

BARBARA WIEWIÓRA¹**GRZEGORZ ŻUREK**²**MONIKA ŻUREK**³¹ Zakład Nasiennictwa i Nasionoznawstwa, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — PIB² Zakład Traw, Roślin Motylkowatych i Energetycznych, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — PIB³ Zakład Genetyki i Hodowli Roślin, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — PIB

Ocena zasiedlenia przez grzyby endofityczne nasion wybranych mieszanek traw pastewnych dostępnych na rynku krajowym

Endophyte infestation of grass seeds in selected fodder mixtures available on the domestic market

Przy pomocy metody immunologicznej badano obecność grzybów endofitycznych w nasionach traw wchodzących w skład 10 mieszanek łąkowo-pastwiskowych dostępnych na rynku krajowym. Stwierdzono, że nasiona traw wchodzące w skład mieszanek pastewnych mogą być zasiedlone przez grzyby endofityczne. Spośród gatunków stanowiących główne komponenty mieszanek najczęściej zasiedlane były nasiona życicy trwałej, kostrzewy czerwonej i wiechliny łąkowej. Badania wskazują, że użycie na łąkach i pastwiskach materiału siewnego o nieznanej zawartości grzybów endofitycznych, może być przyczyną wprowadzania endofitów na tereny dotychczas wolne od nich, a to może wpływać na wzrost zagrożenia dla zwierząt hodowlanych.

Słowa kluczowe: endofity, materiał siewny, mieszanki pastewne, trawy

Ten fodder grass mixtures, available on the domestic market, were tested for the incidence of endophytic fungi using the immunoblot method. All the mixtures were found to be colonized by endophytes, irrespective of the grass species composition and the mixtures usage (pasture or meadow). The occurrence of endophytes was highest in perennial ryegrass, red fescue and smooth-stalked meadowgrass. It may be conclude from the results obtained that using seed material of undetermined level of endophyte colonization on newly sown or regenerated meadows and/or pastures can result in causing the unintended endophyte contamination of previously endophyte-free areas. The presence of endophytic fungi in permanent grasslands can be a great threat for domestic animals.

Key words: endophyte, fodder mixtures, grasses, sowing material

WSTĘP

Z punktu widzenia dobrostanu zwierząt, najbardziej korzystną formą odżywiania jest spasanie ich na trwałych użytkach zielonych. W celu założenia lub renowacji już istniejącego użytku zielonego, stosuje się wysiew nasion mieszanki pastewnej o zróżni-

cowanym składzie gatunkowym. Mieszanki tego typu najczęściej zawierają w swoim składzie następujące gatunki traw: *Lolium perenne* L. (życica trwała), *Festuca pratensis* Huds. (kostrzewa łąkowa), *F. arundinacea* Schreb. (kostrzewa trzcinowa), *F. ovina* L. (kostrzewa owcza) oraz *F. rubra* L. (kostrzewa czerwona). Gatunki te są równocześnie uważane za głównych gospodarzy grzybów endofitycznych (głównie z rodzaju *Neotyphodium*). Do najbardziej powszechnych i najlepiej poznanych grzybów z rodzaju *Neotyphodium* należą: *N. coenophialum* Morgan-Jones & Gams, *N. uncinatum* Gams, Petroni & Schmidt, *N. lolii* Latch, Christensen & Samuels, oraz *N. typhinum* Morgan-Jones & Gams (Prończuk, 2005). W stosunku do tych grzybów stosowany jest również termin „seed borne fungi”, ponieważ grzyby te przenoszą się z nasionami (White i Cole, 1986; White, 1987). Grzybnia zasiedla głównie warstwę aleuronową, ale jej rozmieszczenie w ziarniakach traw bywa różne. Zasiedlone ziarniaki nie posiadają widocznych objawów endofitów (Wiewióra i Prończuk, 2006).

Szkodliwość grzybów endofitycznych w stosunku do zwierząt roślinożernych związana jest z wytwarzaniem niebezpiecznych dla zdrowia kręgowców alkaloidów, głównie lolitremu B oraz ergowaliny (Lewis, 2000). W wielu krajach, np.: Nowej Zelandii, czy Stanach Zjednoczonych, choroby zwierząt wywoływane przez te toksyny stanowią poważny problem (Zabalgogezcoa i in., 2003). Przeprowadzone dotychczas krajowe badania nad zasiedleniem traw przez endofity wykazały, 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). Występowanie endofitów w runi użytków zielonych może wiązać się z produkowaniem przez nie alkaloidów, należy mieć pewność, że użytki zielone oraz mieszanki stosowane do ich zakładania, bądź renowacji są wolne od grzybów endofitycznych i dlatego są bezpieczne dla spasnanych tam zwierząt gospodarskich.

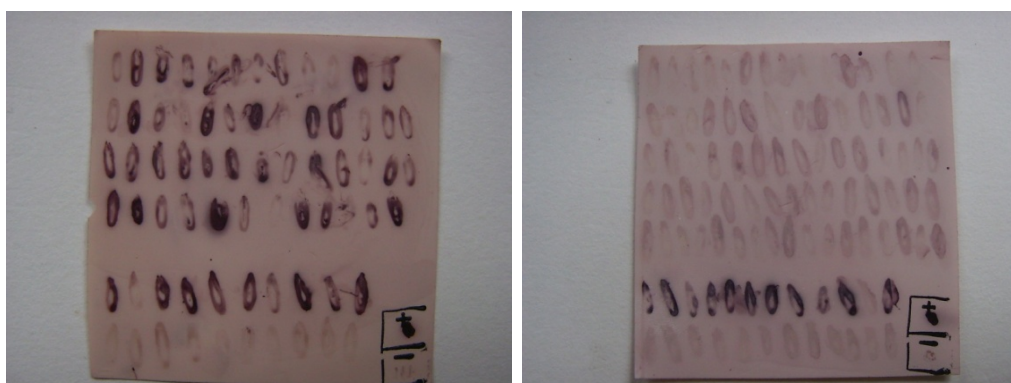
Celem pracy była analiza zasiedlenia przez grzyby endofityczne ziarniaków traw wchodzących w skład wybranych mieszanek pastwiskowych i łąkowych znajdujących się na rynku krajowym.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiły nasiona traw wchodzących w skład 10 mieszanek łąkowo-pastwiskowych dostępnych na rynku. Mieszanki te zakupiono w losowo wybranych sklepach branży ogrodniczo-nasiennej na terenie województw: mazowieckiego i podlaskiego. Z każdej zakupionej mieszanki pobrano losowo próbki ziarniaków do badania.

Badanie zawartości endofitów metodą immunologiczną przeprowadzono na 5 losowo wybranych z każdej mieszanki próbkach, po 100 ziarniaków na próbkę, według procedury opracowanej przez Hilla i wsp. (2002). W przypadku wykrycia w mieszance nasion traw zasiedlonych przez endofity, z mieszanki tej wybierano po 100 nasion każdego z gatunków wchodzących w jej skład. Nasiona poszczególnych gatunków analizowano następnie pod kątem zawartości grzybów endofitycznych, również metodą immunologiczną.

Badaną próbkę ziarniaków, w celu ich zmiękczenia moczone w 5% roztworze NaOH. Po upływie około godziny, nasiona płukano destylowaną wodą i wykładano na nitrocelulozową membranę umieszczoną na gąbce zwilżonej buforem ekstrahującym. W wyznaczonych miejscach na membranie wykładano również nasiona o stwierdzonej obecności endofitów (E+) oraz wolne od endofitów (E-), których próbki dołączone są do każdego zestawu (kontrola pozytywna i negatywna). Membranę z ziarniakami inkubowano przez 15 godzin w temperaturze 45°C. Po inkubacji, nasiona usuwano z membrany, a membranę suszono w suszarce w 70°C przez 15 min. lub w temperaturze pokojowej przez 1 h. Następnie zalewano membranę 10 ml roztworu blokującego miejsca niespecyficznego wiązania przeciwciał i wytrząsano przez 30 min. na wytrząsarce. Po upływie tego czasu zlewano roztwór blokujący z szalki Petrie'go, zalewano membranę 10 ml roztworu zawierającego specyficzne dla *Neotyphodium*, przeciwciała monoklonalne i wytrząsano przez godzinę. Potem membranę płukano dwukrotnie w roztworze blokującym, zalewano roztworem przeciwciała wtórnego (*rabbit anti-mouse antibody*) i wytrząsano przez godzinę. Następnie płukano dwukrotnie w roztworze blokującym, zalewano membranę roztworem fosfatazy alkalicznej i wytrząsano przez 30 min. Po upływie tego czasu ponownie dwukrotnie płukano membranę w roztworze blokującym. Ostatnim etapem jest dodanie chromogenu (substrat fosfatazy) oraz przykrycie szalki Petriego folią aluminiową i wytrząsanie przez 20 min. do czasu wybarwienia miejsc na membranie, na których znajdowały się nasiona E+ (rys. 1). W celu zakończenia procesu wybarwienia, membranę kilkakrotnie płukano w wodzie destylowanej (Trento i in., 2007).



Rys. 1. Membrana przedstawiająca nasiona wykazujące pozytywną (lewa) i negatywną (prawa) reakcję na *Neotyphodium* spp. oraz kontrolę (dwa dolne rzędy) pozytywną (+) i negatywną (-)

Fig. 1. Membrane showing positive (left) and negative (right) reaction of grass seeds to *Neotyphodium* spp. Two bottom rows present positive (+) and negative (-) control

WYNIKI I DYSKUSJA

Badane mieszanki były zróżnicowane pod względem składu gatunkowego i odmianowego, jak również pod względem procentowego udziału poszczególnych komponentów. Średnia liczba komponentów gatunkowych w mieszankach wynosiła 6,6, z wahaniami od

2 (mieszanka nr 3) do 10 (mieszanka nr 10). Udział traw w badanych mieszankach wahał się od 75 do 100%, pozostałe gatunki to rośliny motylkowate drobnonasienne: lucerna siewna (*Medicago sativa* L.) oraz 4 gatunki koniczyn (*Trifolium* spp., tab. 1).

Tabela 1

Skład gatunkowy badanych mieszanek traw
Species composition of examined grass mixtures

Numer mieszanki oraz typ użytkowania Mixture number and type of use	Skład gatunkowy (%) Species composition (%)														
	<i>Dactylis glomerata</i>	<i>Festuca arundinacea</i>	<i>Festuca ovina</i>	<i>Festuca pratensis</i>	<i>Festuca rubra</i>	<i>Lolium perenne</i>	<i>Lolium spp.*</i>	<i>Phleum pratense</i>	<i>Poa pratensis</i>	<i>Bromus unioloides</i>	<i>Medicago sativa</i>	<i>Trifolium hybridum</i>	<i>Trifolium repens</i>	<i>Trifolium alexandrinum</i>	<i>Trifolium pratense</i>
1. Meadow Łąkowa	-	-	-	15	5	15	20	15	-	5	12,5	5	7,5	-	-
2. Pasture Pastwiskowa	-	-	-	5	28	20	17	20	-	-	-	5	-	5	-
3. Universal Uniwersalna	-	-	-	-	45	55	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4. Pasture Pastwiskowa	-	-	-	16	20	20	13	20	4	-	-	4	3	-	-
5. Cut pasture Kośno-pastwiskowa	-	-	-	5	5	33	43	6	-	-	-	4	-	-	4
6. Fodder Pastewna	-	-	-	15	-	40	5	25	-	-	-	-	5	-	10
7. Fodder Pastewna	15	-	-	10	-	70	5	-	-	-	-	-	-	-	-
8. Meadow-pasture Łąkowo-pastwiskowa	-	-	-	5	12	38	35	10	-	-	-	-	-	-	-
9. Meadow Łąkowa	-	20	-	20	-	15	5	20	10	-	-	5	5	-	-
10. Cut pasture Kośno-pastwiskowa	10	10	5	10	10	20	10	15	-	-	5	-	5	-	-
Średnio Mean	12,5	15	5	11,2	17,9	32,6	17	16,4	7	5	8,75	4,6	5,1	5	7

* *L. multiflorum* + *Lolium × boucheanum*

Trawy w badanych mieszankach to 11 gatunków: życica trwała (*Lolium perenne* L.), życica wielokwiatowa (*L. multiflorum* L.) i życica mieszańcowa (*Lolium × boucheanum* Kunth.), kostrzewa łąkowa (*Festuca pratensis* Huds.), kostrzewa czerwona (*F. rubra* L.), kostrzewa trzcinowa (*F. arundinacea* Schreb.), kostrzewa owcza (*F. ovina* L.), wiechlina łąkowa (*Poa pratensis* L.), tymotka łąkowa (*Phleum pratense* L.), stokłosa bezostna (*Bromus inermis* Leyss.) i kupkówka pospolita (*Dactylis glomerata* L.). Gatunkami najczęściej występującymi w badanych mieszankach były życice: trwała (obecna we wszystkich badanych mieszankach), wielokwiatowa i mieszańcowa (łącznie wystąpiły w 9

mieszkach) oraz kostrzewa łąkowa (również w 9 mieszkach). Życica trwała była najczęściej i najobficiej występującym gatunkiem, a jej udział stanowił średnio 32,6% (od 15 do 70%). Pozostałe gatunki występowały w mniejszym natężeniu: średnio od 5,0% udziału kostrzewy owczej i stokłosa bezostnej do 17,9% dla kostrzewy czerwonej (tab. 1).

Tabela 2

Zasiedlenie przez endofity badanych mieszanek oraz ziarniaków ich komponentów gatunkowych
Endophyte infection of the examined mixtures and their components

Numer mieszanki oraz typ użytkowania Mixture number and type of use	% porażenia nasion mieszanki przez endofity Percentage of endophyte colonized seed in mixture	Obecność endofitów w gatunkach wchodzących w skład mieszanki: Presence of endophyte in species grass included in mixture composition:								
		<i>Dactylis glomerata</i>	<i>Festuca arundinacea</i>	<i>Festuca ovina</i>	<i>Festuca pratensis</i>	<i>Festuca rubra</i>	<i>Lolium perenne</i>	<i>Lolium spp.</i>	<i>Phleum pratense</i>	<i>Poa pratensis</i>
1. Meadow łąkowa	12,0	*	*	*	-	-	-	-	+	*
2. Pasture Pastwiskowa	14,8	*	*	*	+	+	+	+	-	*
3. Universal Uniwersalna	25,2	*	*	*	*	+	+	*	*	*
4. Pasture Pastwiskowa	33,5	*	*	*	+	+	+	-	-	+
5. Cut pasture Kośno-pastwiskowa	26,0	*	*	*	+	+	+	+	+	*
6. Fodder Pastewna	20,8	*	*	*	+	*	+	+	+	*
7. Fodder Pastewna	20,0	-	*	*	+	*	+	+	*	*
8. Meadow-pasture łąkowo-pastwiskowa	22,5	*	*	*	+	+	+	-	+	*
9. Meadow łąkowa	14,8	*	+	*	-	*	+	+	+	+
10. Cut pasture Kośno-pastwiskowa	8,5	+	+	-	-	-	+	+	*	+

* Gatunek nie jest komponentem mieszanki; Species is not a mixture component

+ Gatunek zasiedlony przez endofity; Species colonized by endophyte

- Gatunek niezasiedlony przez endofity; Species not colonized by endophyte

Przeprowadzone analizy wykazały, że we wszystkich badanych mieszkach, niezależnie od ich przeznaczenia i składu gatunkowego, obecne były nasiona zasiedlone przez grzyby z rodzaju *Neotyphodium*. Mieszanki wykazywały zróżnicowany stopień zasiedlenia: od 8,5% dla mieszanki kośno-pastwiskowej (nr 10) do 33,5% dla mieszanki pastwiskowej (nr 4). Badania wykonane na komponentach gatunkowych mieszanek wykazały, że endofity występowały najczęściej w ziarniakach życicy trwałej (w 9 mieszkach na 10 badanych) i kostrzewy czerwonej (w 5 mieszkach na 7 badanych).

Stwierdzono również, że wszystkie próby ziarniaków wiechliny łąkowej występującej w składzie badanych mieszanek były zasiedlone przez endofity, ale zaznaczyć należy, że nasiona tego gatunku wystąpiły tylko w dwóch mieszankach (tab. 2).

Wyniki dotyczące obecności endofitów w materiale siewnym mieszanek pośrednio potwierdzają rezultaty analizy zasiedlenia przez endofity ziarniaków odmian, rodów i ekotypów 4 gatunków traw (kostrzewy łąkowej, k. czerwonej, życicy trwałej i śmialka darniowego) uzyskane przez Wiewiórę i Prończuk (2006). Autorki badając 17 prób ziarniaków stwierdziły brak endofitów tylko w jednej próbie, zaś w przypadku 5 zasiedlenie ziarniaków wyniosło powyżej 70%. Równie wysokie zasiedlenie ziarniaków traw przez endofity (dochodzące nawet do 100%), zwłaszcza u gatunków *Festuca* i *Lolium perenne*, notowali Funk i wsp. (1994), Schöberlein i wsp. (1995), Eggstein i wsp. (1996), Guillaumin i wsp. (2000), Leyronas i Raynal (2001) oraz Cagaš (2005).

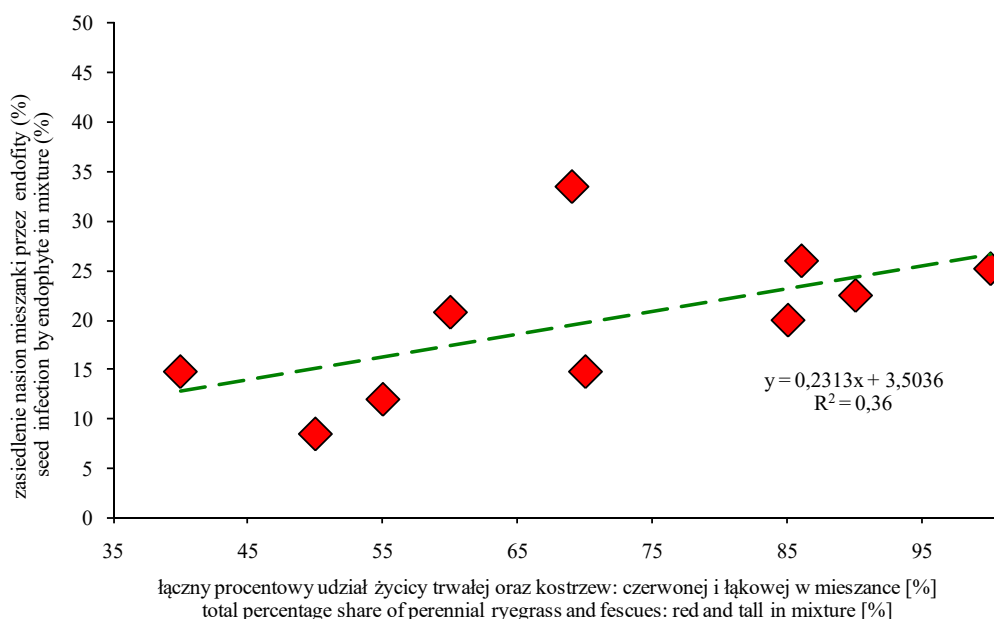
Największy udział w ogólnym zasiedleniu badanych mieszanek przez endofity miały: życica trwała — średnio 33,8% (od 0 do 92,5%) i wiechlina łąkowa — średnio 32,9% (od 21,2 do 44,6%; tab. 3).

Tabela 3

Porażenie przez endofity nasion poszczególnych komponentów gatunkowych mieszanek
Endophyte infestation of seeds of particular grass species in mixtures

Numer mieszanki oraz typ użytkowania / Mixture number and type of use	Zasiedlenie przez endofity nasion poszczególnych gatunków traw w mieszankach (%)								
	Endophyte infestation of particular grass species in mixtures (%)								
	<i>Dactylis glomerata</i>	<i>Festuca arundinacea</i>	<i>Festuca ovina</i>	<i>Festuca pratensis</i>	<i>Festuca rubra</i>	<i>Lolium perenne</i>	<i>Lolium spp.</i>	<i>Phleum pratense</i>	<i>Poa pratensis</i>
1. Meadow Łąkowa	-	-	-	0	0	0	0,0	100	-
2. Pasture Pastwiskowa	-	-	-	46,6	0	16,9	29,7	6,8	-
3. Universal Uniwersalna	-	-	-	-	7,5	92,5	-	-	-
4. Pasture Pastwiskowa	-	-	-	57,6	9	12,2	-	-	21,2
5. Cut pasture Kośno-pastwiskowa	-	-	-	3,8	20	12,4	60	3,8	-
6. Fodder Pastewna	-	-	-	12,5	-	47,1	30,8	9,6	-
7. Fodder Pastewna	0	-	-	-	-	83,5	16,5	-	-
8. Meadow-pasture Łąkowo-pastwiskowa	-	-	-	35,1	15,1	20	0	29,8	-
9. Meadow Łąkowa	-	6,2	-	0	-	23,6	2,0	23,6	44,6
10. Cut pasture Kośno-pastwiskowa	11,8	0	23,5	11,8	23,5	29,4	0	0	-
Średnio Mean	5,9	3,1	23,5	20,9	10,7	33,8	17,4	24,8	32,9

Udział pozostałych gatunków wchodzących w skład badanych mieszanek wahał się średnio od 3,1% dla kostrzewy trzcinowej do 24,8% dla tymotki łąkowej. Analiza korelacji wykazała istotną zależność pomiędzy łącznym udziałem ziarniaków życicy trwałej, kostrzewy łąkowej i kostrzewy czerwonej w mieszance, a stopniem zasiedlenia tej mieszanki grzybami endofitycznymi (rys. 2).



Rys. 2. Zależność między stopniem zasiedlenia nasion mieszanki przez grzyby endofityczne a łącznym udziałem życicy trwałej, kostrzewy łąkowej i kostrzewy czerwonej w mieszance
Fig. 2. The relationship between endophyte infection of seeds in the mixture and contribution of perennial ryegrass, tall fescue and red fescue in the mixture

Analizując skład gatunkowy mieszanki nr 4 i nr 10 zauważyć należy, że w pierwszej z nich (o 6 komponentach z grupy traw), nasiona 4 gatunków były zasiedlone przez grzyby endofityczne, czyli 60% nasion traw wchodzących w skład tej mieszanki (tab. 1 i 2). Ponadto największy udział w zasiedleniu miały nasiona życicy trwałej (57,6%), które w mieszance stanowiły 20% wszystkich nasion traw. W porównaniu do tego, w mieszance nr 10 o 8 komponentach z grupy traw, nasiona 5 z nich były zasiedlone przez grzyby endofityczne, czyli 55% nasion traw wchodzących w skład tej mieszanki (tab. 1 i 2). Podobnie jak w mieszance nr 4, w mieszance kośno-pastwiskowej nr 10 największy udział w zasiedleniu grzybami endofitycznymi miały nasiona życicy trwałej (stanowiące również 20% składu całej mieszanki), ale wyniósł on zaledwie 29,4% (tab. 3).

Wyniki te pozwalają na stwierdzenie, że materiał siewny mieszanek pastwiskowych dostępnych na rynku krajowym, może być przyczyną niezamierzonego wprowadzenia endofitów na tereny dotychczas wolne od nich w trakcie zakładania, bądź renowacji istniejących łąk i pastwisk. Jeżeli zaś wprowadzimy z nasionami endofity produkujące szkodliwe dla zwierząt alkaloidy, to jednocześnie stworzymy zagrożenie dla zwierząt hodowlanych. Badania przeprowadzone przez Hume i Barker (2005) na pastwiskach obsianych *L. perenne* wykazały, że nawet jeżeli pastwisko zakładane było przy użyciu

materiału siewnego wolnego od endofitów lub zasiedlonego w niewielkim stopniu, to w kolejnych latach użytkowania stopień zasiedlenia nasion wzrastał. Podobne wnioski w swojej pracy odnośnie wpływu lat użytkowania plantacji na poziom infekcji nasion traw przez endofity przedstawia Wiewióra i wsp. (2006). Zjawisko to można tłumaczyć pozostałością w glebie nasion zakażonych endofitami, lub selektywnością bydła w zjadaniu roślin zawierających endofity (szczególnie tych, które są zdolne do produkcji alkaloidów, Hume i Barker, 2005).

WNIOSKI

1. Badania materiału siewnego pastewnych mieszanek dostępnych na rynku krajowym pozwalają na stwierdzenie, że jest on zasiedlony przez grzyby endofityczne, czasami nawet w znacznym stopniu.
2. Spośród gatunków wchodzących w skład badanych mieszanek najczęściej zasiedlane były nasiona życicy trwałej, kostrzewy czerwonej i wiechliny łąkowej.
3. Konieczne jest prowadzenie monitoringu dostępnych na rynku mieszanek pastwiskowych pod kątem obecności w ziarniakach grzybów endofitycznych.

LITERATURA

- Cagaš B. 2005. The role endophytes *Neotyphodium* spp. in breeding of grasses for resistance to stress at the Grassland Research Station Rožnov-Zubří. W: Recent advances in genetics and breeding of the grasses. Zwierzykowski Z., Kosmala A (eds). IGR. PAN, Poznań: 177 — 190.
- Eggstein S., Pfannmöller M., Schöberlein W. 1996. *Acremonium* spp. — occurrence in cultivars and collected ecotypes of the genus *Festuca*. The 2nd International Conference on Harmful and Beneficial Microorganisms in Grassland, Pastures and Turf. Krohn K., Paul V. H. (eds.) IOBC wprs Bulletin Vol. 19 (7): 161 — 167.
- 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.
- Guillaumin J. J., Frain M., Pichon N., Ravel C. 2000. Survey of fungal endophytes in wild grass species in the Auvergne region (central France). Proc. of the 4th International *Neotyphodium*/Grass Interactions Symposium, Soest, Germany: 85 — 92.
- Hill N. S., Hiatt E. E., De Battista J. P., 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.
- Hume D. E., Barker D. J. 2005. Growth and management of endophytic grasses in pastoral agricultures. *Neotyphodium* in cool-season grasses. Blackwell Publ. 201 — 223.
- Lewis G. C. 2000. *Neotyphodium* endophytes: incidence, diversity, and hosts in Europe. Proceedings of the 4th International *Neotyphodium*/Grass Interaction Symposium.: 123 — 130.
- Leyronas C., Raynal G. 2001. Presence of *Neotyphodium*-like endophytes in European grasses. Ann. Appl. Biol. 139: 119 — 129.
- Pańska D., Żurek G. 2005. Występowanie grzybów endofitycznych na trawach gazonowych a ich podatność na stres suszy. Łąkarstwo w Polsce 8: 1 — 7.
- Prończuk M. 2005. Endofity traw — znaczenie, występowanie i metody wykrywania. Przegląd literatury. Biul IHAR 235: 297 — 309.
- Schöberlein W., Eggstein S., Pfannmöller M. 1995. Effects of endophyte-infected varieties of *Festuca pratensis* on seed production. Proc. of the Third International Herbage Seed Conference Yield and Quality in Herbage Seed Production, Halle (Saale), Germany: 438 — 442.

- Trento S. Elias S. Garay A. Zavala, J. 2007. Comparison of endophyte detection in fescue and ryegrass seeds using an immunoblot assay and a microscopic method. *Seed Science and Technology* Vol. 35 (No.1): 65 — 74.
- White J. F.Jr. 1987. Widespread distribution of endophytes in the *Poaceae*. *Plant Dis.* 71: 340 — 342.
- White Jr, J. F., Cole, G. T. 1986 Endophyte-host associations in forage grasses. V. Occurrence of fungal endophytes in certain species of *Bromus* and *Poa*. *Mycologia* 78: 846 — 850.
- Wiewióra B., Prończuk M. 2006. Porównanie metody mikroskopowej i immunologicznej do wykrywania grzybów endofitycznych w nasionach traw. *Biul. IHAR* 242: 277 — 284.
- 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. Występowanie endofitów w rodach hodowlanych kostrzewy łąkowej (*Festuca pratensis* Huds.) odmiany Pasja. Sympozjum „Choroby roślin na tle zmian klimatycznych, Wrocław 17–19 wrzesień 2008: 82.
- Zabalogoegazcoa 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.