: Effect of fungal metabolite peramine and analogs on feeding and development of argentine stem weevil (*Listronotus bonariensis*). *J. Chem. Ecol.* **16**, 1683–1695 (1990)
75. Saikkonen K., Faeth S.H., Helander M., Sullivan T.J.: Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. *Ann. Rev. Ecology Systematics*, **29**, 319–343 (1998)
76. Salminen S.O., Richmond D.S., Grewal S.K., Grewal P.S.: Influence of temperature on alkaloid levels and fall armyworm performance in endophytic tall fescue and perennial ryegrass. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **115**, 417–426 (2005)
77. Scharld C.L., Philips T.D.: Protective grass endophytes. Where are they from and where are they going? *Plant Dis.* **81**, 430–438 (1997)
78. Scharld C.L., Leuchtman A.: The *Epichloë* endophytes of grasses and the symbiotic continuum. In *The fungal community: its organization and role in the ecosystem*, 3<sup>rd</sup> ed., eds. J. Dighton, J.F. White, Jr., and P. Oudemans, Boca Raton, FL. CRC Press. pp. 475–503 (2005)
79. Scharld C.L., Leuchtman A., Spiering M.J.: Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Ann. Rev. Plant Biology*, **55**, 315–340 (2004)
80. Schulthess F.M., Faeth S.H.: Distribution, abundances, and associations of the endophytic fungal community of *Arizona fescue* (*Festuca arizonica*). *Mycol.* **90**, 569–578 (1998)
81. Siegel M.R., Latch G.C.M.: Expression of antifungal activity in agar culture by isolates of grass endophytes. *Mycol.* **83**, 529–537 (1991)
82. Siegel M.R., Latch G.C.M., Bush L.P., Fannin F.F., Rowan D.D., Tapper B.A., Bacon C.W., Johnson M.C.: Fungal endophyte-infected grasses: Alkaloid accumulation and aphid response. *J. Chem. Ecol.* **16**, 301–315 (1990)
83. Siegel M.R., Latch G.C.M., Johnson M.C.: *Acremonium* fungal endophytes of Tall Fescue and Perennial ryegrass: significance and control. *Plant Dis.* **69/2**, 179–183 (1985)
84. Siegel M.R., Latch G.C.M., Johnson M.C.: Fungal endophytes of grasses. *Ann. Rev. Phytopathol.* **25**, 293–315 (1987)
85. Tadych M., White J.F.Jr.: Ecology of epiphyllous stages of endophytes and implications for horizontal dissemination. In *Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Symposium on Fungal Endophytes of Grasses*, eds. A.J. Popay and E.R. Thom, pp. 157–161. Christchurch, New Zealand. New Zealand Grassland Association. (2007)
86. Tan Y.Y.M., Spiering M.J., Scott V., Lane G.A., Christensen M.J., Schmid J.: In planta regulation of extension of an endophytic fungus and maintenance of high metabolic rates in its mycelium in the absence of apical extension. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5377–5383 (2001)
87. Trevathan L. E.: Performance of endophyte-free and endophyte-infected tall fescue seedlings in soil infected with *Cochliobolus sativus*. *Can. J. Plant Pathol.* **18**, 415–418 (1996)
88. Wäli P., Saikkonen K., Helander M., Lehtimäki S., Lehtonen P.: Seed transmitted endophytic fungi in wild grass populations in Finland. *Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Neotyphodium/Grass Interaction Symposium*. Soest. Germany. 93–96 (2000)
89. Wäli P.R., Helander M., Nissinen O., Saikkonen K.: Susceptibility of endophyte-infected grasses to winter pathogens (snow molds). *Canadian Journal of Botany*, **84**, 1043–1051 (2006)
90. White J.F.Jr.: Widespread distribution of endophytes in the Poaceae. *Plant Dis.* **71**, 340–342 (1987)
91. White J.F.Jr.: Systematic of the graminicolous Clavicipitaceae: applications of morphological and molecular approaches. In *Neotyphodium/Grass interactions*, eds. C.W. Bacon and N.S. Hill. New York. Plenum Press. pp. 27–39 (1997)
92. White J.F.Jr., Engelke M.C., Morton S.J., Johnson-Cicalese J.M., Ruemmele B.A.: *Acremonium* endophyte effects on tall fescue drought tolerance. *Crop Sci.* **32**, 1392–1396 (1992)
93. White J.F.Jr., Morgan-Jones G., Morrow A.C.: Taxonomy, life cycle, reproduction and detection of *Acremonium* endophytes. *Agriculture, Ecosystems Environment*, **44**, 13–37 (1993)
94. White J.F.Jr., Reddy P.V.: Examination of structure and molecular phylogenetic relationships of some Graminicolous symbionts in genera *Epichloë* and *Parepichloë*. *Mycologia*, **90**, 226–234 (1998)
95. Wiewióra B., Prończuk M.: Porównanie metody mikroskopowej i immunologicznej do wykrywania grzybów endofitycznych w nasionach traw. *Biul. IHAR*, **242**, 277–284 (2006)
96. Wiewióra B., Prończuk M., Ostrowska A.: Infekcja nasion traw przez endofity w kolejnych latach użytkowania plantacji. *Biul. IHAR*, **242**, 285–293 (2006)
97. Wille P.A., Aeschbacher R.A., Boller T.: Distribution of fungal endophyte genotypes in doubly infected grasses. *Plant J.* **18(4)**, 349–358 (1999)
98. Zabalgoeazcoa I., Bony S.: *Neotyphodium* research and application in Europe. *Neotyphodium in cool-season grasses*. Blackwell Publ. 27–33 (2005)
99. Zabalgoeazcoa I., Vázquez de Aldana B. R., Ciudad G., Criado G.: Fungal endophytes in grasses from semi-arid permanent grasslands of western Spain. *Grass and Forage Sci.* **58**, 94–97 (2003)
100. Żurek M., Wiewióra B., Żurek G.: Występowanie grzybów endofitycznych na trwałych użytkach zielonych województwa mazowieckiego. *Biul. IHAR*, **256**, 171–181 (2010)