

تأثیر قارچ‌های اندوفایت بر خصوصیات فیزیولوژیکی و مقاومت به سرما در دو گونه فسکیوی مرتعی و فسکیوی بلند

مهديه پارسائیان^۱، آقافخر میرلوحی^۱، عبدالمجید رضایی^۱ و مجتبی خیام نکویی^۲

چکیده

به منظور بررسی نقش اندوفایت‌ها در ایجاد خصوصیات با ارزش فیزیولوژیکی و افزایش مقاومت به سرما در دو گونه فسکیوی مرتعی (*Festuca pratensis* Huds.) و فسکیوی بلند (*Festuca arundinacea* Schreb.)، پژوهشی در سال ۱۳۸۱ در دانشگاه صنعتی اصفهان اجرا شد. در این راستا کلون‌های آلوده به قارچ اندوفایت و عاری از آن، از دو توده گیاه فسکیوی بلند با شماره‌های ۷۵ و ۸۳ و یک گیاه فسکیوی مرتعی با شماره ۶۰ تهیه گردید. کلون‌ها تحت تأثیر تیمارهای سرمایی شامل ۶، ۲-، ۱۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و با شاهد (۲۰ درجه سانتی‌گراد) مقایسه شدند. آزمایش در هر تیمار دمایی در قالب طرح آزمایشی فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار اجرا گردید. آنالیزهای آماری در هر سطح سرمایی به طور جداگانه و سپس به صورت تجزیه مرکب انجام شد. پس از اعمال تیمارها صفات محتوای نسبی آب برگ و طوقه، میزان تراوش یونی، درصد خسارت غشای سیتوپلاسمی و محتوای اسید آمینه پرولین اندازه‌گیری گردید. حضور اندوفایت‌ها منجر به افزایش جزئی در مقدار نسبی آب برگ و طوقه گردید. میزان اسید آمینه پرولین در گیاهان حاوی اندوفایت در مقایسه با گیاهان فاقد آن در هر دو شرایط تنش و عدم تنش به طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر بود. قارچ‌های اندوفایت در حفظ پایداری غشاهای سلولی و در نتیجه کاهش میزان نشت الکترولیتی در کلیه سطوح دمایی تأثیر گذار بودند. در میان ژنوتیپ‌های مورد بررسی، ژنوتیپ ۸۳ به ویژه در حضور اندوفایت از نظر برخی از صفات بررسی شده کاراتر عمل نموده و مقاومت به سرمای بیشتری از خود نشان داد. ژنوتیپ‌های ۷۵ و ۶۰ در مراتب بعدی قرار گرفتند.

واژه‌های کلیدی: قارچ‌های اندوفایت، فسکیوی مرتعی، فسکیوی بلند، مقاومت به سرما، صفات فیزیولوژیک

مقدمه

سیتوپلاسمی و در سطح گیاه محدود شدن جذب آب و عناصر غذایی، بیوسنتز کمتر، کاهش جذب خالص فتوسنتزی، توقف رشد و در نهایت مرگ گیاه را به همراه دارد (۲).

به دنبال کشف تغییرات مطلوب مورفولوژیک و

سرما، به عنوان یکی از تنش‌های محیطی غیر زیستی، مشکلات بسیاری را برای گیاهان چه در سطح سلولی شامل واکنش‌های از دست دادن فشار تورژسانس و بر هم خوردن تعادل غشای

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار و استاد زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۲. عضو هیئت علمی مؤسسه تحقیقات شهید فزوه، اصفهان

الکتروولت‌های مختلف به خارج از سلول را در پی دارد و گیاهانی که بتوانند با استفاده از یک یا چند مکانیسم ساختار طبیعی غشای خود را حفظ نمایند، مقاوم خواهند بود (۲).

تولید دی ساکاریدی نظیر تری هالوز که به هنگام فرایند تطابق یابی در سلول انباشته می‌شود، در گراس‌های حاوی اندوفایت به اثبات رسیده است. این قند علاوه بر داشتن نقش اسمتیک، می‌تواند منجر به پایداری لایه‌های فسفولیپیدی و پروتئین‌های غشای سلولی شود. به همین دلیل انتظار می‌رود که عملاً در شرایط تنش‌های آب کشیدگی مانند سرما نیز این قند از میزان نشت الکتروولت در گیاهان حاوی اندوفایت بکاهد (۱۶). کراو و همکاران (۷) اعلام نمودند که غشاهای و پروتئین‌هایی که در حضور تری هالوز آب از دست می‌دهند، وقتی دوباره آب جذب می‌کنند، فعالیت خود را به طور کامل از سر خواهند گرفت. آنها دلیل این امر را اتصال تری هالوز به گروه‌های آب‌گریز لایه بیرونی غشای سلولی و در نتیجه حفظ حالت نیمه مایع غشا در طی آب کشیدگی ذکر نمودند.

در فرایندهای القاء شده به وسیله تنش در گیاهان آوندی، قارچ‌ها، جلبک‌ها و باکتری‌ها، از نظر تجمع متابولیت‌ها شباهت‌هایی وجود دارد که به وسیله مطالعات بیوشیمیایی تأیید شده است. این متابولیت‌ها شامل ترکیبات نیتروژنه (مانند پرولین) و ترکیبات واجد هیدروکسیل می‌باشند (۲). مالینوسکی و بلسکی (۱۱)، در بررسی مکانیسم‌های مقاومت به خشکی در گیاهان، اظهار داشتند حضور اسیدآمین پیرولین، که یکی از محصولات تجزیه آلکالوئید ارگوت و سنتز پیرامین تولید شده توسط قارچ‌های اندوفایت می‌باشد، تحمل بهتر تنش‌های آب کشیدگی را در میزبان‌های آلوده امکان‌پذیر می‌سازد (۱۶). محلول‌هایی مانند پرولین یا تری هالوز تجمع یافته در سلول، نوعی نقش حفاظتی برای غشای سلولی دارند. غلظت بالای پرولین در پوست میوه گریپ فروت نشان می‌دهد که مقاومت این میوه به دماهای پایین، هم در مزرعه و هم در محیط‌های انباری بهبود می‌یابد. وجود پرولین در پوست سلول‌های سیب زمینی، آن را

فیزیولوژیک ناشی از حضور قارچ‌های اندوفایت در گونه‌هایی از جنس فستوکا (که دارای اهمیت علوفه‌ای و سازگاری وسیع می‌باشند)، متخصصین اصلاح نباتات به بهره‌گیری از این رابطه در ایجاد گیاهان دارای عملکرد بهینه و عادات رشدی کارآتر در شرایط تنش ترغیب شدند.

اندوفایت‌های همزیست با گیاهان علفی خانواده گندمیان قارچ‌هایی از جنس *Neotyphodium* و خانواده *Clavicipitaceae* هستند که به صورت سیستمیک از طریق بذر گیاهان آلوده به نتاج نسل بعد منتقل می‌شوند و ضمن داشتن رابطه همزیستی، هیچ‌گونه علائم بیماری را در گیاهان میزبان ایجاد نمی‌کنند (۴ و ۱۱).

اندوفایت‌ها تأثیر قابل ملاحظه‌ای در حفاظت بیولوژیک گیاهان در برابر تغذیه حشرات و نماتدهای خاکزی و مقاومت به بیماری‌های قارچی و ویروسی دارند. هم‌چنین در افزایش عملکرد (بذر و علوفه) و دوام گیاه، مبارزه آلوپاتیک با علف‌های هرز و مقاومت به شرایط نامساعد محیطی مانند خشکی، تغییرات pH خاک و سمیت عناصر بسیار مؤثرند (۳، ۵، ۱۰، ۱۱ و ۱۲). بر خورداری از رابطه همزیستی با قارچ‌های اندوفایت پتانسیل میزبان را در انجام فرآیند تنظیم اسمزی افزایش می‌دهد. مشخص شده است که کربوهیدرات‌هایی نظیر فروکتان و ساکارز و مونوساکاریدهای فروکتوز و گلوکز، قندهای الکلی مانیتول و آرابیتول تحت تأثیر اندوفایت، در شرایط تنش آب کشیدگی در گیاه تجمع پیدا می‌کنند که حضور آنها ضمن حفظ تورم سلولی و تسهیل فعالیت‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه، باعث افزایش مقاومت در برابر شرایط نامساعد محیطی (مانند سرما) می‌شود (۱۴ و ۱۶). حفظ محتوای آب و تعویق آب کشیدگی در مناطق رشد گیاه به ویژه طوقه‌ها (محل تجمع قارچ‌ها) عامل فیزیولوژیک دیگری در بقای گیاهان دارای اندوفایت در شرایط آب کشیدگی‌های ناشی از خشکی (و احتمالاً سرما) می‌باشد (۸). نفوذپذیری بیشتر غشای سلولی در نتیجه تنش سرما، افزایش نشت محلول‌های سلولی مانند پتاسیم، آمینواسیدها کربوهیدرات‌ها و در مجموع

در برابر سرما محافظت می‌کند (۲).

با توجه به آثار گزارش شده قارچ‌های اندوفایت بر تحریک تنظیم اسمزی، تعویق آب کشیدگی در مناطق رشدی حساس گیاه (طوقه‌ها) و احتمالاً پایداری غشاهای سلولی که همگی قدرت گیاه را در مقابله با تنش سرما افزایش می‌دهند، به نظر می‌رسد که این قارچ‌ها حضور معنی‌داری در القای صفت مقاومت به سرما داشته باشند. چنانچه اثر مثبت حضور اندوفایت‌ها در ایجاد گیاهان مقاوم به سرما اثبات گردد، چنین گیاهانی می‌توانند مستقیماً جهت کشت در محیط‌های سرد انتخاب گردیده و یا از قارچ‌های محتوی آنها به عنوان پتانسیلی جدید در اعطای ژن‌های مقاومت به سرما از طریق روش‌های مختلف انتقال ژن استفاده نمود. اما، علی‌رغم مطالعات انجام شده برای درک اثر اندوفایت‌ها در بهبود واکنش گیاهان نسبت به شرایط نامساعد محیطی، گزارش‌های زیادی مبنی بر تأثیر اندوفایت‌ها در مواجه شدن گیاه با تنش دمای پایین، منتشر نشده است. تحقیق حاضر گامی در راستای بررسی این جنبه از همزیستی اندوفایت خواهد بود.

مواد و روش‌ها

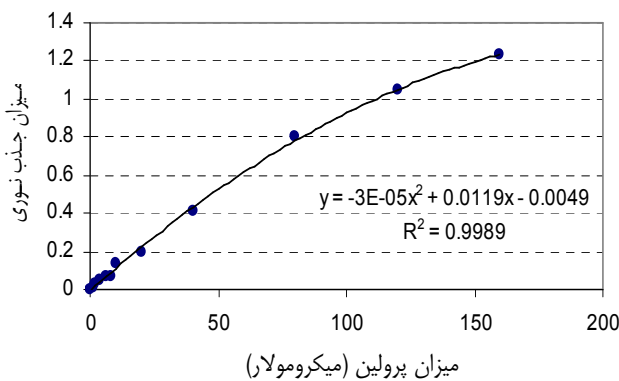
این پژوهش در سال ۱۳۸۱ در دو بخش گلخانه‌ای و آزمایشگاهی در دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان به اجرا درآمد. ماده آزمایشی مورد استفاده شامل سه کلون بود. دو کلون از گیاه فسکیوی بلند (*Festuca arundinacea* Schreb.) (ژنوتیپ‌های ۷۵ و ۸۳) که هگزاپلوئید بوده و یک کلون از گیاه فسکیوی مرتعی (*Festuca pratensis* Huds.) (ژنوتیپ ۶۰) که دیپلوئید می‌باشد.

پس از کاشت بذرهاي آلوده هر یک از توده‌های ۶۰، ۷۵ و ۸۳ گیاهچه‌های حاصل از نظر تعیین حضور قارچ‌های اندوفایت بررسی شدند، بدین منظور نمونه‌هایی از بافت غلاف برگ از هر بوته تهیه گردید و پس از رنگ آمیزی با رنگ رزبنگال (۱۷) مورد مشاهده میکروسکوپی قرار گرفتند. سپس از هر توده یک بوته که دارای حداکثر تراکم هیف قارچ در بافت

غلاف برگ و نیز نمود عالی گیاهی بود، انتخاب و در کلون سازی استفاده شد، به نحوی که پنجه‌های بوته مورد نظر به دو بخش تقسیم شدند و یک بخش از آن برای حذف قارچ استفاده شد.

به منظور حذف قارچ‌های اندوفایت از گیاهان میزبان از روش شیمیایی با استفاده از تیمار قارچ‌کش‌های سیستمیک فولیکور و پروپیکونازول استفاده شد (۱۵). قارچ کش فولیکور به مقدار یک میلی‌لیتر در لیتر باعث حذف قارچ توده ۶۰ گردید و برای حذف قارچ دو توده دیگر مخلوطی از دو قارچ‌کش فولیکور و پروپیکونازول به ترتیب با مقادیر یک میلی‌لیتر در لیتر و ۲ گرم ماده مؤثره در لیتر مناسب بود. محلول پاشی هفته‌ای دو بار و به مدت دو هفته انجام شد. پس از اطمینان از حذف قارچ، پنجه‌های حاوی اندوفایت و عاری از اندوفایت هر ژنوتیپ در کرت‌های مجزا کشت گردیدند. بعد از گذشت ۳ ماه از استقرار گیاهچه‌ها و تولید پنجه‌های کافی، سه پنجه هم اندازه از کلون‌های هر توده، پس از کشت در گلدان‌های اصلی به گلخانه انتقال یافت تا تولید پنجه و ریشه جدید نمایند.

تیمارهای دمایی شامل ۶، ۲- و ۱۰- درجه سانتی‌گراد بودند که همراه با یک شاهد (۲۰ درجه) مورد مطالعه قرار گرفتند. مدت زمان اعمال هر سطح تیمار سرمایی ۲۰ روز با یک فتوپریود ۱۲ ساعته بود. به منظور جلوگیری از ایجاد شوک سرمایی، گلدان‌ها به تدریج در تیمارهای سرمایی قرار گرفتند. جهت اعمال تیمار سرمایی بالای صفر از یخچال و برای اعمال تیمارهای زیر صفر از یک دستگاه فریزر قابل تنظیم استفاده شد. پس از اعمال تیمارهای دمایی، مقدار نسبی آب برگ و طوقه، میزان تراوش یونی، درصد خسارت غشای سیتوپلاسمی و محتوای اسیدآمینه پرولین اندازه‌گیری گردید. برای اندازه‌گیری مقدار نسبی آب برگ (پس از اعمال تیمارهای سرمایی) در هر تکرار، سه برگ جوان و کامل جدا گردید. وزن تر، وزن اشباع (پس از ۲۴ ساعت در ۲۵ میلی لیتر آب مقطر) و وزن خشک این برگ‌ها (۴۸ ساعت در آون ۷۰ درجه) اندازه‌گیری شد. مقدار نسبی آب برگ با استفاده از روابط موجود به دست آمد.



شکل ۱. میزان جذب نوری مقادیر مشخصی از ال - پرولین (محلول‌های استاندارد) در طول موج ۵۲۰ نانومتر

با تیمار شاهد به میزان ۷۵ درصد و تنش ملایم (۶ درجه) به میزان ۷ درصد این صفت را کاهش دادند (جدول ۱۰).

با عنایت به معنی دار شدن اثر ژنوتیپ \times اندوفایت در کلیه سطوح تنش (جدول‌های ۲، ۳، ۴)، مقایسه میانگین‌ها در تجزیه‌های جداگانه بیانگر برتری ژنوتیپ ۸۳ حاوی اندوفایت ($83E^+$) و پس از آن E^+ ۶۰، در حفظ محتوای آب برگ و در نتیجه مقاومت بیشتر در برابر تنش آب کشیدگی ناشی از سرما بود (جدول‌های ۶، ۷، ۸، ۹).

اثر ژنوتیپ، اندوفایت، دما و آثار ترکیبی آنها در تجزیه مرکب در سطح احتمال ۱ درصد بسیار معنی‌دار بود (جدول ۵). حضور اندوفایت در مجموع منجر به افزایش ۳ درصدی در محتوای نسبی آب برگ، در مقایسه با عدم حضور آن گردید (جدول ۱۰). مارکس وکلای (۱۲)، یکی از علل مقاومت گیاهان آلوده به قارچ را در مقابل تنش آب کشیدگی (و احتمالاً سرما) کاهش از دست دادن آب ذکر نمودند. تنظیم فشار تورژسانس در شرایط محدودیت رطوبت مکانیسم دیگری است که گیاهان آلوده می‌توانند شرایط کمبود رطوبت را بهتر تحمل نمایند.

محفوظی و مجیدی (۱) اعلام نمودند که ارقام مقاوم به تنش سرما بر اثر انجماد، آب بافتی کمتری را از دست می‌دهند. لویت (۹) نیز در این راستا پیشنهاد نمود که افزایش توان گیاه

محتوای نسبی آب طوقه نیز به روشی مشابه اندازه‌گیری گردید. به منظور اندازه‌گیری میزان تراوش یونی، پس از گذشت ۱۰ روز از تیمارهای دمایی، چند بوته به طور تصادفی گزینش شده و برگ‌های رشد یافته و همسن آنها جدا گردید و به قطعات ۱ سانتی‌متری بریده شد. ۵/۰ گرم از این قطعات برگی پس از ۳ مرتبه شستشو با آب مقطر دیونیزه، در لوله آزمایش حاوی ۲۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر قرار داده شد. مقدار هدایت الکتریکی محلول پس از ۴۸ ساعت توسط دستگاه EC سنج دیجیتالی قرائت گردید (در زمان قرائت، نمونه‌ها به وسیله حمام آب گرم به دمای ۲۵ درجه رسانده شدند). پس از انجام مراحل قبل لوله‌های آزمایش محتوی نمونه‌های گیاهی به مدت ۰/۵ ساعت اتوکلاو شدند، آن گاه پس از رسیدن به دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد مجدداً هدایت الکتریکی محلول اندازه‌گیری شد. درصد آسیب وارده به غشا با استفاده از تقسیم کردن میزان هدایت الکتریکی قبل از اتوکلاو به میزان آن بعد از اتوکلاو ضرب در ۱۰۰ محاسبه گردید.

محتوای پرولین ۰/۲۵ گرم برگ در روز چهاردهم هر یک از تیمارهای دمایی به روش بیتز و همکاران (۶) اندازه‌گیری شد. میزان جذب نمونه‌های آماده شده در طول موج ۵۲۰ نانومتر به دست آمد. به منظور تبدیل طول موج‌های خوانده شده به میزان پرولین، محلول‌های استاندارد با مقادیر مشخصی ال-پرولین خالص تهیه شد. این محلول‌ها هم در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت گردیدند. سپس ارتباط بین غلظت پرولین و جذب نور با استفاده از بهترین منحنی درجه دوم تعیین شد و از روی این منحنی، میزان غلظت پرولین بر حسب میکروگرم در گرم وزن تر نمونه به دست آمد (شکل ۱).

نتایج و بحث

مقدار نسبی آب برگ

مقدار نسبی آب در برگ در اثر افزایش شدت تنش کاهش یافت. تیمارهای دمایی مختلف از لحاظ این صفت در گروه‌های آماری متفاوتی قرار گرفتند. تنش شدید (۱۰- درجه) در مقایسه

جدول ۱. تجزیه واریانس مقدار آب نسبی برگ، مقدار آب نسبی طوقه، میزان تراوش یونی، درصد خسارت غشای سیتوپلاسمی و میزان تجمع پرولین، در ژنوتیپ‌های ۶۰، ۷۵، ۸۳ و سطوح حضور و عدم حضور اندوفایت، در تیمار شاهد (Control)

صفات	درجه آزادی	مقدار آب نسبی برگ	مقدار آب نسبی طوقه	میزان تراوش یونی	میزان خسارت غشای سیتوپلاسمی	میزان تجمع پرولین
ژنوتیپ	۲	۱/۳۹	۱۳/۵۶**	۱۳۱۰/۶۶۷**	۲۹۴۷/۷۲**	۵۶۷/۶**
اندوفایت	۱	۰/۵۰	۲۹/۳۹**	۴۹۷۱۷/۵۵**	۲۰۴۸**	۴۹/۳۴**
ژنوتیپ × اندوفایت	۲	۱/۵۰	۱۱/۵۵**	۲۸۶۷۲/۸۹**	۸۰۱/۵۰**	۴۶/۹۰**
خطا	۱۲	۰/۸۳	۱/۳۳	۵۴۹/۲۸	۳۴/۴۴	۱/۵۸
درصد ضریب تغییرات		۰/۹۶	۱/۳۴	۸/۹۰	۱۳/۰۷	۱۸/۵۰

* و **: به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

جدول ۲. تجزیه واریانس مقدار آب نسبی برگ، مقدار آب نسبی طوقه، میزان تراوش یونی، درصد خسارت غشای سیتوپلاسمی و میزان تجمع پرولین، در ژنوتیپ‌های ۶۰، ۷۵، ۸۳ و سطوح حضور و عدم حضور اندوفایت، در تیمار ۶ درجه سانتی گراد (T_۱)

صفات	درجه آزادی	مقدار آب نسبی برگ	مقدار آب نسبی طوقه	میزان تراوش یونی	میزان خسارت غشای سیتوپلاسمی	میزان تجمع پرولین
ژنوتیپ	۲	۴۳/۵۶	۳۶/۲۲	۱۶۵۷۶/۰۶**	۳۰۷۶/۱۷**	۳۱۵/۰۴**
اندوفایت	۱	۲۴۲**	۰/۰۱	۱۹۴۰۴/۵۰**	۷۶۰/۵۰**	۶۲۷/۷۶**
ژنوتیپ × اندوفایت	۲	۹۲/۶۷*	۹۶	۶۱۷۶/۱۷*	۲۷۱/۱۷*	۵۳/۴۶**
خطا	۱۲	۱۸/۰۶	۳۰/۶۱	۱۱۵۹/۵۰	۵۴/۹۴	۷/۷۰
درصد ضریب تغییرات		۴/۸۲	۶/۶۷	۹/۰۳	۱۱/۴۹	۱۵/۳۳

* و **: به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

جدول ۳. تجزیه واریانس مقدار آب نسبی برگ، مقدار آب نسبی طوقه، میزان تراوش یونی، درصد خسارت غشای سیتوپلاسمی و میزان تجمع پروتئین، در ژنوتیپ‌های ۶۰، ۷۵، ۸۳ و سطوح حضور و عدم حضور اندوفایت، در تیمار ۲- درجه سانتی گراد (T₂)

صفات	درجه آزادی	مقدار آب نسبی برگ	مقدار آب نسبی طوقه	میزان تراوش یونی	میزان خسارت غشای سیتوپلاسمی	میزان تجمع پروتئین
ژنوتیپ	۲	۱۰۵/۳۹ **	۱۰۶/۱۷ **	۳۵۷۰/۳۵۰ **	۶۰۷/۳۹ **	۳۷۰/۴۷ **
اندوفایت	۱	۰/۸۹	۱۶۸/۰۶ **	۶۷۵۳/۸۷۲ **	۳۰۴/۲۲ **	۱۵۶/۲۹ **
ژنوتیپ × اندوفایت	۲	۱۵۰/۸۲ **	۳۳۱/۸۲ **	۱۶۸۷۲	۴۹/۳۹ **	۳۶/۴۸ **
خطا	۱۲	۵/۳۳	۹/۳۹	۵۲۹/۴۴	۶/۸۸	۱/۵۴
درصد ضریب تغییرات		۶/۹۵	۵/۳۰	۲/۸۶	۳/۰۵	۹/۳۳

* و **: به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

جدول ۴. تجزیه واریانس مقدار آب نسبی برگ، مقدار آب نسبی طوقه، میزان تراوش یونی، درصد خسارت غشای سیتوپلاسمی و میزان تجمع پروتئین، در ژنوتیپ‌های ۶۰، ۷۵، ۸۳ و سطوح حضور و عدم حضور اندوفایت، در تیمار ۱۰- درجه سانتی گراد (T₃).

صفات	درجه آزادی	مقدار آب نسبی برگ	مقدار آب نسبی طوقه	میزان تراوش یونی	میزان خسارت غشای سیتوپلاسمی	میزان تجمع پروتئین
ژنوتیپ	۲	۴۰/۰۶ **	۳۴۳/۳۹ **	۵۲۳۸/۵۰ **	۴۵۹/۰۶ **	۴۱/۸۸ **
اندوفایت	۱	۰/۸۹	۱۱۲/۵۰ *	۷۰۳۱۲/۵۰ **	۴۳۰/۲۲ **	۲۴۶/۴۲ **
ژنوتیپ × اندوفایت	۲	۸۳/۳۹ **	۱۰۹/۵۰ **	۵۰۵۵/۱۷	۹۹/۳۹ **	۴۳/۰۶ **
خطا	۱۲	۵/۰۶	۱۲/۲۲	۲۱۲۳/۳۹	۳/۶۷	۵/۷۱
درصد ضریب تغییرات		۹/۵۵	۶/۹۸	۶/۰۳	۲/۱۸	۱۶/۵۹

* و **: به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

جدول ۵. تجزیه واریانس مقدار آب نسبی برگ، مقدار آب نسبی طوقه، میزان تراوش یونی، درصد خسارت غشای سیتوپلاسمی و میزان تجمع پروتئین، در ژنوتیپ‌های ۶۰، ۷۵، ۸۳ و سطوح حضور و عدم حضور اندوفایت، در تجزیه مرکب

متغیرها	صفات					
	میزان تجمع پروتئین	میزان خسارت غشای سیتوپلاسمی	میزان تراوش یونی	میزان خسارت طوقه	مقدار آب نسبی برگ	مقدار آب نسبی طوقه
دما	۵۲/۹۴**	۱۲۲۷/۵۵**	۲۲۹۵۲۴/۴۱**	۸۹۴/۲۴**	۳۵۶۵/۸۸**	۳
تکرار (دما)	۰/۳۰	۹۳/۸۸**	۳۳۸۶/۵۰**	۱۲/۹۰	۴/۶۳	۴
ژنوتیپ	۲۵۳/۵۳**	۶۰۶۵/۱۰**	۱۵۳۸۸۶/۵۱**	۲۹۲/۳۵**	۵۱/۵۱**	۲
اندوفایت	۹۰۵/۹۶**	۳۰۸۱/۱۳**	۱۷۸۷۰۲/۳۵**	۸۲/۳۵*	۷۰/۰۱**	۱
ژنوتیپ × اندوفایت	۲۹/۴۷**	۵۶۲/۶۳**	۳۷۷۵/۹۳*	۳۵۵/۰۱**	۲۰۵/۴۳**	۲
دما × ژنوتیپ	۱۷۶/۸۷**	۳۴۱/۷۵**	۷۶۹۱۰/۸۴**	۱۰۸/۹۹**	۴۶/۲۹**	۶
دما × اندوفایت	۵۷/۲۸**	۱۵۳/۹۴**	۲۷۵۵/۶۴*	۷۵/۸۷**	۵۸/۰۹**	۳
دما × ژنوتیپ × اندوفایت	۴۶/۸۱**	۲۱۹/۶۱**	۱۲۰۴۸/۳۴**	۶۴/۵۹**	۴۰/۹۵**	۶
خطا	۴/۴۸	۱۸/۶۹	۸۸۱/۶۷	۱۳/۴۳	۷/۵۶	۴۴
درصد ضریب تغییرات	۱۶/۱۰	۶/۱۲	۵/۳۱	۵/۲۹	۴/۵۸	

* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

در ممانعت از اتلاف آب در مراحل اولیه سرمازدگی در ایجاد مقاومت به سرما اهمیت دارد.

محتوای نسبی آب طوقه

بافت‌های طوقه که در حدود ۶۵-۵۵ درصد رطوبت دارند، قادرند سرمای تا ۲۰- درجه سانتی‌گراد را تحمل نمایند. در رطوبت بالاتر یا پایین‌تر، طوقه، بسیار حساس به صدمه یخ‌زدگی بوده و ممکن است در ۱۰- درجه سانتی‌گراد از بین برود (۲).

در پژوهش حاضر با افزایش شدت تنش درصد محتوای نسبی آب طوقه کاهش پیدا کرد (جدول ۱۰). با توجه به نتایج جدول‌های ۸ و ۹، در دماهای ۲- و ۱۰- درجه سانتی‌گراد، حضور اندوفایت به طور جزئی این صفت را افزایش داد. در حالی که این افزایش اندک محتوای آب طوقه در نتیجه حضور اندوفایت با افزایش بیشتر وزن خشک این اندام نیز همراه بود. محتوای بیشتر آب طوقه، خسارت ناشی از دماهای انجماد را افزایش می‌دهد (۱۳). اما طوقه‌هایی که موادی از قبیل کربوهیدرات‌ها را بیشتر در درون خود تجمع دهند دیرتر دچار انجماد می‌شوند (۱۳). بنابراین با توجه به تجمع بیشتر کربوهیدرات‌ها و افزایش وزن خشک طوقه در اثر حضور اندوفایت (۸)، به این ترتیب احتمالاً، اثرات منفی ناشی از افزایش محتوای آب طوقه به نوعی تعدیل می‌گردد.

میزان تراوش یونی (پایداری غشای سیتوپلاسمی)

تغییراتی که در ساختار غشای سلول در اثر تغییر فاز چربی‌ها و تغییرات دیگر ایجاد می‌شود، سبب افزایش نفوذپذیری غشا نسبت به یون‌ها و ماکرومولکول‌ها می‌گردد. با افزایش شدت تنش، محتویات بیشتری از سلول‌ها در اثر تخریب غشا به بیرون تراوش نمود (جدول ۱۰). نتایج به دست آمده در تجزیه‌های جداگانه (جدول‌های ۶، ۷، ۸ و ۹) و نیز تجزیه مرکب (جدول ۱۰) نشان داد که اندوفایت‌ها در حفظ پایداری غشاهای سلولی و در نتیجه

کاهش هدایت الکتریکی محلول در کلیه سطوح دمایی تأثیر گذار بوده‌اند. به طور کلی قارچ‌های اندوفایت تراوش یونی را به میزان ۲۰ درصد کاهش دادند (جدول ۱۰). احتمالاً، اندوفایت‌ها با تجمع دادن قند تری هالوز در سلول، پایداری بیشتر غشا را سبب می‌شوند.

در میان ژنوتیپ‌های مورد بررسی، ژنوتیپ‌های ۷۵ و ۸۳ حاوی اندوفایت به میزان بیشتری ساختار طبیعی غشای سلول‌های خود را تحت تنش سرمایی حفظ کرده و از میزان نشت الکترولیتی کمتری برخوردار بودند (جدول‌های ۶، ۷، ۸ و ۹).

درصد خسارت غشای سیتوپلاسمی

به دنبال نتایج به دست آمده در مورد میزان تراوش یونی، بر آورد درصد خسارت غشا، نشان داد که با کاهش دما، از تیمار شاهد تا تیمار ۲- درجه غشا به شدت آسیب دید، اما بین دماهای ۲- و ۱۰- درجه تفاوت چندانی وجود نداشت (جدول ۱۰). در تجزیه‌های جداگانه و نیز تجزیه مرکب، کلیه منابع تغییر در سطح احتمال ۱ درصد بسیار معنی‌دار شدند (جدول‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵).

حضور اندوفایت‌ها در کلیه سطوح دمایی در کاهش درصد خسارت غشا مؤثر بوده و در مقایسه با عدم حضور اندوفایت در مجموع به میزان ۲۰ درصد، از بروز خسارت در غشا جلوگیری گردید (جدول‌های ۶، ۷، ۸، ۹ و ۱۰). ژنوتیپ $83E^+$ و پس از آن ژنوتیپ $75E^+$ ، که از میزان تراوش یونی کمتری نیز برخوردار بودند، کمترین میزان خسارت غشا را دارا بودند (جدول ۱۰).

میزان اسید آمینه پرولین

با عنایت به معنی‌دار شدن اثر دما در تجزیه مرکب (جدول ۵)، اختلافات معنی‌داری بین سطوح دمایی مورد مطالعه از لحاظ آماری دیده شد. بیشترین تجمع پرولین در تیمار ۶ درجه و کمترین میزان آن در تیمار شاهد مشاهده گردید. نتایج به دست

جدول ۱. میانگین ژنوتیپ‌های مختلف، سطح اندوفایت و ترکیب این عوامل برای صفات مقدار آب نسبی برگ، مقدار آب نسبی طوقه، میزان تراوش یونی، درصد خسارت غشای سیتوپلاسمی و میزان تجمع پروتئین، در تیمار شاهد (Control)

تیمارها	صفات	مقدار آب نسبی برگ (درصد)	مقدار آب نسبی طوقه (درصد)	میزان تراوش یونی (میکروموس بر گرم)	میزان خسارت غشای سیتوپلاسمی (درصد)	میزان تجمع پروتئین (میکرومول بر گرم)
ژنوتیپ ۶۰		۹۵ ^a	۸۱ ^b	۴۳۰ ^a	۷۰ ^a	۶/۰۵ ^b
ژنوتیپ ۷۵		۹۶ ^a	۸۹ ^a	۲۱۲ ^b	۳۹ ^b	۴/۱۵ ^c
ژنوتیپ ۸۳		۹۶ ^a	۸۹ ^a	۱۴۸ ^c	۲۷ ^c	۱۰/۱۷ ^a
LSD (%)		۱/۱۴۸	۱/۴۵۳	۲۹/۴۸۲	۷/۳۸۳	۱/۵۸۰
حاوی اندوفایت (E ⁺)		۹۵ ^a	۸۵ ^b	۲۱۱ ^b	۳۴ ^b	۸/۴۴ ^a
بدون اندوفایت (E ⁻)		۹۶ ^a	۸۸ ^a	۳۱۶ ^a	۵۶ ^a	۵/۱۳ ^b
LSD (%)		۰/۹۳۸	۱/۱۸۶	۲۴/۰۷۲	۶/۰۲۸	۱/۲۹۰
۶۰ E ⁺		۹۵ ^a	۸۰ ^d	۴۲۰ ^a	۶۵ ^{ab}	۵/۵ ^{bc}
۶۰ E ⁻		۹۵ ^a	۸۲ ^d	۴۴۰ ^a	۷۴ ^a	۶/۶ ^b
۷۵ E ⁺		۹۵ ^a	۸۹ ^b	۷۹ ^d	۱۵ ^d	۴/۸۷ ^{bc}
۷۵ E ⁻		۹۶ ^a	۸۹ ^b	۳۴۴ ^b	۶۳ ^b	۳/۴۳ ^c
۸۳ E ⁺		۹۶ ^a	۸۶ ^c	۱۳۳ ^c	۲۳ ^{cd}	۱۴/۹۷ ^a
۸۳ E ⁻		۹۵ ^a	۹۲ ^a	۱۶۳ ^c	۳۰ ^c	۵/۳۷ ^{bc}

میانگین‌های دارای حروف غیر مشترک اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد دارند.

جدول ۷. میانگین ژنوتیپ‌های مختلف، سطح اندوفایت و ترکیب این عوامل برای صفات مقدار آب نسبی برگ، مقدار آب نسبی طوقه، میزان تراوش یونی، درصد خسارت غشای سیتوپلاسمی و میزان تجمع پروتئین، در تیمار ۶ درجه سانتی‌گراد (T₁)

تیمارها	صفات	مقدار آب نسبی برگ (درصد)	مقدار آب نسبی طوقه (درصد)	میزان تراوش یونی (میکروموس بر گرم)	میزان خسارت غشای سیتوپلاسمی (درصد)	میزان تجمع پروتئین (میکرومول بر گرم)
ژنوتیپ ۶۰		۸۵ ^a	۸۶ ^a	۵۵۸ ^a	۸۹ ^a	۱۱/۰ ^c
ژنوتیپ ۷۵		۹۱ ^a	۸۱ ^a	۳۴۲ ^b	۵۹ ^b	۱۷/۸ ^b
ژنوتیپ ۸۳		۸۹ ^a	۸۲ ^a	۲۳۱ ^c	۴۵ ^c	۲۵/۵ ^a
LSD (/۵)		۵/۳۴۵	۶/۹۲۰	۴۲/۸۳۵	۹/۳۲۴	۳/۴۹۰
حاوی اندوفایت (E ⁺)		۹۲ ^a	۸۳ ^a	۳۴۴ ^b	۵۸ ^b	۲۴/۰ ^a
بدون اندوفایت (E ⁻)		b۸۵	۸۳ ^a	۴۱۰ ^a	۷۱ ^a	۱۲/۱۹ ^b
LSD (/۵)		۴/۳۶۴	۵/۶۸۳	۳۴/۹۷۴	۷/۶۱۳	۲/۸۴۹
۶۰ E ⁺		۹۲ ^a	۹۰ ^a	۵۵۷ ^a	۹۰ ^a	۱۳/۸۷ ^c
۶۰ E ⁻		۷۸ ^c	۸۲ ^{ab}	۵۵۹ ^a	۸۹ ^a	۸/۱۳ ^d
۷۵ E ⁺		۹۰ ^{ab}	۷۷ ^b	۳۰۹ ^c	۵۲ ^c	۲۶/۶۳ ^a
۷۵ E ⁻		۹۱ ^{ab}	۸۵ ^{ab}	۳۷۵ ^b	۶۷ ^b	۸/۹۷ ^{cd}
۸۳ E ⁺		۹۳ ^a	۸۲ ^{ab}	۱۶۶ ^d	۳۲ ^d	۳۱/۵۰ ^a
۸۳ E ⁻		۸۴ ^{bc}	۸۲ ^{ab}	۲۹۶ ^c	۵۸ ^{bc}	۱۹/۴۷ ^b

میانگین‌های دارای حروف غیر مشترک اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد دارند.

جدول ۸. میانگین ژنوتیپ‌های مختلف، سطوح اندوفایت و ترکیب این عوامل برای صفات مقدار آب نسبی برگ، مقدار آب نسبی طوقه، میزان تراوش یونی، درصد خسارت غشای سیتوپلاسمی و میزان تجمع پرولین، در تیمار ۲- درجه سانتی‌گراد (T₂).

تیمارها	صفات	مقدار آب نسبی برگ (درصد)	مقدار آب نسبی طوقه (درصد)	میزان تراوش یونی (میکروموس بر گرم)	میزان خسارت غشای سیتوپلاسمی (درصد)	میزان تجمع پرولین (میکرومول بر گرم)
ژنوتیپ ۶۰		۳۵ ^a	۵۳ ^b	۹۰۱ ^a	۹۷ ^a	۲۰/۵۸ ^a
ژنوتیپ ۷۵		۲۹ ^b	۶۱ ^a	۷۵۰ ^c	۸۲ ^b	۴/۹۷ ^c
ژنوتیپ ۸۳		۳۷ ^a	۵۹ ^a	۸۵۱ ^b	۷۷ ^c	۱۴/۳۰ ^b
	LSD (/۵)	۲/۹۰۵	۳/۸۵۵	۲۸/۹۴۵	۳/۲۷۵	۱/۵۵۹
حاوی اندوفایت (E ⁺)		۳۴ ^a	۶۱ ^a	۷۸۲ ^b	۸۱ ^b	۱۶/۲۱ ^a
بدون اندوفایت (E ⁻)		۳۳ ^a	۵۵ ^b	۸۸۵ ^a	۸۹ ^a	۱۰/۳۶ ^b
	LSD (/۵)	۲/۳۷۲	۳/۱۴۷	۲۳/۶۳۳	۲/۶۷۴	۱/۲۷۳
		۳۷ ^{ab}	۶۳ ^a	۸۵۲ ^c	۹۶ ^a	۲۵/۴۷ ^a
	۶۰ E ⁻	۳۲ ^c	۴۳ ^c	۹۵۱ ^a	۹۷ ^a	۱۵/۹۰ ^b
	۷۵ E ⁺	۲۳ ^d	۵۷ ^b	۶۹۷ ^e	۷۷ ^c	۵/۵۷ ^d
	۷۵ E ⁻	۳۴ ^{bc}	۶۶ ^a	۸۰۲ ^d	۸۷ ^b	۴/۳۷ ^d
	۸۳ E ⁺	۴۰ ^a	۶۳ ^a	۷۹۸ ^d	۷۱ ^d	۱۷/۸۰ ^b
	۸۳ E ⁻	۳۳ ^{bc}	۵۵ ^b	۹۰۳ ^b	۸۳ ^b	۱۰/۸۰ ^c

میانگین‌های دارای حروف غیر مشترک اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد دارند.

جدول ۱۰. میانگین ژنوتیپ‌های مختلف، سطوح اندوفایت، سطوح اندوفایت برای ترکیب ژنوتیپ × اندوفایت برای صفات مقدار آب نسبی برگ، مقدار آب نسبی طوقه، میزان تراوش یونی، درصد خسارت غشای سیتوپلاسمی و میزان تجمع پروتئین، در تجزیه مرکب.

تیمارها	صفات	مقدار آب نسبی برگ (درصد)	مقدار آب نسبی طوقه (درصد)	میزان تراوش یونی (میکروموس بر گرم)	میزان خسارت غشای سیتوپلاسمی (درصد)	میزان تجمع پروتئین (میکرومول بر گرم)
ژنوتیپ ۶۰		۶۰ ^b	۶۵ ^b	۶۵۱ ^a	۸۸ ^a	۱۳/۶۶ ^b
ژنوتیپ ۷۵		۵۹ ^b	۷۲ ^a	۵۰۲ ^c	۶۷ ^b	۹/۶۶ ^c
ژنوتیپ ۸۳		۶۲ ^a	۷۱ ^a	۵۲۶ ^b	۵۷ ^c	۱۶/۱۰ ^a
LSD (/۵)		۱/۶۰۰	۲/۱۳۲	۱۷/۲۷۵	۲/۵۲	۱/۳۳۱
حاوی اندوفایت (E ⁺)		۶۱ ^a	۷۰ ^a	۵۱۰ ^b	۶۴ ^b	۱۶/۶۹ ^a
بدون اندوفایت (E ⁻)		۵۹ ^b	۶۸ ^b	۶۱۰ ^a	۷۷ ^a	۹/۵۹ ^b
LSD (/۵)		۱/۳۰۷	۱/۷۴۱	۱۴/۱۱	۲/۰۵	۱/۰۰۵
شاهد (Control)		۹۵ ^a	۸۶ ^a	۲۶۳ ^d	۴۵ ^c	۶/۸۹ ^d
(T ₁) ۱°C		۸۸ ^b	۸۳ ^b	۳۷۷ ^c	۶۵ ^b	۱۸/۰۹ ^a
(T ₂) -۲°C		۳۳ ^c	۵۸ ^c	۸۳۴ ^a	۸۵ ^a	۱۳/۲۸ ^c
(T ₃) -۱۰°C		۲۴ ^d	۵۰ ^d	۷۶۵ ^b	۸۸ ^a	۱۴/۴۰ ^b
LSD (/۵)		۱/۹۹	۳/۳۲	۵۳/۸۵۷	۸/۹۶۷	۰/۵۰۸
۶۰ E ⁺		۶۲ ^b	۷۰ ^b	۶۱۴ ^b	۸۷ ^a	۱۶/۸۰ ^b
۶۰ E ⁻		۵۸ ^c	۶۰ ^c	۶۸۸ ^a	۸۹ ^a	۱۰/۵۲ ^d
۷۵ E ⁺		۵۷ ^c	۶۹ ^b	۴۴۰ ^e	۵۶ ^d	۱۲/۳۶ ^c
۷۵ E ⁻		۶۱ ^b	۷۴ ^a	۴۶۵ ^d	۷۷ ^b	۶/۹۷ ^e
۸۳ E ⁺		۶۵ ^a	۷۲ ^{ab}	۴۷۶ ^d	۵۰ ^e	۲۰/۹۰ ^a
۸۳ E ⁻		۵۸ ^c	۷۰ ^b	۵۷۶ ^c	۶۵ ^c	۱۱/۳۰ ^{cd}

میانگین‌های دارای حروف غیر مشترک اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد دارند.

مالینووسکی و بلسکی (۱۱) اعلام نمودند که ترکیبات تولید شده در گیاهان حاوی قارچ‌های اندوفایت شامل محلول قندها، متابولیت‌های قارچی مانیتول و آرابیتول، اسید آمینه پرولین، سایر اسیدهای آمینه و برخی آلكالوئیدها در فعالیت‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه شرکت کرده و باعث افزایش مقاومت گیاه در شرایط نامساعد محیطی (مانند سرما) می‌شوند.

در بررسی بین ژنوتیپ‌ها، در مجموع ژنوتیپ ۸۳ حاوی قارچ اندوفایت از میزان پرولین بیشتری برخوردار بود و پس از آن ژنوتیپ‌های ۶۰ و ۷۵ حاوی اندوفایت در مراتب بعدی قرار گرفتند (جدول ۱۰).

آمده از تجزیه واریانس نشان داد که اثرات ژنوتیپ، اندوفایت، ژنوتیپ × اندوفایت و ترکیب هر کدام از آنها با دما بسیار معنی‌دار بود (جدول‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵). حضور اندوفایت در مقایسه با فقدان آن در مجموع منجر به افزایش ۷۴ درصدی در میزان پرولین برگ گردید (جدول ۱۰). این افزایش بیشتر تحت تأثیر نقش اندوفایت بر تجمع پرولین در تیمار ۶ درجه حاصل شد (جدول ۷). احتمالاً در این دما گیاهان به سرما خوگرفتگی پیدا می‌کنند و با افزایش میزان پرولین در سلول‌ها برای ورود به دماهای پایین تر احتمالی و تحمل بیشتر آن شرایط آماده می‌شوند، این قضیه در حضور اندوفایت تشدید شد.

منابع مورد استفاده

۱. محفوظی، س. و الف. مجیدی. ۱۳۷۳. روش ارزیابی منابع مقاومت به سرما در ارقام گندم. مجموعه مقالات سومین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران، دانشگاه تبریز، صفحه ۳۶۲.
۲. میرمحمدی میبدی، ع. م. ۱۳۷۹. جنبه‌های فیزیولوژی و به‌نژادی تنش‌های سرما و یخ زدگی گیاهان زراعی. انتشارات گلبن، اصفهان.
3. Arachevaleta, M., C. W. Bacon, C. S. Hoveland and D. E. Radcliffe. 1989. Effect of the tall fescue endophyte on plant response to environmental stress. *Agron. J.* 81: 83-90.
4. Bacon, C.W., J.K. Poter, J.D. Robbins and E.S. Luttrell. 1997. *Epichloe typhina* from toxic fescue grass. *Appl. Environ. Microbiol.* 34: 576-581.
5. Ball, O.J.P., E.C. Bernard and K.D. Gwinn. 1997. Effect of selected *Neotyphodium lolii* isolates on root knot nematode (*Meloidogyne marylandi*) numbers in perennial ryegrass. *Proceeding of 5th New Zealand plant protection Society conference.* Palmerston North, NZ. PP. 65-68.
6. Bates, J.S., R.P. Waldern and I.D. Teare. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207.
7. Crowe, J.H., L.M. Crowe, J.F. Carpenter and C. Aurellwistrom. 1987. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochem. J.* 242: 1-10.
8. Latch, G.C.M. 1998. Grass endophytes as a model. *Entophytic in plant pathology, The International Congress of Plant Pathology, Edinburgh, Scotland.*
9. Levitt, j. 1982. *Freezing Stress Response of Plant to Environmental Stress.* Academic press. Inc., USA.
10. Liu, H.B., J.R. Heckman and J.A. Murphy. 1996. Screening fine fescue for aluminum tolerance. *J. Plant Nutr.* 19: 677-688.
11. Malinowski, D.P. and D.P. Belesky. 2000. Adaptations of endophyte infect-cool season grasses to environmental stresses: Mechanism of drought and mineral stress tolerance. *Crop Sci.* 40: 923-940.
12. Marks, S. and K. Clay. 1996. Physiological responses of *Festuca arundinaceae* to fungal endophyte infection. *New Phytopathol.* 133: 727-733.
13. Metcalf, E.L., C.E. Cress, C.R. Olein and E.H. Everson. Relationship between crown moisture content and killing temperature or three wheat and three barley cultivars. *Crop Sci.* 10: 362-365.
14. Richardson, M.D. and C.W. Bacon. 1994. Stress tolerance of endophyte-infected turf grasses. PP. 515 –523. *In: C.W. Bacon and J.F. White (Eds.), Biotechnology of Endophytic Fungi of Grasses.* CRC Press, Boca Raton, Florida.
15. Saha, D.C., M.A. Jachson and J.M. Johnson-Cicalese. 1988. A rapid staining method for detection of endophytic

- fungi in turf and forage grasses. *Phytophatol.* 78: 237-239.
16. Secks, M.E., M.D. Richardson, C.P. West, M.L. Marlatt and J.B. Murphy. 1999. Role of trehalose in desiccation tolerance of endophyte-infected tall fescue. *Res. Series, Hort. Studies* 475: 134-140.
17. Shelby, R.A. and L.W. Dalrymple. 1987. Incidence and distribution of the tall fescue endophyte in the United States. *Plant Dis.* 71: 738-786.