

## Diagnostyka<sup>1</sup> Diagnostic

### *Cryphonectria parasitica*

#### Zakres stosowania

Niniejszy standard opisuje protokół diagnostyczny dla *Cryphonectria parasitica*.

#### Zatwierdzenia i nowelizacje

Zatwierdzony, we wrześniu 2004 roku.

#### Wprowadzenie

*Cryphonectria parasitica* jest grzybem zasiedlającym korę i powodującym zgorzel kasztana (*Castanea* spp.) oraz innych wrażliwych rodzajów i gatunków drzew (głównie *Quercus* spp.). W końcu XIX wieku choroba rozprzestrzeniła się z Dalekiego Wschodu (prawdopodobnie z Chin lub Japonii) do Ameryki Północnej, a pod koniec 1930 roku do Europy. Występuje zróżnicowanie w podatności na chorobę pomiędzy trzema gatunkami gospodarzy. Najbardziej podatnym gatunkiem jest kasztan amerykański (*Castanea dentata*) i kasztan europejski (*Castanea sativa*). U tych gatunków wirulentna forma patogena rozwija się szybko powodując nekrozy kory i zamieranie dystalnych części drzewa (Heiniger & Rigling, 1994). Hypowirulencja spowodowana jest infekcją grzyba przez wirusa o dwuniciowym RNA tj. *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV 1) i umożliwia ona odrost drzew kasztana i jego drzewostanów w wielu regionach Europy. Wirulentne i hypowirulentne szczepy grzyba powodują powstawanie różnych typów raka i w niektórych przypadkach mogą one utrudniać wykrywanie i identyfikację patogena. U gospodarzy bardziej tolerancyjnych (w Europie, głównie *Quercus petraea* i mniej często *Quercus robur*, *Quercus ilex* i inne dęby) lub w jego hypowirulentnej formie zgorzel kasztana wygląda jak wieloletnie, wyleczone raki lub powierzchniowe infekcje kory, które rzadko powodują zamieranie gałęzi, pnia, siewek lub całych drzew. Dalsze informacje na temat biologii i rozprzestrzenienia grzyba można znaleźć w publikacjach EPPO/CABI (1997), Fulbright (1999), Heiniger & Rigling (1994) oraz Roane i wsp.(1986).

#### Tożsamość

**Nazwa:** *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M.E. Barr

**Synonimy:** *Endothia parasitica* (Murrill) P.J. Anderson & H.W. Anderson

**Anamorfa:** *Endothiella parasitica* Roane

**Stanowisko taksonomiczne:** Fungi: Ascomycota: Diaporthales: Valsaceae

**Komputerowy kod EPPO:** ENDOPA

**Kategoria fitosanitarna:** lista EPPO A2: nr 69, załącznik UE II/A2

<sup>1</sup>Zdjęcia w niniejszym Standardzie oznaczone „fot web” opublikowano na stronie EPPO [www.eppo.org](http://www.eppo.org)

## Wykrywanie

Rośliny żywicielskie mogą przenosić grzyba w korze lub drewnie.

## Objawy powodowane przez szczepy wirulentne

Choroba w jej typowej, wirulentnej formie jest łatwa do rozpoznania, ponieważ zawsze towarzyszy jej rozległa nekroza kory.

U *C. sativa* uprawianych na owoce (sadzonych, młodych i ostatnio szczepionych drzewach) objawy na korze (nekrozy) są zróżnicowane, a ich zabarwienie w porównaniu do naturalnego, oliwkowego koloru nieporażonej kory jest od jasnobrązowego poprzez żółtobrązowy lub pomarańczowy do czerwobrązowego. Na szczepionych drzewach infekcje są najczęściej znajdowane w miejscach szczepienia, gdzie tworzy się kallus. W sadach lub zagajnikach, infekcje są często umiejscowione u podstawy pnia (pierścienie lub w miejscu szczepienia). Kambium pod zainfekowaną korą jest martwe, a kora może być zapadnięta lub nabrzmiąta. Pęknięcia mogą również tworzyć się na porażonej powierzchni kory. Pod korą są zwykle obecne charakterystyczne płowozółte, spłaszczone wachlarze grzybni. W pewnej odległości od zaawansowanej części nekrozy rozwijają się liczne, żółte do żółto-pomarańczowych stromy, każda zawierająca jedną, rzadziej więcej konidiomatę (komorowe piknidia). W warunkach wilgotnych, mogą z nich wydobywać się pokręcone, żółto zabarwione wąsy, zawierające lepkie konidia. Wąsy mogą być dłuższe niż 1 cm, a ich tworzenie można sztucznie indukować przez inkubację zainfekowanej kory w komorach wilgotnych. Stroma jest na wpół zagłębiona w korze. Po obfitej produkcji konidiów, w tym samym miejsce tworzy się askostroma. Stara stroma ma zabarwienie ceglano-czerwone do czerwono-brązowego i może zawierać liczne, butelkowatego kształtu perytecja z długimi szyjkami, głęboko osadzone w stromie. Ostiole (ujścia) perytecjów można obserwować za pomocą ręcznego szkła powiększającego i wyglądają one, jak czarne kropki na brodawkowatych wypukłościach powierzchni stromy. Stare infekcje charakteryzują się podłużnymi pęknięciami i martwą korą oraz widocznym pod nią drewnem. Na odkrytym drewnie są często widoczne pozostałości suchych, jasnobrązowych mat grzybni.

Sadzonki i młode drzewa *Quercus* spp. rzadko ulegają infekcji. Objawy są miejscowe i zawierają wolno rozwijające się raki, które ostatecznie mogą powodować zamieranie pojedynczych gałęzi. Plantacje produkcyjne *C. sativa* i *Quercus* spp. wykazują objawy, jak opisano wyżej. Na plantacjach często obserwuje się pozostałości pędów przybyszowych, które często rozwijają się zaraz poniżej infekcji i tworzą pierścień wokół drzewa. Porażone części plantacji są często hipertroficzne. W kłodach, w starszej, grubej i popękanej korze mogą nie występować objawy jej przebarwienia. Wachlarze grzybni znajduje się w wewnętrznych i/lub zewnętrznych warstwach luźnej/popękanej kory i/lub warstwy kambium. Niektóre roczne przyrosty bieli podkorowej mogą również ulegać infekcji, chociaż nie tworzą się tam wachlarze grzybni. Na popękanej korze tworzy się stroma z konidiomatą i askomatą.

Okorowane drewno *C. sativa* może być schronieniem dla grzybni (jako pozostałość), i występuje w warstwie kambium i w bielu. Jasnobrązowe, zwykle suche, martwe wachlarze grzybni mogą być widoczne na powierzchni drewna. Stroma lub obnażona konidiomata mogą rozwijać się na bielu podkorowym, najczęściej są powszechne w miejscach cięcia. Fragmenty kory i wiórów drewna mogą zawierać grzybnię i stromę.

## **Objawy powodowane przez szczepy hypowirulentne lub szczepy wirulentne na odpornych roślinach gospodarzach**

Hypowirulencja u *C. parasitica* jest zdefiniowana, jako niezdolność grzyba do powodowania choroby takiej, jak w przypadku form wirulentnych. Patogeniczność grzyba jest ograniczona, a infekcja kory ma mniej typowe objawy chorobowe. Hypowirulencja jest podstawą naturalnego zwalczania choroby.

Pnie młodych drzew *C. sativa* zainfekowane przez szczep hypowirulentny mogą wykazywać wczesne objawy choroby podobne do tych, powodowanych przez formy wirulentne. Starsze infekcje są ograniczone do powierzchniowych warstw kory i wykazują produkcję kallusa. Młode rośliny lub ich części mogą zamierać. Sadzonki, młode lub szczepione drzewa *C. sativa* są rzadko infekowane, a szczepy hypowirulentne rzadko powodują zgorzel gałęzi. Infekcje są miejscowe i posiadają typowy, rakowaty wygląd.

Plantacje towarowe *C. sativa* i *Quercus* spp. są najprawdopodobniej drogą rozprzestrzeniania hypowirulentnego szczepu *C. parasitica* na duże odległości. Istnieją dwa odmienne typy infekcji: zdrowiejące raki i wyleczone raki. Zdrowiejące raki w ich początkowym stadium są powierzchniowe i charakteryzują się czerwono-pomarańczową powierzchnią z większymi lub mniejszymi wyraźnymi zgrubieniami. Porażona część pnia jest lekko nabrzmiąta. Później kora dzieli się na drobne, nieregularnej wielkości łuski, które pochodzą ze spękań kory. Ta część pnia wyraźnie różni się od gładkiej, nieporażonej przylegającej kory. Pod porażoną korą jest żywe kambium. Może występować rozległe zamieranie skolonizowanych tkanek i po usunięciu kory można obserwować czerwono-brązowe lub czarne zabarwienie drewna. Obszary te, mogą być niewielkie, owalne w kształcie i średnicy tylko kilku centymetrów; alternatywnie cały obwód pnia może być poważnie porażony.

W pęknięciach kory rzadko tworzy się stroma: zwykle formuje się konidiomata; prawie nigdy nie tworzą się askomaty. Wachlarze grzybni nie są łatwe do znalezienia i są mniejsze, jaśniejsze i cieńsze niż te u form wirulentnych, powodujących chorobę. Znajdują się tylko w określonych martwych tkankach kory, ale można je czasami obserwować przy ścinaniu kory cienkimi plasterkami. Wyleczone raki są nabrzmiąte i pokryte kallusem. W centrum infekcji odkryte drewno jest otoczone znacznym fałdem kallusa. Objawy chorobowe powodowane przez szczepy hypowirulentne są głównie na kallusie, chociaż sąsiadująca kora może być również w znacznym stopniu skolonizowana przez grzyba. Wiąże się to z usuwaniem tkanki martwiczej i tworzeniem pęknięć w pozostałej korze. Kolonizacja kory powodowana przez szczepy hypowirulentne jest taka, jak opisano wyżej. Kłody *Castanea* i *Quercus* spp. z grubą korą rzadko wykazują objawy kolonizacji przez wirulentne szczepy tego patogena.

## **Objawy chorobowe powodowane przez szczepy pośrednie**

Objawy, które występują na porażonych drzewach mogą być nietypowe, w porównaniu do tych, które obserwuje się w przypadku form wirulentnych i hypowirulentnych *C. parasitica*. W takich przypadkach, raki zaczynają się tworzyć, jak przy normalnej wirulentnej infekcji zabijając korę wewnętrzną i pokrywając biel podkorowy licznymi matami grzybni. Rozwijają się również piknidia grzyba. Jednakże, na reaktywnych, nabrzmiątych obszarach obejmujących martwe rejony rozwija się bariera przyrannego korka. Normalnie pędy przybyszowe rozwijają się poniżej raków. Na ogół, ten typ raka nie zabija porażonych gałęzi lub pni i rozwija się w zdrowiejące raki.

Podsumowując, następujące objawy są charakterystyczne dla porażenia przez *C. parasitica*:

- rozległe nekrozy i przebarwienia kory u sadzonek, młodych drzewek i szczepionych drzew *Castanea* spp. i *Quercus* spp. Odcięcie cienkiej warstwy kory ostrym nożem odsłania typowe wachlarze grzybni w korze lub pod nią.
- obecność wachlarzy grzybni i stromy na wszystkich częściach materiału roślinnego (powinny zostać pobrane próbki do oceny mikroskopowej)
- obecność raków, nabrzmienia części drewna, martwa, łuszcząca się kora na okrągłakach (powinny zostać pobrane próbki do izolacji na podłoża hodowlane)
- obecność objawów chorobowych powodowanych przez formy hypowirulentne (powinny zostać pobrane próbki do izolacji na podłoża hodowlane)

## Identyfikacja

Grzyb może być łatwo identyfikowany na podstawie jego charakterystycznego owocowania *in situ*, lub po inkubacji w komorze wilgotnej lub w wyniku izolacji na podłoża hodowlane.

## Inkubacja w wilgotnej komorze

Fragmety kory, jeśli to możliwe, z typową stromą wykłada się na szklaną szalkę Petriego (lub jeśli próbka jest duża, to do dużych plastikowych i przezroczystych pudełek) z kilkoma warstwami bibuły filtracyjnej. Po nawilżeniu wodą destylowaną komorę inkubuje się w temperaturze pokojowej w świetle fluorescencyjnym, w cyklu naprzemiennym 12 godz. dzień i 12 godz. ciemność (lub w jasnym miejscu laboratorium, ale nie bezpośrednio nasłonecznionym). Po upływie 4 dni od inkubacji próbkę przegląda się pod binokulem i pobiera owocniki do badania mikroskopowego. Jeśli nie znaleziono dojrzałych owocników, to próbkę umieszcza się ponownie w komorze wilgotnej i prowadzi okresowe obserwacje przez następne trzy tygodnie.

## Izolacja

Próbki pobiera się osadką, nożem, świdrem (kilka cm średnicy) lub korkoborem z porażonej kory lub drewna (tylko z bielu; pobieranie drewna jest tylko wtedy konieczne, kiedy mamy okorowane drewno). Najlepszym miejscem do pobrania próbki jest pogranicze zaawansowanej nekrozy, chociaż izolaty grzyba można łatwo uzyskać z każdej widocznej części grzybni. Kiedy podejrzewa się hypowirulentną formę choroby próbki należy pobrać z tkanek martwej kory. W laboratorium, drobne fragmenty (nieprzekraczające kilku milimetrów) pobiera się skalpelem z wewnętrznej części porażonej tkanki lub używa korkoboru do pobrania materiału z kory. Powierzchnię próbki odkaża się do 2 min. w roztworze podchlorynu sodu (handlowy wybielacz, 2-6% aktywnego chloru) lub w 70% etanolu przez kilka sekund i płucze w wodzie destylowanej sterylnej. Następnie, w warunkach aseptycznych fragmenty przenosi się na podłożę glukozowo-ziemniaczane (AGZ) i inkubuje w temperaturze pokojowej przez 3-5 dni. Alternatywnie, fragmenty można zanurzyć w 70% etanolu (1 sek.), opalić przez 1 sek. i wyłożyć na agar wodny ze streptomycyną (1,5% agar wodny ze 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  siarczanu streptomycyny). Każde skąpe strzępki grzybni, wyrastające z wyłożonych fragmentów materiału roślinnego przeszczepia się na AGZ. Kultury inkubuje się na stole laboratoryjnym w temp. pok. (alternatywnie można zastosować 12 godz. w świetle fluorescencyjnym i 12 godz. w ciemności) w celu tworzenia piknidiów i pigmentu kolonii.

## Mikroskopowe badanie próbek

*C. parasitica* zostaje pozytywnie zidentyfikowana, jeśli organy rozmnażania zostaną potwierdzone z następującym opisem (Ellis & Ellis, 1985): stroma żółta do ciemno pomarańczowej, 0,5-3-4 mm średnicy i 2,5 mm wysokości (jeśli sucha, to mniejsza), zagłębiona w korze, tylko górna część wydostająca się na powierzchnię (fot.1); konidioma (piknidia) o średnicy 100-300  $\mu\text{m}$  (ale czasami stwierdza się złożoną stromę, gdzie kilka piknidiów łączy się tworząc duże labiryntopodobne konidiomaty (większe niż 1 mm średnicy), utworzone jako nieregularne komory wewnątrz stromatycznej tkanki; w wilgotnych warunkach wypływają z nich skręcone, żółte wąsy lepkich konidiów (fot.1); konidiofory rozgałęzione, z bocznymi i szczytowymi odgałęzieniami i komórkami konidiotwórczymi; konidia 3-5 x 1,5-2  $\mu\text{m}$  (średnio 3,6 x 1,8  $\mu\text{m}$ ), elipsoidalne do pałeczkowatych, czasami lekko zagięte, przejrzyste i niepodzielone (fot web. 4); askomata (perytecja), o średnicy 300-400  $\mu\text{m}$ , kuliste i głęboko zanurzone w tkance stromy (fot web. 3); każde perytecjum z długą, cylindryczną szyjką z peryfizami (do 300-600  $\mu\text{m}$  długości i 200  $\mu\text{m}$  średnicy) wydostaje się dośrodkowo z zewnętrznego dysku stromy tworząc drobne, czarne brodawkowate struktury; worki 32-55 x 7-8,5  $\mu\text{m}$ , maczugowate do cylindryczno-maczugowatych, o krótkim trzonku, cienkościenne i 8-zarodnikowe; askospory ułożone w dwóch rzędach, 7-12 x 3,5-5,0  $\mu\text{m}$  (średnio 8,6 x 4,5  $\mu\text{m}$ ), elipsoidalne, dwukomórkowe, gładkie; czasami z niewielkim zwężeniem przy przegrodzie (fot web. 4).

## Charakterystyka wzrostu w kulturze

Szybkość wzrostu grzybni w temperaturze pokojowej (20°C) wynosi 5 mm na dzień, chociaż u izolatów hypowirulentnych obserwuje się o wiele niższe tempo wzrostu. Młoda kultura jest biała, z wiekiem staje się jasnożółta, później pomarańczowo-żółta, w końcu po kilku miesiącach przybiera zabarwienie od czerwono-pomarańczowego do fioletowego. Izolaty hypowirulentne mogą pozostawać białe, a kultury pośrednie mogą wykazywać wszystkie przejściowe kolory od białego poprzez żółty do pomarańczowego. Zabarwienie żółte do pomarańczowego w takich kulturach jest ograniczone do centralnej części kolonii (fot web. 5). Po upływie 5 dni od przeszczepienia, pierwotna konidioma jest widoczna w kulturze początkowo jako gęsta, okrągła mata. Tworzą się tylko złożone konidiomy; nie tworzy się askomata (fot. 2). U izolatów wirulentnych konidioma jest produkowana licznie w dziennych, koncentrycznych pierścieniach. Kultury form hypowirulentnych charakteryzują się spadającą zdolnością do tworzenia konidiomy i nieregularnym ich rozprzestrzenieniem na powierzchni pożywki (fot web. 5).

Jeśli nie obserwuje się obecności grzyba, ale występują inne typowe objawy dla *C. parasitica* należy przeprowadzić izolację grzyba na podłoża hodowlane. Charakterystyka wzrostu grzyba i morfologia organów w kulturze powinna pasować do *Endothiella parasitica*, jak opisano w niniejszym protokole.

## Inne grzyby występujące na korze kasztana

Na korze i drewnie *C. sativa*, mogą również występować mniej patogeniczne grzyby lub gatunki saprotroficzne. *Valsa* spp. (głównie *Valsa ceratophora* Tulasne & C. Tulasne, ale również *Valsa intermedia* Nitsche) i ich stadium konidialne *Cytospora*, przypominające *C. parasitica*, mają różne cechy mikroskopowe (konidia 4-5 x 1  $\mu\text{m}$ ) (ciała owocujące nie są pomarańczowe). Mogą być również obecne czarne acerwulusy *Coryneum* stadium *Melanconis modonia* Tulasne & C. Tulasne. Z kolei, *Cryptodiaporthe castanea* (Tulasne) Wehmeyer, w jego stadium konidialnym *Diplodina*, charakteryzuje się większymi konidiami (8-12 x 2-3

µm), ale gatunek ten powoduje również raki pnia (ciała owocujące nie są pomarańczowe, w kulturze beżowe). *Nectria cinnabarina* (Fries) Fries tworzy jasne do ciemnoczerwonych, powierzchniowe perytecja na stromie, a stadium konidialne *Tubercularia* tworzy czerwoną do białej konidiomę w postaci sporodochium. *Nectria coccinea* (Fries) Fries charakteryzuje się jasno do ciemnoczerwonymi perytecjami umieszczonymi na powierzchni stromy lub na okorowanym drewnie. Stadium *Cylindrocarpon* odróżnia się 1-5-przegrodowymi, zakrzywionymi konidiami. *Libertella* sp. ma zakrzywione hialinowe konidia, większe od *Endothiella*. *Diatrype stigma* (Hoffmann) Fries, w stadium konidialnym *Naemospora* tworzy jasnopomarańczowe wąsy, które zawierają alantoidalne konidia, o wielkości 4-6 x 1-1,5 µm.

Grzyby spokrewnione z rodzajem *Endothia* i *Cryphonectria* spotykane na innych częściach rośliny mogą być mylone z *C. parasitica* (Roane i wsp., 1986). *Endothia gyrosa* (Schweinitz) Fries posiada jednokomórkowe alantoidalne zarodniki workowe. Stadium *Endothiella* charakteryzuje się hialinowymi, jednokomórkowymi, cylindrycznymi do alantoidalnych konidiami, o wielkości 3,4 x 1,5-2 µm. Tworzenie w kulturze purpurowych wysięków o zapachu pachnotki odróżnia jednak tego grzyba od *C. parasitica*. *Cryphonectria cubensis* (Bruner) Hodges powoduje raki na *Eucalyptus*. *Cryphonectria radicalis* (Fries) Barr posiada 2- komórkowe, hialinowe askospory o wymiarach 6–10(–12) x 3–4 µm; na AGZ, tworzy na grzybni purpurowe kropelki, a agar kukurydziany zabarwia na kolor purpurowy (Hoegger i wsp., 2002).

## **Sprawozdawczość i dokumentacja**

Wskazówki dotyczące sprawozdawczości i dokumentacji przedstawiono w standardzie EPPO PM 7/77 (1) *Sprawozdawczość i dokumentowanie wyników badań*.

## **Informacje dodatkowe**

Więcej informacji o tym organizmie można uzyskać od:  
(zachowana wersja angielska (przyp. tłum.))

Università degli Studi della Tuscia, Dipartimento di Protezione delle Piante, v.s. Camillo de Lellis, I-01100 Viterbo (Italy); E-mail: [yannini@unitus.it](mailto:yannini@unitus.it)

Istituto per la Patologia degli Alberi Forestali del C.N.R., Piazzale delle Cascine 28, 50144 Firenze (Italy)

INRA, Station de Pathologie Végétale, Domaine de la Grande Ferrade BP 81, F-33883 Villenaved'Ornon (France); E-mail: [robin@bordeaux.inra.fr](mailto:robin@bordeaux.inra.fr)

Swiss Federal Research Institute WSL, CH-8903 Birmensdorf (Switzerland); E-mail: [heiniger@wsl.ch](mailto:heiniger@wsl.ch) or [daniel.rigling@wsl.ch](mailto:daniel.rigling@wsl.ch)

Slovenian Forestry Institute (SFI), Večna pot 2, 1000 Ljubljana (Slovenia); E-mail: [dusan.jurc@gozdis.si](mailto:dusan.jurc@gozdis.si).

## **Podziękowania**

Protokół ten został pierwotnie opracowany przez: (zachowana wersja angielska (przyp. tłum.))

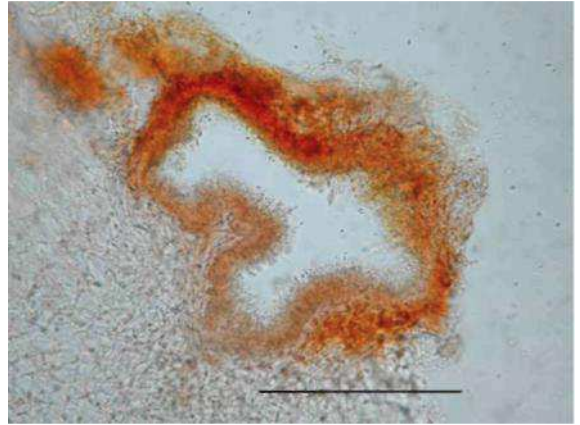
Dr D. Jurc, Slovenian Forestry Institute, Ljubljana (SI) and Dr T. Turchetti, Istituto per la Patologia degli Alberi Forestali, Firenze (IT) with assistance from the COST G4 'Multidisciplinary Chestnut Research' Working Group 3 'Pathogen and Pests' (A. Vannini, C. Robin, U. Heiniger, D. Rigling).

**Materiały źródłowe** (zachowana wersja angielska (przyp. tłum.))

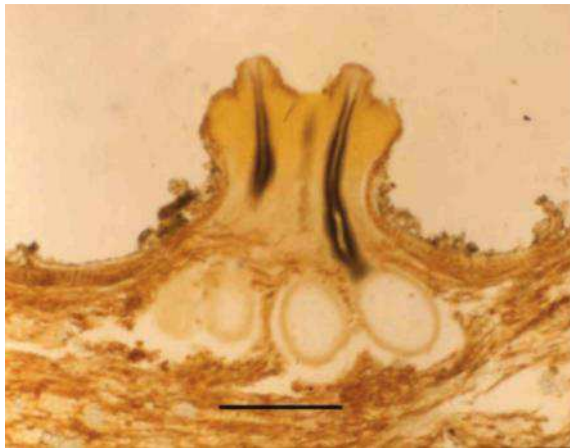
- Ellis M.B. & Ellis J.B. (1985) *Microfungi on Land Plants*. Croom-Helm, London (GB).
- EPPO/CABI (1997) *Cryphonectria parasitica. Quarantine Pests for Europe*, 2nd ed., pp. 729–732.
- CAB International, Wallingford (GB). Fulbright DW (1999) Chestnut blight and hypovirulence. In: *Plant–Microbe Interactions*, Vol. 4 (Eds Stacey G & Keen NT), pp. 57–79. APS Press, St Paul (US).
- Heiniger U. & Rigling D. (1994) Biological control of chestnut blight in Europe. *Annual Review of Phytopathology* **32**, 581–599.
- Hoegger P.J., Rigling D., Holdenrieder O. & Heiniger U. (2002) *Cryphonectria radicalis*: rediscovery of a vanished fungus. *Mycologia* **94**, 105–115.
- Roane M.K., Griffin G.J. & Elkins J.R. (1986) Chestnut Blight. Other *Endothia* Diseases, and the Genus *Endothia*. APS Press, St Paul (US).



**Fot.1.** Stroma z piknidiami na korze, wydzielanie konidiów w postaci wąsów (LNPV, Nancy, FR) Ljubljana, SI)



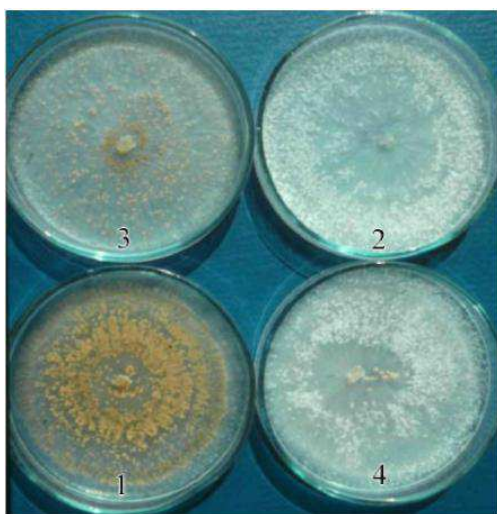
**Fot.2.** Pycnidium w kulturze, wewnętrzna ściana z komórkami konidiotwórczymi (bar = 50 m) SFI,



**Fot web.3.** Perytecja w stromie, szyjki i ostiole w brodawkowatych wypukłościach stromy (SFI, Ljubljana, SI)



**Fot web.4.** Worki, askospory i konidia (bar = 20  $\mu$ m) (SFI, Ljubljana, SI)(bar = 500  $\mu$ m)



**Fot web.5.** Kultury *C. parasitica* na AGZ (1 – forma wirulenta, 2 – forma hypowirulentna, 3 i 4 – forma przejściowa (SFI, Ljubljana, SI)