

MONIKA ŻUREK <sup>1</sup>  
PIOTR OCHODZKI <sup>2</sup>  
BARBARA WIEWIÓRA <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Zakład Genetyki i Hodowli Roślin, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — PIB w Radzikowie

<sup>2</sup> Zakład Fitopatologii, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — PIB w Radzikowie

<sup>3</sup> Zakład Nasiennictwa i Nasionoznawstwa, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — PIB w Radzikowie

## Ocena zawartości ergowaliny w trawach runi wybranych trwałych użytków zielonych na terenie województwa mazowieckiego

### Evaluation of ergovaline content in swards of permanent grasslands in the Mazovia region

Celem badań była ocena zawartości ergowaliny w 71 próbach traw pochodzących z 24 użytków zielonych, w których wcześniej stwierdzono obecność grzybni endofitycznej. Były to ekotypy *Deschampsia caespitosa*, *Festuca arundinacea*, *F. pratensis*, *F. rubra* i *Lolium perenne*. Badanie zawartości ergowaliny w ekotypach zasiedlonych przez endofity (E+) przeprowadzono przy użyciu metody HPLC z detekcją fluorescencyjną. Zdolność grzybni endofitycznej do produkowania ergowaliny została stwierdzona w roślinach 4 z 5 badanych gatunków o stwierdzonym wcześniej zasiedleniu przez grzyby endofityczne. Nie produkowały jej jedynie endofity obecne w próbach *D. caespitosa*. Analizy wykazały, że produkcja ergowaliny jest cechą zmienną pod względem jakościowym oraz ilościowym nawet w obrębie jednego gatunku traw. Ponadto stwierdzono, że sposób użytkowania ma wpływ na produkcję ergowaliny przez grzyby endofityczne z rodzaju *Neotyphodium*.

**Słowa kluczowe:** endofity, ergowalina, kostrzewy, śmiełek darniowy, trawy, życica trwała

The aim of the studies was determination of the ergovaline content in 71 grass samples collected from 24 grasslands, in which hyphae of endophytic fungi were found. Ecotypes of *Deschampsia caespitosa*, *Festuca arundinacea*, *F. pratensis*, *F. rubra* and *Lolium perenne* were identified as the hosts. Determination of ergovaline content in biomass of the endophyte — containing (E+) ecotypes was done using the HPLC method with fluorescence detection. Ergovaline was found in 4 of 5 examined grass species earlier classified as the endophyte — infected. *D. caespitosa* was the only species in which the E+ ecotypes did not produce ergovaline. The ergovaline production showed high qualitative and quantitative variability even within one grass species. The intensity of pasture usage affected ergovaline production by endophytic fungi from the *Neotyphodium* genus.

**Key words:** endophyte, ergovaline, fescue, grasses, perennial ryegrass, tufted hairgrass

## WSTĘP

Badania dotyczące zasiedlenia runi wybranych trwałych użytków zielonych województwa mazowieckiego grzybami z rodzaju *Neotyphodium* wykazały, że organizmy te bytują powszechnie na pospolitych na tym terenie gatunkach traw. Obecność grzybów endofitycznych potwierdzono w przypadku ekotypów następujących gatunków: życica trwała (*Lolium perenne* L.), kostrzewa łąkowa (*Festuca pratensis* Huds.), kostrzewa czerwona (*Festuca rubra* L.), kostrzewa trzcinowa (*Festuca arundinacea* Schreb.) oraz śmiełek darniowy (*Deschampsia caespitosa*) (Żurek i in., 2010). Grzyby z rodzaju *Neotyphodium* bytując w tkankach traw produkują alkaloidy, czyli zasadowe związki organiczne zawierające układy cykliczne z co najmniej jednym zasadowym atomem azotu w pierścieniu. Alkaloidy toksyczne dla kręgowców i bezkręgowców, chronią roślinę wraz z zasiedlającym ją endofitem przed organizmami roślinożernymi (Schardl i in., 2006). Główne grupy alkaloidów produkowane przez endofity to: indol — diterpeny (np. lolitrem B) — działają neurotoksycznie na ssaki, ergotalkaloidy (np. ergowalina) toksyczne dla kręgowców i niektórych owadów, oraz dwie grupy alkaloidów o działaniu insektobójczym (toksycznym w stosunku do owadów): pyrrolopirazyny (np. peramina), (Hahn i in., 2007), oraz loliny, (np. *N*—formylololina, *N*—acetylololina) (Leuchtman i in., 2000). Z punktu widzenia obecności w runi pastwisk traw zainfekowanych przez grzyby endofityczne, najważniejsze jest monitorowanie występowania i ilości dwóch najbardziej szkodliwych dla zwierząt alkaloidów, a mianowicie lolitremu B oraz ergowaliny. Metabolity te, występując w paszy w wysokich stężeniach, wywołują znane jednostki chorobowe bydła, owiec, oraz koni:

- kołowaczna rajgrasowa — ryegrass staggers syndrome powodowana przez obecność lolitremu B w paszy. Choroba objawia się spadkiem produkcji mleka oraz zaburzeniami ze strony układu nerwowego (m.in.: porażenie tylnych kończyn, spazmy; Miyazaki i in., 2004). Dawka wywołująca objawy kliniczne wynosi 2 ppm (Bony i Delatour, 2000).
- fescue toxicosis — jednostka chorobowa wywoływana przez obecność ergowaliny w paszy, występująca u bydła i owiec. (Cross, 2000; Ball, 2007). Objawy toksyczności chronicznej (spadek masy ciała, zmniejszenie produkcji mleka, zmniejszenie przyrostów dobowych) występują przy dawce 0,2–0,4 ppm (mg ergowaliny/ kg s.m.), zaś objawy chorobowe występują przy dawkach 0,3–0,5 ppm (dla koni) i 0,4–0,7 ppm (dla bydła) (Bony i Delatour, 2000).

W wielu krajach, np. Nowej Zelandii czy Stanach Zjednoczonych, choroby zwierząt wywoływane przez endofity stanowią poważny problem (Zabalgogea i in., 2003). W Polsce badania nad endofitami dotychczas były prowadzone na niewielką skalę. Wynika z nich że mikroorganizmy te zasiedlają nasiona i rośliny powszechnie występujących gatunków traw (Pańka i Żurek, 2005; Wiewióra i in., 2008). Obecność endofitów stwierdzono także w odmianach traw o przeznaczeniu pastwiskowym (Wiewióra i in., 2006; 2008).

Zainteresowanie prowadzeniem badań nad endofitami w Europie jest stosunkowo niskie. Jest to związane z rzadkim, na naszym kontynencie występowaniem przypadków chorób bydła, wywoływanych przez alkaloidy produkowane przez grzyby endofityczne.

Jednakże, liczba gatunków traw zasiedlonych przez endofity w Europie, jest większa niż w przypadku innych kontynentów.

Celem pracy było określenie zawartości ergowaliny w próbach traw o potwierdzonej obecności grzybni endofitycznej pochodzących z trwałych użytków zielonych zlokalizowanych na terenie województwa mazowieckiego.

#### MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań pobrano podczas ekspedycji terenowych zorganizowanych w roku 2008 na terenie województwa mazowieckiego. Spenetrowano 24 użytki zielone pobierając 71 prób traw, reprezentujących 40 ekotypów następujących gatunków traw: *Deschampsia caespitosa* (2 ekotypy), *Festuca arundinacea* (1 ekotyp), *F. pratensis* (19 ekotypów), *F. rubra* (8 ekotypów) oraz *Lolium perenne* (10 ekotypów). Na każdym z badanych użytków oszacowano ilościowy udział każdego z gatunków, wyrażając go jako % pokrycia powierzchni (Dzwonko, 2007). Obecność grzybni endofitycznej badano przy użyciu metody mikroskopowej (Saha i in., 1988). Wyniki dotyczące zasiedlenia badanych ekotypów traw przez grzyby endofityczne z rodzaju *Neotyphodium*, zostały szczegółowo przedstawione w pracy Żurek i wsp. (2010 b).

Części nadziemne prób roślin ścięto, wysuszone w temperaturze 40°C oraz zmielono w celu poddania ich analizie pod kątem obecności ergowaliny. Wysuszoną i zmieloną próbkę (0,2–1,0 g) naważono do szklanych fiolek. Roztwór wzorca wewnętrznego został przygotowany następująco: winian ergotaminy (prod. SIGMA ALDRICH) rozpuszczono w metanolu do stężenia 1 mg/ml (roztwór bazowy). Następnie roztwór ten, w celu uzyskania wzorca wewnętrznego, został rozcieńczony w chloroformie do stężenia 1 µg/ml. Do badanej próbki dodano 10 ml chloroformu, 1 ml wzorca wewnętrznego oraz 1 ml M NaOH. Tak przygotowaną próbkę łagodnie mieszano na mieszadle (24 godziny), a następnie odwirowano. Odwirowany ekstrakt poddano oczyszczaniu na kolumnkach SPE (1,0 g żelu krzemionkowego Ergosil, 0,5 g bezwodnego siarczanu sodu, oddzielone od siebie papierowym filtrem). Kolumnkę kondycjonowano 5 ml chloroformu, następnie naniesiono 5 ml supernatantu. Ekstrakt powoli przepuszczano przez kolumnkę, przemywając ją dwa razy 1 ml roztworu chloroformu z acetonem (75:25) oraz 1,5 ml metanolu. Następnie alkaloidy wymyło 2,5 ml metanolu, a uzyskany roztwór zebrano w szklanej fiolece. W celu zagęszczenia badanego roztworu wysuszone go w strumieniu azotu, a następnie rozpuszczono w 500 µl metanolu. Analizę przeprowadzono na kolumnie Jordi RP (100 Å, 150 × 4,6 mm, 5 µm) z prekolumną BRP — 1 z wykorzystaniem detekcji fluorescencyjnej, przy długości fali wzbudzenia = 250 nm i długości fali emisji = 420 nm. Fazę mobilną stanowił roztwór acetonitrylu z 2,6 mM węglanem amonu (70:30 v:v). Prędkość przepływu fazy mobilnej wynosiła 1,0 ml/min. Zawartość ergowaliny w badanych próbach została odczytana z chromatogramów przy użyciu krzywej kalibracji podanej przez Craiga i wsp. (1994). Wyniki otrzymane z analizy poszczególnych prób roślin reprezentujących ekotyp danego gatunku potraktowano jako powtórzenia. Analiza pierwszych trzech prób wykonana w trzech powtórzeniach wykazała błąd analizy poniżej

5%. Wysoki jednostkowy koszt analizy spowodował, że oznaczenie przeprowadzono w jednym powtórzeniu.

#### WYNIKI I DYSKUSJA

Wyniki uzyskane w pracy wskazują, że nie wszystkie endofity zasiedlające trawy wchodzące w skład runi użytków zielonych w województwie mazowieckim, wytwarzają ergowalinę. Zdolność grzybni endofitycznej do produkowania ergowaliny została stwierdzona w roślinach 4 z 5 badanych gatunków o stwierdzonym wcześniej zasiedleniu przez grzyby endofityczne. Nie stwierdzono jej jedynie w próbach *D. caespitosa*. Badania wykazały, że najczęściej grzyby endofityczne zasiedlały rośliny *F. pratensis* (frekwencja na poziomie 64,3%). Ponadto endofity zasiedlające ten gatunek najczęściej charakteryzowały się zdolnością produkowania ergowaliny — 41,4% (tab. 1). Średnio endofity zasiedlały 10,3% wszystkich badanych prób traw, a 6,9% było zdolnych do produkcji ergowaliny.

Tabela 1

#### Występowanie endofitów i zawartość ergowaliny w trawach zebranych na terenie województwa mazowieckiego

##### Endophyte presence and ergovaline contents in grasses collected in the Mazovia region

Gatunek Species	Liczba prób No. of samples	Częstotliwość (%) prób z: Frequency (%) of samples with:	
		endofitami — endophytes	ergowaliną — ergovaline
<i>Deschampsia cespitosa</i>	68	2,9	0,0
<i>Festuca arundinacea</i>	12	8,3	8,3
<i>F. pratensis</i>	70	64,3	41,4
<i>F. rubra</i>	102	7,8	5,9
<i>F. ovina</i>	16	0,0	0,0
<i>F. capillata</i>	4	0,0	0,0
<i>Lolium perenne</i>	76	19,7	13,2
<i>L. multiflorum</i>	12	0,0	0,0
<i>Poa pratensis</i>	3	0,0	0,0
<i>P. nemoralis</i>	2	0,0	0,0
Średnio dla wszystkich prób Mean for all samples		10,3	6,9

Najwyższą średnią zawartość ergowaliny obserwowano w przypadku *F. rubra* (0,196 ppm), zaś najwyższa zaobserwowana jednostkowa zawartość ergowaliny wynosiła 1,298 ppm i wystąpiła w jedynej analizowanej próbie *F. arundinacea*. Wśród wszystkich badanych prób zaobserwowano również 30 prób nie zawierających tego alkaloidu. Średnia zawartość ergowaliny w suchej masie badanych ekotypów traw została przedstawiona w tabeli 2, zaś przykładowy chromatogram będący wynikiem badania zawartości ergowaliny na rysunku 1.

**Zawartość ergowaliny w próbach roślin badanych gatunków traw**  
**Ergovaline content in plant samples of the examined grass species**

Miejscowość Locality	Zawartość ergowaliny (ppm) w suchej masie badanych ekotypów traw Ergovaline content (ppm) in dry matter of examined grass ecotypes										średnio dla miejscowości mean for locality
	<i>Deschampsia caespitosa</i>		<i>Festuca arundinacea</i>		<i>Festuca pratensis</i>		<i>Festuca rubra</i>		<i>Lolium perenne</i>		
	n=	zakres range	n=	zakres range	n=	zakres range	n=	zakres range	n=	zakres range	
Borkowo						1	0,026				0,026
Brzezinka	1	PD			4	0,0–0,091			1	PD	0,030
Brzoza									1	PD	PD
Całowanie					4	0,0–0,080					0,028
Gorzewnica					4	0,0–0,085					0,034
Góra Kalwaria					4	0,0–0,091	1	0,260	1	0,016	0,077
Granica			1	1,298	2	0,023–0,049					0,457
Gwizdały					2	PD					PD
Koliszewo					3	0,011–0,749					0,269
Luszewo					2	0,069–0,106	1	0,207			0,127
Łopacianka											PD
Mordy-Pieńki					2	0,0–0,218	1	PD	1	0,026	0,061
Nowy Gródek					3	0,0–0,064					0,021
Okunin									2	0,0–0,034	0,017
Oronne	1	PD					1	0,133	3	0,026–0,080	0,063
Ostoje					2	0,101–0,106					0,104
Pierzchały					1	PD			2	PD	PD
Piskornia					1	PD					PD
Radzimowice									1	PD	0,002
Starogrody											
Stara Wieś					3	0,046–0,160					0,100
Szarłat					1	PD	1	PD	2	0,012–0,021	0,008
Tęczki					2	0,021–0,052	1	0,545	1	0,041	0,165
Tyrzyn					2	0,0–0,106					0,053
Wilków Polski					1	0,016	1	0,394			0,205
Średnio Mean		0,0		1,298		0,059		0,196		0,022	0,082

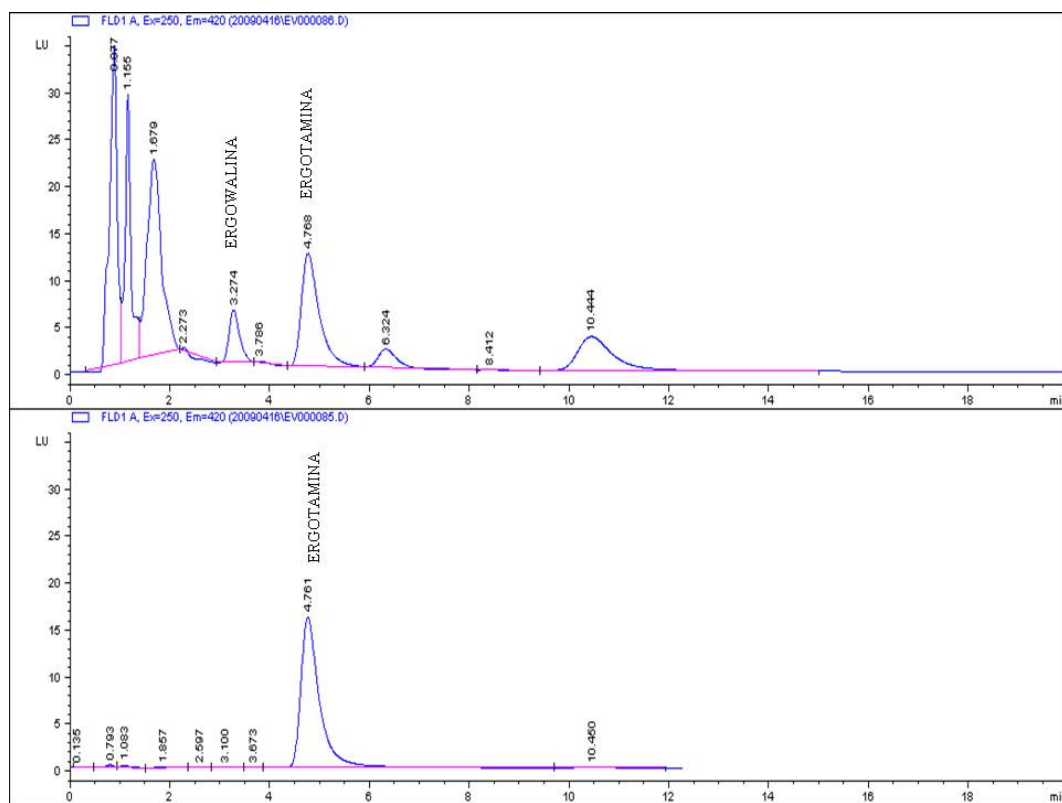
n= Liczba prób; Number of samples

PD — Poniżej poziomu detekcji; Below the detection level

Przedstawione w pracy wyniki dotyczące zawartości ergowaliny były częściowo prezentowane na konferencji (Żurek i in., 2010 a). Wyniki wykazały, że endofity występujące na *L. perenne*, *F. arundinacea*, *F. pratensis* oraz *F. rubra* w województwie mazowieckim posiadają zdolność do produkcji tego alkaloidu. Znalazło to potwierdzenie w europejskich badaniach m.in. Cagaša i wsp. (1999), Emile i wsp. (2000) oraz Leuchtmann i wsp. (2000). Obecności ergowaliny nie wykryto jedynie w przypadku prób *D. caespitosa*, może to jednak wynikać z faktu iż przebadano tylko dwa ekotypy tego gatunku.

W niniejszej pracy najwyższą zawartość ergowaliny (1,298 ppm) stwierdzono w przypadku ekotypu *F. arundinacea* pobranego z pastwiska w miejscowości Granica. Podobne zawartości tego alkaloidu w tym gatunku stwierdzono w badaniach Vazquez de Aldana i wsp. (2001), oraz Leuchtmann i wsp. (2000), prowadzonych odpowiednio w

Hiszpanii i w Szwajcarii. Badania przeprowadzone na użytkach zielonych województwa mazowieckiego, wykazały również wysokie zawartości ergowaliny w przypadku ekotypów *F. rubra*. Najwyższe zawartości tego alkaloidu stwierdzono w ekotypie pobranym w miejscowości Tęczki (0,545 ppm) oraz w ekotypie z miejscowości Wilków Polski (0,394 ppm). Wartości te były zbliżone do stwierdzonych przez Leuchtman i wsp. (2000). Ponadto autorzy pracy najwięcej ekotypów zawierających ergowalinę obserwowali w przypadku *F. pratensis* (41,4%). Zawartości ergowaliny dla tego gatunku wynosiła od 0 do 0,749 ppm (tab. 2).



Rys. 1. Chromatogram przedstawiający zawartość ergowaliny w badanej próbie  
Fig. 1. Chromatogram of HPLC analysis of ergovaline

Najwyższa zawartość została stwierdzona dla próby z miejscowości Koliszewo. Badania przeprowadzone nad tym gatunkiem w Czechach (Cagaš i in., 1999) pokazały podobną rozpiętość zawartości ergowaliny. W badaniach przeprowadzonych w niniejszej pracy, dla ekotypów *L. perenne* zawartość ergowaliny określono na poziomie od 0 do 0,08 ppm. Europejskie badania wykazały wyższe zawartości tego alkaloidu w tym gatunku (Oliveira i in., 1997; Durix i in., 1998 cyt. za Bony i Delatour, 2000; Cagaš i in., 1999). W tabeli 3 przedstawiono zestawienie wyników europejskich badań dotyczących zawartości

ergowaliny w *L. perenne*, *F. arundinacea*, *F. pratensis* oraz *F. rubra*. Wynika z nich, że zawartość tej toksyny w europejskich trawach występuje na wysokim poziomie, jednakże jest to cecha bardzo zmienna, uzależniona od fazy rozwojowej rośliny i warunków klimatycznych panujących na badanym terenie (Bony i Delatour, 2000).

Tabela 3

**Wyniki europejskich badań dotyczących zawartości ergowaliny**  
**Results of European research on ergovaline content**

Gatunek Species	Kraj Country	Ergowalina (ppm) Ergovaline (ppm)	Autor Autor
<i>L. perenne</i>	Czechy	0–4,65	Cagas i wsp., 1999
<i>L. perenne</i>	Hiszpania	0–0,55	Oliveira i wsp., 1997
<i>L. perenne</i>	Francja	0–0,5	Durix i wsp., 1998*
<i>F. arundinacea</i>	Francja	0,97	Emile i wsp., 2000
<i>F. arundinacea</i>	Hiszpania	0,11–1,24	Vazquez de Aldana i wsp., 2001
<i>F. arundinacea</i>	Szwajcaria	0–1	Leuchtman i wsp., 2000
<i>F. pratensis</i>	Czechy	0–0,6	Cagas i wsp., 1999
<i>F. rubra</i>	Szwajcaria	0,51–1,40	Leuchtman i wsp., 2000

\*-za Bony i Delatour (2000)

Tabela 4

**Obecność ergowaliny w trawach w zależności od gatunku oraz typu użytkowania**  
**Ergovaline incidence in relation to species and usage type**

Typ użytkowania Type of usage	Rodzaj Species	Średni udział danego gatunku w runi (%) Average share of species in swards (%)	Średnia zawartość ergowaliny (ppm) Mean ergovaline content (ppm)	Średnia ważona zawartość ergowaliny (ppm) Weighted mean of ergovaline content (ppm)
Nieużytkowane (n= 4) Not used	<i>Lolium perenne</i>	2,5	0,034	0,001
	<i>Festuca pratensis</i>	8,8	0,080	0,007
	<i>Festuca rubra</i>	43,8	-	-
	<i>Festuca arundinacea</i>	0,0	-	-
	<i>Desch. caespitosa</i>	11,3	-	-
Łącznie dla typu użytkowania Together for usage type		66,4		0,008
Koszenie (n= 8) Cutting	<i>Lolium perenne</i>	5,9	0,033	0,002
	<i>Festuca pratensis</i>	5,8	0,073	0,004
	<i>Festuca rubra</i>	29,5	0,403	0,119
	<i>Festuca arundinacea</i>	3,1	1,298	0,040
	<i>Desch. caespitosa</i>	20,0	-	-
Łącznie dla typu użytkowania Together for usage type		64,3		0,165
Spasanie (n= 12) Grazing	<i>Lolium perenne</i>	19,3	0,038	0,007
	<i>Festuca pratensis</i>	4,6	0,118	0,005
	<i>Festuca rubra</i>	14,3	0,190	0,027
	<i>Festuca arundinacea</i>	0,0	-	-
	<i>Desch. caespitosa</i>	15,0	-	-
Łącznie dla typu użytkowania Together for usage type		53,2		0,039

Analizując otrzymane wyniki zawartości ergowaliny w badanych próbach traw, zauważyć należy, że tylko w 3 przypadkach (Granica, Koliszewo i Wilków Polski) średnia zawartość tego alkaloidu przekroczyła 0,2 ppm. Z danych literaturowych wiadomo zaś, że taka zawartość ergowaliny może już spowodować wystąpienie toksyczności chronicznej, a co za tym idzie objawów chorobowych *fescue toxicosis* (Bony i Delatour, 2000).

Analizy danych uzyskanych w niniejszej pracy wykazały, że wytwarzanie ergowaliny jest związane z charakterem użytkowania badanych stanowisk (tab. 4). Podobne wnioski otrzymano analizując częstotliwość występowania endofitów w zależności od presji użytkowej (koszenie, spasanie) występującej na badanym siedlisku (Żurek i in., 2010).

Grzyby endofityczne zdolne do produkcji ergowaliny najczęściej występowały na stanowiskach koszonych i tam też obserwowano najwyższą, średnią ważoną zawartość ergowaliny (0,165 ppm), podczas gdy na spasanych była ona znacznie niższa (0,039 ppm). Najniższe wartości średniej ważonej zawartości ergowaliny stwierdzono dla prób pochodzących ze stanowisk nieużytkowanych — 0,008 ppm. Ponadto stwierdzić należy, że kostrzewa czerwona była gatunkiem, który w związku z dużym jego udziałem w runi produkował relatywnie najwięcej ergowaliny spośród wszystkich badanych gatunków: odpowiednio średnia ważona wyniosła 0,119 ppm na stanowiskach koszonych i 0,027 ppm na spasanych (tab. 4). Badania przeprowadzone przez Bazely i wsp. (1997) również wykazały zależność pomiędzy intensywnością wypasania zwierząt a zawartością ergowaliny w roślinach.

#### WNIOSKI

1. Obecność grzybni endofitycznej nie jest równoznaczna z wytwarzaniem przez nią ergowaliny. Jedynie niektóre z endofitów zasiedlających badane ekotypy traw posiadały zdolność do jej produkowania.
2. Zawartość ergowaliny w trawie zależy od gatunku trawy. W obrębie danego gatunku są próby zawierające ten alkaloid lub wolne od niego.
3. Sposób użytkowania danego użytku zielonego ma wpływ na produkcję ergowaliny przez grzyby endofityczne z rodzaju *Neotyphodium*.

#### LITERATURA

- Ball D. 2007. Forage management and grazing strategies to minimize fescue toxicosis. <http://www.4cattlemen.com/ncba2007/newsroom/RM104BallText.pdf>.
- Bazely D. R., Vicari M., Emmerich S., Filip L., Lin D., Inman A. 1997. Interactions between herbivores and endophyte-infected *Festuca rubra* from the Scottish island of St. Kilda, Benebecula and Rum. *J. Appl. Ecol.* 34: 847 — 860.
- Bony S., Delatour P. 2000. Relevance and impact of grass endophyte toxins in Europe. *Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Neotyphodium/Grass Interaction Symposium.* 207 — 218.
- Cagaš B., Flieger M., Olsovska J. 1999. Concentration of ergot alkaloids in Czech ecotypes of *Lolium perenne* and *Festuca pratensis*. *Grass and Forage Science* 54: 365 — 370.
- Craig A. M., Bilich D., Hovermale J. T., Welty R. E. 1994. Improved extraction and HPLC methods for ergovaline from plant material and rumen fluid. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6: 348 — 352.
- Cross D. L. 2000. Toxic effects of *Neotyphodium coenophialum* in cattle and horses. *Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Neotyphodium/Grass Interaction Symposium.* 219 — 235.



- Dzwonko Z. 2007. Przewodnik do badań fitosocjologicznych. Vademecum Geobotanicum, Sorus Sc, IB UJ, Poznań — Kraków, ss.306.
- Emile J. C., Surault F., Bony S., Ravel C., Guesquiere M. 2000. Effects of ergovaline in forage grasses on feeding value and animal performance. Proceedings of the 4<sup>th</sup> International *Neotyphodium*/Grass Interaction Symposium. 521 — 523.
- Hahn H., McManus M. T., Warnstorff K., Monahan B. J., Young C. A., Davies E., Tapper B. A., Scott B. 2007. *Neotyphodium* fungal endophytes confer physiological protection to perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) subjected to water deficit. Environmental and Experimental Botany, 63: 183 — 199.
- Leuchtman A., Schmidt D., Bush P. L. 2000. Different levels of protective alkaloids in grasses with stroma — forming and seed — transmitted *Epichloë/Neotyphodium endophytes*. Journal of Chemical Ecology, vol. 26, No. 4:1025 — 1035.
- Miyazaki S., Ishizaki I., Ishizaka M., Kanbara T., Ishiguro — Takeda Y. 2004. *Lolium* B residue in fat tissues of cattle consuming endophyte — infected perennial ryegrass straw. J. Vet. Diagn. Invest 16:340 — 342.
- Oliveira J. A., Rottinghaus G. E., Collar J., Castro P. 1997. Perennial ryegrass endophytes in Galicia, Northwest Spain. J. Agric. Sci. 129: 173 — 177.
- Pańska D., Żurek G. 2005. Występowanie grzybów endofitycznych na trawach gazonowych a ich podatność na stres suszy. Łąkarstwo w Polsce, 8:1 — 7.
- Saha D. C., Jackson M. A., Johnson- Cicalese J. M. 1988. A rapid staining method for detection of endophyte fungi in turf and forage grasses. The American Phytopathological Society, No. 2, Vol. 78: 237 — 239
- Schardl Ch. J., Blankenship J. D., Machado C., Spiering M. J. 2006. Alkaloid — making fungal symbiosis. <http://4e.plantphys.net/article.php?ch=&id=37>.
- Vazquez de Aldana B. R., Garcia Ciudad A., Zabalgoageazcoa I., Garcia Criado B. 2001. Ergovaline levels in cultivars of *Festuca arundinacea*. Animal Feed Science and Technology 93: 169 — 176.
- Wiewióra B., Prończuk M., Ostrowska A. 2006. Infekcja nasion traw przez endofity w kolejnych latach użytkowania plantacji. Biul. IHAR 242: 285 — 293.
- Wiewióra B., Prończuk M., Ostrowska A., Żurek G. 2008. Endophyte occurrence in breeding strains of meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.) cv. 'PASJA'. Phytopatologia Polonica 46: 5 — 11.
- Zabalgoageazcoa I., Vazquez de Aldana B. R., Ciudad G., Criado G. 2003. Fungal endophytes in grasses from semi — arid permanent grasslands of western Spain. Grass and Forage Science 58: 94 — 97.
- Żurek G., Wiewióra B., Ochodzki P., Żurek M. 2010a. Ergovaline contents in grasses from semi — natural grasslands in Poland. Proc. of the 7<sup>th</sup> International Herbage and Seed Conference, Dallas, Texas, USA: 232 — 237.
- Żurek M., Wiewióra B., Żurek G. 2010 b. Występowanie grzybów endofitycznych na trwałych użytkach zielonych województwa mazowieckiego. Biul. IHAR 256: 171 — 181.