

**MARIA PRONCZUK**Samodzielna Pracownia Traw i Roślin Motylkowatych  
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Radzików

## Endofity traw — znaczenie, występowanie i metody wykrywania Przegląd literatury

### Grass endophytes — importance, incidence and methods for detection Literature review

Przedstawiono grzyby z rodzaju *Neotyphodium* żyjące w systemicznej współzależności z głównymi gatunkami traw: *N. lolii*, z *Lolium perenne*, *N. coenophialum* z *Festuca arundinacea* i *N. uncinatum* z *Festuca pratensis*. Opisano ich systematykę, biologię i produkowane alkaloidy. Zwrócono uwagę na korzystne i szkodliwe efekty współżycia traw z endofitami. Przedstawiono wyniki badań dotyczące ich występowania i rozprzestrzenienia na świecie, w Europie i w Polsce. Stwierdzono potrzebę intensyfikacji badań nad endofitami w Polsce. Podano metody wykrywania endofitów w nasionach i roślinach.

**Słowa kluczowe:** alkaloidy, biologia, *Festuca arundinacea*, *Festuca pratensis*, *N. coenophialum*, *Neotyphodium lolii*, *Neotyphodium uncinatum*, *Lolium perenne*, systematyka

Species of *Neotyphodium* fungi are presented, such as *N. lolii*, *N. coenophialum* and *N. uncinatum*, living in systemic coexistence with *Lolium perenne*, *Festuca pratensis* and *Festuca arundinacea*. Their taxonomy, biology and the produced alkaloids are described. Beneficial and harmful effects of the grass and endophytes coexistence are shown. The results of research on the endophyte incidence and distribution in the world, Europe and Poland are presented. The necessity of intensification of research on the *Neotyphodium* fungi in Poland has been emphasized. Methods for endophytes detection in seed and plant are presented.

**Key words:** alkaloids, biology, *Festuca arundinacea*, *Festuca pratensis*, *Neotyphodium coenophialum*, *Neotyphodium lolii*, *Neotyphodium uncinatum*, *Lolium perenne*, taxonomy

### WSTĘP

Endofitami nazywane są mikroorganizmy, które część lub całe swoje życie zasiedlają bezobjawowo tkanki swoich gospodarzy (Petroni i in., 1986). Ta definicja obejmuje zarówno pasożyty, jak i saprofity żyjące w systemicznej współzależności z roślinami.

Współżycie grzybów z trawami znane jest od dawna. Pierwsza informacja o obecności grzybnia endofita w nasionach *Lolium temulentum* L. pochodzi z roku 1898 (Vogl cyt. za

White, 1987). Wiedza o tych grzybach i ich rozprzestrzenieniu, przez długi okres czasu była niewielka, podawana w piśmiennictwie sporadycznie i wzrastała bardzo wolno. Dopiero w latach 80' odkrycie szkodliwości traw zasiedlonych endofitami dla bydła (Fletcher i Harvey, 1981) oraz związek endofitów z odpornością traw na szkodniki (Barker i in., 1984) spowodowały rozwój wszechstronnych badań. Od roku 1990 odbywają się regularnie sympozja poświęcone endofitom traw i ich gospodarzom (Hoveland, 2000). Gromadzą one naukowców wielu dyscyplin z całego świata. Przedstawiane są wyniki najnowszych badań nad występowaniem, biologią, taksonomią, efektami toksyczności, zastosowaniem ich do poprawy zadarniania na pastwiskach i trawnikach. Poruszane i dyskutowane są ekologiczne zmiany, a także komórkowe i molekularne techniki do charakterystyki i modyfikacji tych grzybów.

Obecnie wzrasta znaczenie traw. Ich zastosowanie nie ogranicza się do użytku rolniczego jako paszy dla zwierząt. Trawy nabierają znaczenia jako rośliny gazonowe stosowane na trawniki miejskie, w parkach, na terenach do rekreacji i jako podłoża obiektów sportowych. Dlatego badania nad efektami symbiozy traw z *Neotyphodium* są nadal aktualne i potrzebne (Paul i Dapprich, 2000).

W Polsce badania nad endofitami prowadzone były w małym zakresie (Pańka i Łukanowski, 2000; Pańka i Sadowski, 2002; Pańka i in., 2004). Z tych prac i z badań zagranicznych autorów wynika, że grzyby te zasiedlają nasiona niektórych polskich odmian traw, a także występują na użytkach zielonych (Pfannmöller i in., 1994; Lewis, 2000). Otwarcie granic po wejściu Polski do UE umożliwia import nasion z różnych rejonów Europy i świata, co sprzyja rozprzestrzenianiu się grzybów zasiedlających te nasiona. W niektórych państwach Europy (np. Francja) wprowadzono zakaz rejestracji odmian i obrotu nasionami zawierającymi endofity (Bayle i in., 2003). Dlatego istnieje konieczność intensyfikacji badań i popularyzacji wiedzy o tych grzybach także w Polsce.

#### SYSTEMATYKA

Grzyby endofityczne współżyjące z trawami były początkowo zakwalifikowane do rodzaju *Acremonium*, sekcja *Albo-lanosa* (Morgan-Jones i Gams, 1982). Jednak ze względu na wiele morfologicznych i filogenetycznych różnic pomiędzy gatunkami w tym rodzaju utworzono nowy rodzaj grzybów niedoskonałych — *Neotyphodium*, do którego włączono sekcję *Albo-lanosa* (Glenn i in., 1996). Spośród gatunków *Neotyphodium* najbardziej rozpowszechnione i poznane jest tylko kilka, do których zaliczyć należy: *N. coenophialum* Morgan-Jones & Gams współżyjący z *Festuca arundinacea* Schreb., *N. lolii* Latch Christensen & Samuels żyjący z *Lolium perenne* L. (Latch i in., 1984), *N. uncinatum* Gams, Petroni & Schmidt zasiedlający *Festuca pratensis* L. (Gams i in., 1990) oraz *N. typhinum* Morgan-Jones & Gams spotykany na wielu gatunkach traw (Morgan-Jones i Gams, 1982). Większość gatunków *Neotyphodium* nie zarodnikuje na roślinach, chociaż zarodniki konidialne mogą być produkowane przez te grzyby na sztucznych podłożach (Siegel i in., 1985). Wyjątek stanowi *N. typhinum* telemort *Epichloë typhina*. Wytwarzana przez ten gatunek stroma tworzy powłokę otaczającą źdźbło trawy, w której znajdują się liczne zarodniki konidialne i workowe (White i Morgan-Jones, 1987; Raynal, 1991). Ze

względem na specyficzny obraz stromy na trawach choroba nazywana jest popularnie pochwaczakiem pałkowatym (Mühle i in., 1975).

Systematyka *Neotyphodium* nie jest jeszcze ustalona. Nadal prowadzone są badania filogenetyczne, szczególnie w rodzaju *Epichloë*, które wskazują na konieczność dalszych zmian w taksonomii *Neotyphodium* (Leuchtmann i Schardll, 1998).

#### BIOLOGIA

Do typowych endofitów zaliczane są takie gatunki jak: *N. coenophialum*, *N. lolii* i *N. uncinatum*, ponieważ cały swój cykl życiowy są zdolne przeżyć bezobjawowo w tkankach roślin gospodarzy (Siegel i in., 1985; White i Cole, 1985; Gams i in., 1990). Grzyby te zaliczane są do „seed born fungi” ponieważ przenoszone są z nasionami (White i Cole, 1986; White, 1987). Ich grzybnia zasiedla głównie warstwę aleuronową, ale jej rozmieszczenie w nasionach jest różne. Duże zagęszczenie grzybni stwierdzano w warstwie aleuronowej blisko jądra, co wskazuje na jej związek także z zarodkiem (Siegel i in., 1985; Welty i in., 1986). Podczas kiełkowania nasion grzyb przerasta skrobię bielma, a potem jego obecność może być wykrywana w 3–5 tygodniowych siewkach (Siegel i in., 1985).

Endofity zasiedlają głównie pochwy liściowe traw i młode liście (Hinton i Bacon, 1985; Latch i Christenson, 1982). Rzadziej obserwowano grzybnie w źdźbłach i mniej aktywnych fotosyntetycznie starszych liściach (Aust, 2000). Na indywidualnych źdźbłach największa koncentracja grzybni występowała w pochwach liści, na obrzeżach kępy, ale zagęszczenie grzybni zmieniło się w sezonach roku (Redd i in., 2000). Nie stwierdzano dotąd jej obecności w tkankach korzeni traw (Siegel i in., 1985). Hinton i Bacon (1985) podają, że grzyby *Neotyphodium* zasiedlają głównie takie części roślin, gdzie znajdują dla siebie optymalną ilość pożywienia. Grzyby te rosną systemicznie w przestrzeniach międzykomórkowych. Wzrost grzybni, charakterystycznie skręconej, ale nierozgałęziającej się przebiega równolegle do osi liścia lub źdźbła (Welty i in., 1986). Aust (2000) twierdzi, że kolonizacja traw i sposób wzrostu grzybni endofitów wiąże się ściśle z morfologią liści i źdźbła rodziny *Gramineae*.

Gdy rośliny są w stanie spoczynku endofity zasiedlają wierzchołki merystemów. Wiosną, gdy trawy zaczynają rosnąć, rośnie też grzybnia endofita. Gdy formuluje się zawiązek kwiatostanu, stymulowany jest także rozwój grzyba, a wzrost grzybni następuje zawsze w ten sam sposób: międzykomórkowo, wzdłuż osi źdźbła, bez uszkodzenia komórek gospodarza (Siegel i in., 1985).

Żywotność *Neotyphodium* w nasionach zależy od wieku nasion i warunków ich przechowywania. Badania Bouter i Klooster (1996) wykazały, że w nasionach *Lolium perenne* przechowywanych w zmiennych, niekontrolowanych warunkach grzybnia endofitów zamierała już po jednym roku. Siegel i współpracownicy (1985) donoszą, że nasiona życicy trwałej składowane w temperaturze 0–5°C i wilgotności bliskiej zera zawierały jeszcze żywą grzybnie po 15 latach. Welty i wsp. (1987) twierdzą, że warunki sprzyjające kiełkowaniu nasion sprzyjają także żywotności endofitów. W ich badaniach okres przeżywalności grzybni w nasionach życicy trwałej (*Lolium perenne*) i kostrzewy

trzciny (Festuca arundinacea) był podobny, zaznaczyła się jednak tendencja do wolniejszego spadku jej żywotności u życicy w porównaniu do kostrzewy.

Grzyby z rodzaju *Neotyphodium* mają zdolność produkowania alkaloidów. *N. lolii* zasiedlający *Lolium perenne* znany jest z wytwarzania lolitremu B, ergovaliny i peraminy (Reed i in., 2000). *N. coenophialum* współżyjący z *Festuca arundinacea* produkuje głównie ergovalinę (Porter, 1995; Oliviera i in., 2000) natomiast metabolity *N. uncinatum* współżyjącego z *Festuca pratensis* są jeszcze mało poznane. Badania Justus i wsp. (1997) oraz Flieger i wsp. (2000) wskazują, że grzyb ten wytwarza lolinę i chanoclavinę. Stwierdzono duże różnice w koncentracji alkaloidów w zależności od badanego organu rośliny. Najwyższa zawartość tych związków była notowana na obrzeżach kępy i w kwiatostanach, ale zawartość ta ulegała zmianom w sezonach roku (Woodburn i in., 1993) i była istotnie skorelowana ze stresem suszy gospodarza (Barker i in., 1993). Bony i Delatour (2000) podają, że najwyższy poziom ergovaliny (0,45 ppm) występował w maju u roślin odmian kostrzewy trzciny, rosnących na południu Francji i przekraczał krytyczny poziom zagrożenia dla zwierząt.

## ZNACZENIE

Współżycie traw z grzybami z rodzaju *Neotyphodium* ma dodatnie i ujemne aspekty.

### **Dodatnie aspekty**

Endofity przynoszą trawom wiele korzyści: wzbudzają mechanizmy tolerancji na suszę oraz regeneracji uszkodzeń po długotrwałej suszy, wpływają na oszczędną gospodarkę azotem i lepszą przyswajalność fosforu (Malinowski i Belesky, 2000). Trawy zasiedlone przez endofity są odporne na szkodniki, nicienie oraz na niektóre choroby (Siegel i in., 1985; West i Gwinn, 1993; Fletcher i Easton, 2000). Charakteryzują się obfitym krzewieniem, trwałością i wykazują większą konkurencyjność w stosunku do traw nie zasiedlonych przez te grzyby (Funk i in., 1994).

Na te korzyści zwrócili uwagę hodowcy traw. W latach 90' nastąpił rozwój hodowli odmian traw zawierających endofity (Funk i in., 1994). Ten kierunek hodowli szczególnie rozwinął się w Nowej Zelandii, Australii i Stanach Zjednoczonych gdzie duże szkody na pastwiskach, obsianych jednym gatunkiem traw (życica trwała i kostrzewa trzciny), powodowały szkodniki i długotrwała susza (Fletcher i Easton, 2000). Do hodowli nowych odmian wykorzystywano przede wszystkim ekotypy zasiedlone przez endofity, ale praktykowano było także zakażanie roślin i nasion traw izolatami *Neotyphodium* (Funk i in., 1994). Obecnie na rynku światowym jest wiele odmian z endofitami. Dla odróżnienia posiadają one oznakowanie „E+”, a wolne od endofitów „E-”, Hoveland (2000) podaje, że w 1999 roku w USA w Stanie Oregon wyprodukowano na potrzeby trawnikowe 48 milionów kg nasion *F. arundinacea* i 100 milionów kg nasion *Lolium perenne*. Większość tych nasion była zakażona grzybami z rodzaju *Neothypodium*. Stosowanie zakażonych nasion nie ogranicza się jednak tylko do celów trawnikowych. W Nowej Zelandii np. większość pastwisk obsianych *Lolium perenne*, ze względu na szkodniki, może przetrwać tylko dzięki stosowaniu odmian z endofitami (Fletcher i Easton, 2000).

### Ujemne aspekty

Oprócz korzystnych cech, które wnoszą grzyby z rodzaju *Neotyphodium* do odmian traw, są także przyczyną ujemnych efektów. Stwierdzono, że niektóre z wytwarzanych przez endofity alkaloidów są toksyczne i stanowią duże zagrożenie dla zwierząt. Znane są dwie groźne choroby u zwierząt, których czynnikiem sprawczym są endofity współżyjące z trawami na pastwiskach:

- „ryegrass staggers syndrome”, którą powoduje alkaloid lolitrem B u bydła, owiec i koni zawarty w paszy składającej się z życicy trwałej zainfekowanej *Neotyphodium lolii* podczas gorącego lata. Choroba ta, oprócz spadku produkcji mleka (6%–15%) i obniżenia wagi ciała, atakuje układ nerwowy zwierząt powodując jego niesprawność (Garthwaite i in., 1994). Częstym objawem jest paraliż tylnych kończyn. Stwierdzono dużą śmiertelność u chorych zwierząt (Siegel i in., 1985; Reed i in., 2000).
- „fescue toxicosis”, która występuje u zwierząt karmionych kostrzewą trzcinową z dużą zawartością alkaloidu ergovaline produkowanego przez *Neotyphodium coenophialum*. Chore zwierzęta chudną, kuleją, są osowiałe i unikają słońca. Oprócz spadku wagi ciała następuje u nich drastyczne obniżenie produkcji mleka. Występuje też duża śmiertelność wśród chorych zwierząt. (Siegel i in., 1985).

### WYSTĘPOWANIE

Liczne badania wykazały, że wiele gatunków traw może być zasiedlane przez grzyby endofityczne. Jednak najczęściej występują u gatunków z rodzaju *Lolium* i *Festuca* (Funk i in., 1994; Wälli i in., 2000; Guillaumin i in., 2000; Leyronas i Raynal, 2001). Są doniesienia o zasiedlaniu także *Dactylis glomerata* (Cappelli i Buonauro, 2000) *Bromus* spp., *Agrostis* spp., *Phleum pratense* i innych gatunków traw z rodzajów *Elymus*, *Anthoxanthum*, *Deschampsia*, *Koeleria*, *Holcus* występujących na naturalnych użytkach (Guillaumin i in., 2000; Vazquez-de-aldana i in., 2000; Wälli i in., 2000). Nie stwierdzono dotąd obecności typowych endofitów u *Poa pratensis* (Funk i in., 1994; Leyronas i Raynal, 2001), chociaż dużo gatunków *Poa* w naturze jest gospodarzami *Epichloë typhina*. Nie powiodły się też próby zakażania roślin i nasion *P. pratensis* izolatami *Neotyphodium* pochodzącymi z innych gatunków traw. Funk i współpracownicy (1994) twierdzą, że skomplikowana budowa genomu u apomiktycznej wiechliny łąkowej może być przyczyną braku zdolności izolatów *Neotyphodium* do egzystowania we współzależności symbiotycznej z tym gatunkiem.

Obecność endofitów w trawach stwierdzono w wielu krajach świata. Najwięcej informacji o tych grzybach pochodzi z Ameryki Południowej (Welty i in., 1986), Nowej Zelandii (Fletcher i Easton, 2000) i Australii (Reed i in., 2000) gdzie średnia zawartość endofitów w trawach na pastwiskach sięgała nawet 100%. Autorzy podają, że tak liczne zasiedlenie traw w tych rejonach świata wiąże się z częstym narażeniem traw na stresy biotyczne (szkodniki) i abiotyczne (susza). Są jednak informacje o występowaniu endofitów także w chłodnych rejonach świata np. w Finlandii (Wälli i in., 2000), w Japonii (Koga i in., 1993). Dość dużo informacji pochodzi również z Europy. Lewis (2000) podsumowując badania przeprowadzone w 22 krajach europejskich stwierdza, że 49%

badanych populacji *Lolium perenne* było zasiedlone przez endofity o zakresie u roślin od 1 do 100%. Jednakże wysoki procent zasiedlenia roślin zdarzał się rzadko i występował raczej w krajach południowej Europy (tab. 1).

Tabela 1

**Występowanie i zakres infekcji *Lolium perenne* przez *Neotyphodium* w Europie (wg Lewis, 2000)**  
**Incidence and range of *Neotyphodium* infection in *Lolium perenne* in Europe (acc. to Lewis, 2000)**

| Kraj<br>Country                   | Występowanie/liczba prób badanych<br>Incidence/number of samples examined | Zakres<br>Range    |
|-----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| Austria — Austria                 | 0/7                                                                       | no                 |
| Belgia — Belgium                  | 0/5; 23/42; 2/2                                                           | no; 3-40; 10-35    |
| Bułgaria — Bulgaria               | 6/6                                                                       | 30-75              |
| Korsyka — Corsica                 | 7/7                                                                       | 20/80              |
| Czeska Republika — Czech Republic | 1/4; 56/365                                                               | 2; no              |
| Anglia — England                  | 17/28; 1/2                                                                | 3-72; ?-35         |
| Francja — France                  | 188/255; 25/28                                                            | 1-100; ?-90        |
| Niemcy — Germany                  | 33/38                                                                     | 8-81               |
| Grecja — Greece                   | 2/3                                                                       | 44-45              |
| Irlandia — Ireland                | 11/28; 18/58                                                              | 5-35; 7/27         |
| Włochy — Italy                    | 14/24; 15/24                                                              | 5-78; ?-55         |
| Luksemburg — Luxembourg           | 0/2; 1/2                                                                  | no; 20             |
| Holandia — The Netherlands        | 0/7                                                                       | no                 |
| Norwegia — Norway                 | 0/3                                                                       | no                 |
| Polska — Poland                   | 1/2                                                                       | 60                 |
| Portugalia — Portugal             | 12/14; 12/16                                                              | 30-90; 9/82        |
| Rumunia — Romania                 | 11/11; 2/3; 18/18                                                         | 15-70; ?-25; 3-100 |
| Sardynia, Sardinia                | 2/2                                                                       | 35-100             |
| Słowacja, Slovakia                | 2/4                                                                       | 3/10               |
| Hiszpania, Spain                  | 57/76; 28/56                                                              | 5-95; no           |
| Szwajcaria, Switzerland           | 1/21; 3/4                                                                 | 5; ?-35            |
| Turcja — Turkey                   | 2/3                                                                       | 50/85              |
| Walia — Wales                     | 5/11; 4/6                                                                 | 1/75; ?-50         |
| Suma                              | 580/1180                                                                  |                    |
| Total                             | [49%]                                                                     |                    |

no — Brak danych; No data available

Nieco częściej, w porównaniu do *L. perenne*, zasiedlone były populacje *F. pratensis* — 56%, ale badania nad tym gatunkiem trawy prowadzono sporadyczne (tab. 3). Natomiast najczęściej grzyby te występowały u *F. arundinacea* — 95%. Ponadto w populacjach tego gatunku stwierdzono dość wysoki zakres infekcji roślin zarówno w północnych jak i południowych rejonach Europy (tab. 2). W Polsce badano jedynie kilka odmian *L. perenne* oraz jedną odmianę *F. pratensis*. Stwierdzono dość niskie zasiedlenie nasion u odmian *L. perenne* (od 1% do 6%) (Pańka i Łukanowski, 2000; Pańka i Sadowski, 2002), a dość wysokie u *F. pratensis* (52%) (Pańka i in., 2004). Paul i wsp. (2000 a) donoszą, że odmiany europejskie *L. perenne* generalnie zawierają mało *Neotyphodium lolii* w porównaniu do odmian pochodzących z Nowej Zelandii, Australii i USA, ale dość wysoki poziom infekcji stwierdzano u odmian wyhodowanych z ekotypów. Zwrócono uwagę, że w kolejnych etapach procesu hodowli następował spadek zasiedlenia nasion przez endofity, który jak sądzą autorzy mógł być spowodowany przetrzymywaniem nasion w warunkach niekontrolowanych.

Tabela 2

**Występowanie i zakres infekcji *Festuca arundinacea* przez *Neotyphodium* w Europie (wg Lewis, 2000)**  
**Incidence and range of *Neotyphodium* infection in *Festuca arundinacea* in Europe (acc. to Lewis, 2000)**

| Kraj<br>Country     | Występowanie/ liczba prób badanych<br>Incidence/ number of samples examined | Zakres<br>Range |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| Finlandia — Finland | 13/15                                                                       | 96–100          |
| Włochy — Italy      | 3/6                                                                         | ?– 100          |
| Sardynia — Sardinia | 20/20; 63/63                                                                | no; 20–100      |
| Hiszpania — Spain   | 17/19                                                                       | 7–100           |
| Rosja — Russia      | 41/42                                                                       | 20–100          |
| Suma                | 157/165                                                                     |                 |
| Total               | [95%]                                                                       |                 |

no — Brak danych; No data available

Tabela 3

**Występowanie i zakres infekcji *Festuca pratensis* przez *Neotyphodium* w Europie (wg Lewis, 2000)**  
**Incidence and range of *Neotyphodium* infection in *Festuca pratensis* in Europe (acc. to Lewis, 2000)**

| Kraj<br>Country                   | Występowanie/ liczba badanych prób<br>Incidence/ number of samples examined | Zakres<br>Range |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| Czeska Republika — Czech Republic | 37/56; 9/14                                                                 | no; 26–100      |
| Finlandia — Finland               | 8/25                                                                        | 10–100          |
| Włochy — Italy                    | 6/6                                                                         | 3–100           |
| Suma                              | 60/101                                                                      |                 |
| Total                             | [59%]                                                                       |                 |

no — Brak danych; No data available

Liczne badania przeprowadzone w wielu krajach wskazują, że trawy w warunkach europejskich posiadają dość wysoką zawartość alkaloidów: ergovaliny i lolitremu B (tab. 4 i 5) i zdarzały się nawet przypadki wystąpienia choroby u zwierząt (tab. 6; Bonny i Delator, 2000).

Tabela 4

**Poziom ergovaliny w porażonych gatunkach traw stwierdzony w Europie (wg Bony i Delatour, 2000)**  
**Range of ergovaline levels found in endophyted grass species in Europe (acc. to Bony and Delatour, 2000)**

| Kraj<br>Country                   | Gatunek<br>species    | Ergovaline (ppm)<br>Zakres — Range |
|-----------------------------------|-----------------------|------------------------------------|
| Niemcy — Germany                  | <i>L. perenne</i>     | 0,02–0,33                          |
| Czeska Republika — Czech Republic | <i>F. pratensis</i>   | 0,0–0,6; 0,0–2,3                   |
| Hiszpania — Spain                 | <i>L. perenne</i>     | 0,0–2,7; 0,0–4,65                  |
| Szwajcaria — Switzerland          | <i>L. perenne</i>     | 0,0–0,55                           |
| Francja — France                  | <i>L. perenne</i>     | 0,0–1,0                            |
| Francja — France                  | <i>F. arundinacea</i> | 0,0–0,5                            |
|                                   |                       | 0,05–0,5; 0,97                     |

Poziom krytyczny wystąpienia choroby: 0,37 ppm; Critical clinical disease level: 0.37ppm

Tabela 5

**Poziom Loritremu B w porażonych roślinach życicy trwalej stwierdzony w Europie (wg Bony i Delatour, 2000)**  
**Range of Lolitrem B levels found in endophyted *Lolium perenne* in Europe (acc. to Bony and Delatour, 2000)**

| Kraj<br>ountry            | Lolitrem B (ppm)<br>Zakres — Range            |
|---------------------------|-----------------------------------------------|
| Niemcy — Germany          | 0,05–0,37; 0,5–4,2; 0,02 >2; 0,8–1,4; 0,2–1,4 |
| Holandia — The Netherland | 1,8–6,0; 1,5–2,5; 5,0–6,0                     |
| Anglia — England          | 0,7                                           |
| Francja — France          | 0,1–1,5; 0,5                                  |

Poziom krytyczny dla rozwoju choroby: 2,0 ppm  
 Critical clinical disease level: 2,0 ppm.

Tabela 6

**Opublikowane przypadki wystąpienia choroby „ryegrass staggers” u zwierząt w Europie (wg Bony i Delatour, 2000)**  
**Reported acute clinical cases of ryegrass staggers in Europe (acc. to Bony and Delatour, 2000)**

| Kraj<br>Country                   | Gatunek zwierząt<br>Animals     | Rok<br>Year | Materiał<br>Material                                         |
|-----------------------------------|---------------------------------|-------------|--------------------------------------------------------------|
| Niemcy<br>Germany                 | Bydło — Cattle                  | 1994        | <i>L. perenne</i> , pastwisko<br><i>L. perenne</i> , pasture |
|                                   | Bydło i owce — Cattle and sheep | 1991        |                                                              |
|                                   |                                 | 1992        |                                                              |
| Wielka Brytania<br>United Kingdom | Alpaka — Alpaca                 | 1993        | <i>L. perenne</i> , pastwisko<br><i>L. perenne</i> , pasture |
|                                   |                                 | 1995        |                                                              |
|                                   |                                 | 1999        |                                                              |
|                                   | Bydło i owce — Cattle and sheep | 1991        |                                                              |
| Holandia<br>The Netherlands       | Konie — Horses                  | 1994        | <i>L. perenne</i> , siano<br><i>L. perenne</i> , hay         |
|                                   |                                 | 1995        |                                                              |
|                                   |                                 | 2000        | <i>L. perenne</i>                                            |
|                                   | Krowy — Cows                    | 1997        | <i>L. perenne</i> , pastwisko<br><i>L. perenne</i> , pasture |
| Francja<br>France                 | Konie — Horses                  | 1991        | <i>L. perenne</i> , słoma<br><i>L. perenne</i> , straw       |
|                                   | Krowy — Cows                    | 2000        | <i>L. perenne</i>                                            |

Reinholz i wsp. (2000) podają, że wysokie nawożenie *L. perenne* podczas gorącego lata stymuluje wytwarzanie alkaloidów przez endofity. W ich badaniach, przy nawożeniu 260 kg N/ha, zawartość alkaloidów osiągała poziom krytyczny (2000 µg/kg) u niektórych odmian *L. perenne*. Autorzy twierdzą, że ta zawartość alkaloidu mogłaby spowodować groźną chorobę „ryegrass staggers” u zwierząt w warunkach klimatycznych Niemiec.

Aby ograniczyć zagrożenie dla zwierząt poszukiwane były różne metody zwalczania *Neotyphodium*. Stosowano fungicydy na plantacjach nasiennych, ale metoda ta okazała się mało efektywna. Spośród wielu stosowanych fungicydów jedynie wielokrotny oprysk Folicurem (tebuconazol) obniżał nieco ich żywotność w nasionach życicy trwalej (Rolston i Rowarth, 1995). Przetrzynywanie nasion w kamerach z temperaturą 57°C przez 40 minut oraz 49°C przez 7 dni było efektywne, ale część nasion traciło siłę kiełkowania (Siegal i in., 1984). Podejmowane były także próby usuwania endofitów produkujących toksyczne

alkaloidy w odmianach, i zakażenia tych nasion izolatami *Neotyphodium*, które wytwarzają alkaloidy nietoksyczne. Poszukiwano izolatów wytwarzających peramine, ponieważ ten alkaloid, jak podają Fletcher i Easton (2000), okazał się nieszkodliwy dla zwierząt, a posiada inne korzystne dla traw właściwości takie jak wzbudzające odporność na szkodniki, stres suszy i inne. Jednak zakażenie nasion i wprowadzanie tych izolatów na pastwiska napotykało na różne trudności. Jedną z nich był spadek żywotności grzyba podczas magazynowania nasion.

#### WYKRYWANIE

Ponieważ rośliny i nasiona traw zasiedlone grzybami *Neotyphodium* nie posiadają zewnętrznych objawów poszukiwano metod diagnostycznych, które byłyby przydatne w hodowli i ocenie odmian traw. Znanych jest wiele metod, które ze względu na ich specyfikę podzielić można na:

- metody bezpośrednie
  - izolacja grzybów z pochwy liściowej lub z ziarniaka (Bacon i White, 1994)
  - badanie zawartości alkaloidów w roślinach i nasionach (Belesky i in., 1987)
- metody mikroskopowe
  - barwienie różem bengalskim (Saha i in., 1988)
  - barwienie błękitem anilinowym (Welty i Rennie, 1985)
  - fluorescencyjna (Dapprich i in., 1994)
- metody serologiczne
  - ELISA (Johnson i in., 1982; Welty i in., 1986)
  - immunologiczna (Hill i in., 2002)
- metody molekularne
  - RAPDs (Liu i in., 1995)
  - PCR (Doss i Welty, 1995).

Metody te różnią się pracochłonnością, kosztami i efektywnością wykrywania żywej grzybni. Hahn i współautorzy (2000) podają, że jedynie metoda fluoroscencyjna i metody bezpośrednie są zdolne stwierdzić obecność żywej grzybni *Neothpodium* w nasionach traw. Najbardziej znanymi metodami i zalecanymi przez ISTA (International Seed Testing Association) są: barwienie błękitem anilinowym (Welty i Rennie, 1985) i immunologiczna (Hill i in., 2002). Te dwie metody zamierzamy zastosować do oceny odmian i materiałów wyjściowych do hodowli nowych odmian traw w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie.

Cappelli i Buonauro (2000) twierdzą, że aby uniknąć rozprzestrzeniania się infekcji traw przez endofity w Europie jest konieczna reprodukcja nasion objętych programem państwowej oceny, która obejmowałaby materiały mateczne odmian przy użyciu czułych szybkich metod wykrywających endofity w nasionach. We Francji wprowadzono już zakaz rejestracji i obrotu nasionami odmian zawierającymi endofity (Bayle i in., 2003). W Polsce nie ma takiego zakazu, a docierają do Izby Nasiennej informacje (dane niepublikowane) o chęciach sprowadzania do Polski nasion życicy trwałej z Nowej Zelandii, gdzie uprawa

tego gatunku bez endofitów jest niemożliwa ze względu na szkodniki (Fletcher i Easton, 2000).

## LITERATURA

- Aust H. J. 2000. Comparison of the colonization of *monocotyledonous* and *dicotyledonous* plants by endophytic fungi. Proc. of the 4<sup>th</sup> International *Neotyphodium*/Grass Interactions Symposium, Soest, Germany: 9 — 16.
- Bacon C. W., White J. F. Jr. 1994. Stains, media and procedure for analyzing endophytes. In: Biotechnology of endophytic fungi of grasses. Bacon Ch W, White J.F.Jr. (eds).CRC Pres, Boca Raton: 47 — 56.
- Barker G. M., Pottinger R. P., Adison P. J., Prestidge R. A. 1984. Effect of *Lolium* endophyte fungus infections on behaviour of adult Argentine stem weevil. New Zealand Journal Agric. Res. 27: 271 — 277.
- Barker D. J., Davies E., Lane G. A., Latch G. C. M., Nott H. M., Tapper B. A. 1993. Effect of water deficit on alkaloid concentrations in perennial ryegrass endophyte associations. Proc of 2<sup>nd</sup> International Symposium on *Acremonium*/grass interactions. Palmerston North, New Zealand: 67 — 71.
- Bayle B., Huyghe C., Gensollen V., Bourgoin B. 2003. System of variety testing and registration in France for forage and turf. Book of Abstracts of the 25<sup>th</sup> EUCARPIA Fodder Crops and Amenity Grasses Section Meeting. Brno, Czech Republik: 119.
- Belesky D. P., Robbins J. D., Stuedemann J. A., Wilkinson S. R., Devine O. J. 1987. Fungal endophyte infection-loline derivative alkaloid concentration of grazed tall fescue. Agron. J. 79: 217 — 220.
- Bony S., Delatour P. 2000. Relevance and impact of grass endophyte toxins in Europe. Proc. of 4<sup>th</sup> International *Neotyphodium*/grass Interactions Symposium. Soest, Germany: 207 — 218.
- Bouter W., van Klooster G. 1996. Practical endophyte-work at the Barenbrug Grass Breeding Department. IOBC wprs Bulletin 19 (7): 59 — 62.
- Cappelli C., Buonauro R. 2000. Occurrence of endophytic fungi in grass seeds and plants in Italy. Proc. of the 4<sup>th</sup> International *Neotyphodium*/Grass Interactions Symposium, Soest, Germany: 131 — 137.
- Dapprich P., Paul. V. H., Krohn K. 1994. A novel and rapid staining method for the detection of vital endophytes in seeds and leaf sheaths of *Lolium perenne*. IOBC wprs Bulletin 17/1: 139 — 146.
- Doss R. P., Welty R. E. 1995. A polymerase chain reaction-based procedure for detection of *Acremonium coenophialum* in tall fescue. Phytopathol. 85: 913 — 917.
- Fletcher L. R., Harvey I. C. 1981. An association of a *Lolium* endophyte with ryegrass staggers. New Zealand Vet. J. 29: 185 — 186.
- Fletcher L. R., Easton H. S. 2000. Using endophytes for pasture improvement in New Zealand. Proc. of the 4<sup>th</sup> International *Neotyphodium*/Grass Interactions Symposium, Soest, Germany: 149 — 162.
- Gartwhaite I., Miles C. O., Towers N. R. 1994. An immunological approach to the study of the ryegrass staggers syndrome. IOBC wprs Bulletin 17 (1): 175 — 180.
- Flieger M., Osovska J., Halada P., Pazoutova S., Cagas B., Shelby R. A. 2000. Chanoclavine I and lyserol, clavine alcaloides produced by *Neotyphodium* spp. Proc. of the 4<sup>th</sup> International *Neotyphodium*/Grass Interactions Symposium, Soest, Germany: 515 — 519.
- Funk C. R., Belanger F. C., Murphy J. A. 1994. 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.
- Gams W., Petroni O., Schmidt D. 1990. *Acremonium uncatum*, a new endophyte in *Festuca pratensis*. Mycotaxon 37: 67 — 71.
- Glenn A. E., Bacon C. W., Price R., Hanlin R. T. 1996. Molecular phylogeny of *Acremonium* and its taxonomic implications. Mycologia 88: 369 — 383.
- Guillaumin J. J., Frain M., Pichon N., Ravel C. 2000. Survey of the fungal endophytes in wild grass species in the Auvergne region (central France). Proc. of the 4<sup>th</sup> International *Neotyphodium*/Grass Interactions Symposium, Soest, Germany.: 85 — 92.

- Hahn H., Huth W., Schöberlein W. 2000. Tissue print immunoassay — a rapid and sensitive method also for detection of *Neotyphodium* endophytes. Proc. of the 4<sup>th</sup> International *Neotyphodium*/Grass Interactions Symposium, Soest, Germany: 139 — 143.
- Hinton D. M., Bacon C. W. 1985. The distribution and ultrastructure of the endophyte of toxic tall fescue. Can. J. Bot. 63: 36 — 42.
- Hoveland C. S. 2000. Endophytes — research and impact. Proc. of the 4<sup>th</sup> International *Neotyphodium*/grass Interactions Symposium. Soest, Germany: 123 — 130.
- Hill N. S., Hiatt E. E., De Battista J. R., Costa M. C., Griffiths C. H., Klap J., Thorogood D., Reeves J. H. 2002. Seed testing for endophytes by microscopic and immunoblot procedures. Seed Science and Technology 30: 347 — 355.
- Johnson M. C., Pirone I. P., Siegel M. R., Varney, D. R. 1982. Detection of *Epichloe typhina* in tall fescue by means of enzyme-linked immunosorbent assay. Phytopathology 72: 647 — 650.
- Justus M., Witte L., Hartman T. 1997. Levels and tissue distribution of loline alkaloids in endophyte-infected *Festuca pratensis*. Phytochemistry 44/1: 51 — 57.
- Koga H., Tsukiboshi T., Uematsu T. 1993. Incidence of the endophyte fungus, *Acremonium uncinatum*, in Meadow Fescue (*Festuca pratensis*) ecotypes in Hokkaido. Bull. Natl. Grassl. Res. Inst. 49: 35 — 41.
- Latch G. C. M., Christensen M. J. 1982. Ryegrass endophyte, incidence and control. New Zealand Journal of Agricultural Research. 25: 443 — 448.
- Latch G. C. M., Christensen M. J., Samuels G. J. 1984. Five endophytes of *Lolium* and *Festuca* in New Zealand. Mycotaxon 20: 535 — 550.
- Leuchtmann A., Schardll C. 1998. Mating compatibility and phylogenetic relationship among two species of *Epichloë* and other congeneric European species. Mycological Research 102: 1169 — 1182.
- Lewis G. C. 2000. *Neotyphodium* endophytes: incidence, diversity, and host in Europe. Proc. of the 4<sup>th</sup> International *Neotyphodium*/grass Interactions, Symposium. Soest, Germany: 123 — 130.
- Leyronas C., Raynal G. 2001. Presence of *Neotyphodium*-like endophytes in European grasses. Ann. Appl. Biol. 139: 119 — 129.
- Lewis G. 2000. *Neotyphodium* endophytes: incidence, diversity, and hosts in Europe. Proc. of the 4<sup>th</sup> International *Neotyphodium*/grass Interactions Symposium. Soest, Germany: 123 — 130.
- Liu D., Van Heeswijck R., Latch G., Leonforte T., Panaccio M., Langford C., Cunninham P., Reed K. 1995. Rapid identification of *Acremonium coenophialum* endophytes through arbitrarily primed PCR. FEMS Microbiology Letter 133: 95 — 98.
- Malinowski D. P., Belesky D. P. 2000. Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: mechanisms of drought and mineral stress tolerance. Crop Sci. 40: 923 — 940.
- Morgan-Jones G., Gams W. 1982. 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.
- Mühle E., Frauenstein L., Schumann K., Wetzl T. 1975. Choroby i szkodniki traw pastewnych. PWRiL, Warszawa: 1 — 412.
- Oliviera J. A., Rottinghaus G. E., Prego C. 2000. Endophytic fungi and alkaloid production in grass seeds in Northern Spain. Proc. of 4<sup>th</sup> International *Neotyphodium*/grass Interactions Symposium. Soest, Germany: 413 — 417.
- Pańka D., Łukanowski A. 2000. Occurrence of *Acremonium lolii* in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) cultivated in the Kujawy and Pomerania region of Poland. Proc. of 4<sup>th</sup> International *Neotyphodium*/grass Interactions Symposium. Soest, Germany: 419 — 421.
- Pańka D., Sadowski Cz. 2002. 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. Vol. 7: 540 — 541.
- Pańka D., Podkówa L., Lamparski R. 2004. Preliminary observations on the resistance of meadow festucue (*Festuca pratensis* Huds.) infected by *Neotyphodium uncinatum* to diseases and pests and native value. In: Proc. of 5<sup>th</sup> International Symposium on *Neotyphodium*/ Grass Interaction. Kallenbach R. *et al.* (eds.). Fayetteville, AR USA, May 23–26, 2004, 401: 88 — 90.

- Paul V. H., Dapprich D., Krohn K. 2000. Preface. Proc. of the 4<sup>th</sup> International *Neotyphodium*/Grass Interactions Symposium, Soest, Germany: 1.
- Paul V. H., Ostbohmke H., Feuerstein U. 2000 a. Studies on the dynamics of colonization of the endophytic fungus *Neotyphodium lolii* (Latch, Christensen & Samuels) Glenn, Bacon & Hanlin comb. Nov) (syn. *Acremonium lolii* (Latch, Christensen & Samuels) in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) in an European grass breeding process. Proc. of the 4<sup>th</sup> International *Neotyphodium*/Grass Interactions Symposium, Soest, Germany: 71 — 77.
- Petroni O. 1986. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In: Microbiology of Phyllosphere. Cambridge University Press, Cambridge: 175 — 187.
- Pfannmöller M., Eggstein S., Schöberlein W. 1994. Endophytes in European varieties of *Festuca* species. IOBC wprs Bulletin 17/1: 101 — 109.
- Porter J. K. 1995. Analysis of endophyte toxins: fescue and other grasses toxic to livestock. J. Anim. Sci 73: 871 — 880.
- Raynal G. 1991. Liberation des ascospores d'*Epichloe typina* agent la quenouille du dactyle. Consequence pour l'epidemiologie et la lutte. Fourages 127: 345 — 358.
- Reed K. M., Walsh J. R., McFarlane N. M., Cross P. A. 2000 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.
- Reinholz J., Dapprich P.D. Holzmann-Wirth A., Paul V. H. 2000. A two year field study to monitor the effect of nitrogen fertilization on dry matter yield and lolitrem B content *Neotyphodium lolii* infected *Lolium perenne* L. Proc. of the 4<sup>th</sup> International *Neotyphodium*/Grass Interactions Symposium, Soest, Germany: 51 — 64.
- Rolston M. P., Rowarth J. S. 1995. Aspects of endophyte in ryegrass (*Lolium perenne*) seed production. Proc of Third International Herbage Seed Conference, Halle, Germany: 433 — 437.
- Saha D. C., Jackson M. A., Jonson-Cicalese J. M. 1988. A rapid staining method for detection of endophytic fungi in turf and forage grasses. Phytopathology 78: 237 — 239.
- Siegel M. R., Varney D. R., Johnson M. C., Nesmith W. C., Buckner R. C., Bush L. P., Burrus P. B., Hardison J. R. 1984. A fungal endophyte of tall fescue: evaluation of control methods. Phytopathology 74/8: 937 — 941.
- Siegel M. R., Latch G. C. M., Johnes M. C. 1985. *Acremonium* fungal endophytes of Tall Fescue and Perennial ryegrass: significance and control. Plant Dis. 69/2: 179 — 183.
- Vazquez de Aldana B. R., Zabalgogazcoa I., Garcia-Ciudad A., Gracia-Criado B. 2000. Detection of ergovaline in endophyte infected *Holcus lanatus* from natural grassland in western Spain. Proc. of the 4<sup>th</sup> International *Neotyphodium*/Grass Interactions Symposium, Soest, Germany: 477 — 481.
- White J. F. Jr., Cole G. T. 1985. Endophyte-host associations in forage grasses. I. Distributions of fungal endophytes in some species of *Lolium* and *Festuca*. Mycologia 77: 323 — 327.
- White J. F. Jr., Cole G. T. 1986. Endophyte-host associations in forage grasses. IV. The endophyte of *Festuca versuta*. Mycologia 78: 102 — 107.
- White J. F. Jr. 1987. Widespread distribution of endophytes in the *Poaceae*. Plant Disease 71: 340 — 342.
- White J. F. Jr., Mongan-Jones G. 1987. Endophyte — host associations in forage grasses. IX. Concerning *Acremonium typhinum*, the anamorph of *Epichloë typhina*: Mycotaxon 29: 489 — 500.
- Wäli P., Saikkonen K., Helander M., Lehtimäki S., Lehtonen P. 2000. Seed transmitted endophytic fungi in wild grass population in Finland. Proc. of 4<sup>th</sup> International *Neotyphodium*/grass Interactions Symposium. Soest, Germany: 93 — 96.
- Welty R. E., Rennie W. J. 1985. ISTA Handbook on seed health testing. Working sheet No 55: Grasses, Endophyte. International Seed Testing Association, Zurich, Switzerland: 1 — 4.
- Welty R. E., Azevedo M. D., Cook K. L. 1986. Detecting viable *Acremonium* endophytes in leaf sheaths and meristems of tall fescue and perennial ryegrass. Plant Dis. 70: 431 — 435.
- Welty R. E., Azevedo M. D. Cooper T. M. 1987. Influence of moisture content, temperature, and length of storage on seed germination and survival of endophytic fungi in seeds of tall fescue and perennial ryegrass. Phytopathology 77: 893 — 900.

- Welty R. E., Milbrath G. M., Faulkenberry D., Meek L., Hall K. 1986. Endophyte detection in tall fescue seed by staining and ELISA. *Seed Sci. Technol.* 14: 105 — 116.
- West C. P., Gwinn K. D. 1993. Role of *Acremonium* in drought, pest, and disease tolerance of grasses. *Proc of 2<sup>nd</sup> International Symposium on Acremonium/grass interactions*. Palmerston North, New Zealand: 131 — 140.
- Woodburn O. J., Walsh J. R., Foot J. Z., Hazlewood P. G. 1993. Seasonal ergovaline concentrations in perennial ryegrass cultivars of differing endophyte status. *Proc of 2<sup>nd</sup> International Symposium on Acremonium/grass interactions*. Palmerston North, New Zealand: 100 — 102.