

Aus dem Institut für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. habil. R.W. Hoffmann

**Entwicklung einer molekularbiologischen Methode
zum Nachweis des Krebspesterregers
Aphanomyces astaci SCHIKORA (*Oomycota*)
aus Krebsgewebe (*Astacus astacus*)**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Nicole Schaefers
aus
Saarbrücken

München 2002

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. R. Stolla
Referent: Univ.-Prof. Dr. R. Hoffmann
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. M. Förster

Tag der Promotion: 19. Juli 2002

Meinen Eltern,

für ihre liebevolle und tatkräftige Unterstützung

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... V

I. EINLEITUNG..... 1

II. LITERATURBESPRECHUNG..... 2

1. Allgemeines zu Flusskrebsen..... 2

1.1 Ökonomische und ökologische Bedeutung der Flusskrebse..... 2

1.2 Systematik und Verbreitung von Süßwasserkrebsen 5

1.3 Übersicht über die makroskopische Anatomie der Flusskrebse 9

1.4 Abwehrmechanismen der Krebse gegen Pathogene (Immunologie) 11

1.5 Ursachen für die Gefährdung einheimischer Bestände..... 16

1.6 Gesetzliche Bestimmungen zum Schutz der einheimischen Bestände ... 16

2. Zusammenfassung der geschichtlichen Entwicklung und Auswirkung
der Krebspest..... 18

3. Taxonomie und Morphologie der Oomyceten 20

3.1 Klassische Taxonomie 20

3.2 Molekulargenetische Taxonomie 22

4. Ätiologie und Pathogenese..... 27

4.1 Morphologie und Physiologie des Erregers 27

4.2 Infektion 28

5. Wirtsspektrum und Empfänglichkeit 31

6. Symptomatologie und Pathologie bei empfänglichen Spezies 32

6.1 Klinische Symptome 32

6.2 Pathologisch-anatomische Veränderungen 34

6.3 Mikroskopische Veränderungen 35

7. Diagnose..... 36

8. Übertragungswege..... 38

9. Bekämpfung und Prävention..... 38

10.	Übersicht über das Genom der Oomycota	40
11.	Derzeitiger Kenntnisstand über die Oomycota und ihre Phylogenie	42
12.	Überblick über die Polymerasekettenreaktion (PCR)	45
	12.1 Das Prinzip der PCR	45
	12.2 PCR-Optimierung	48
	12.3 Analyse der PCR-Produkte	50
13.	Charakterisierung verschiedener Genotypen von <i>Aphanomyces astaci</i>	51
 III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN		 54
 A. MATERIAL		 54
1.	Versuchstiere	54
	1.1 Flusskrebse zur Wahl einer geeigneten Extraktionsmethode.....	54
	1.2 Flusskrebse zur Bestimmung der Sensitivität der PCR im Infektionsversuch	54
	1.3 Spontan erkrankte und nicht infizierte Flusskrebse	55
2.	Zur Untersuchung gelangte Pilzstämmen und andere Proben	55
3.	Molekularbiologische Reagenzien und Kits	59
	3.1 DNA-Extraktion	59
	3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)	59
	3.3 Gelelektrophorese	60
	3.4 Aufreinigung	60
	3.5 Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP)	60
	3.6 Sequenzierung	61
4.	Geräte	61
5.	Rezepturen für selbsthergestellte Puffer, Lösungen und Anzuchtmedien	61
	5.1 PG ₁ - (Pepton-Glukose-) Medium und –Agar	61
	5.2 LB-Medium und -Agar	62
	5.3 TAE-(Tris-Acetat-EDTA-) Puffer.....	63
	5.4 dNTP-Mix für die PCR	63
	5.5 DNA-Molekulargewichtsmarker für die Elektrophorese	63

6.	Oligonukleotid-Primer	64
B.	METHODEN.....	66
1.	Gewinnung und Auszählung der Sporen.....	66
2.	Infektion durch Zoosporenexposition	66
3.	Lichtmikroskopische Untersuchungen der Abdominalkutikula.....	68
4.	Molekularbiologische Untersuchungen	70
4.1	DNA-Isolation.....	70
4.1.1	DNA-Extraktion aus dem Mycel von Reinkulturen	70
4.1.2	DNA-Extraktion aus <i>Aphanomyces astaci</i> -Sporen.....	71
4.1.3	DNA-Extraktion von <i>Aphanomyces astaci</i> aus Krebsgewebe..	71
4.2	Auswahl der Primer.....	74
4.3	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	75
4.4	Sensitivitätsbestimmung	77
4.5	Spezifitätsbestimmung	80
4.6	Agarose-Gelelektrophorese.....	80
4.7	Aufreinigung der PCR-Produkte.....	81
4.8	Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP).....	81
4.9	Validierung der entwickelten Methoden.....	82
C.	ERGEBNISSE	83
1.	Entwicklung eines molekularbiologischen Nachweisverfahrens für die Krebspest.....	83
1.1	Wahl einer DNA-Isolationsmethode.....	83
1.2	Wahl der Primer	86
1.3	Optimierung der PCR-Protokolle.....	87
1.3.1	Optimierung der MgCl ₂ -Konzentration	88
1.3.2	Optimierung der Annealing-Temperatur.....	90
1.3.3	Einfluss von Kosolvens-Zugabe.....	91

1.3.4	Optimierung der dNTP- und <i>Taq</i> -Konzentration	92
1.3.5	Optimierung der Zyklenzahl	92
1.4	Wahl des PCR-Protokolls zur Detektion von <i>Aphanomyces astaci</i> in der Kutikula.....	94
1.5	Bestimmung der Spezifität der entwickelten PCRs	98
1.6	Verifikation der PCR mit RFLP (Restriktionsfragmentlängen- Polymorphismus).	103
1.7	Sequenzierung.....	107
1.8	Bestimmung der Sensitivität der PCRs	110
2.	Auswertung der Infektionsversuche.....	116
2.1	Symptomatik	121
2.2	Lichtmikroskopische Untersuchungen der Abdominalkutikula.....	122
2.3	Molekularbiologischer Nachweis von <i>Aphanomyces astaci</i>	130
3.	Anwendung der Methode an diagnostischen Proben.....	136
 IV. DISKUSSION UND ABSCHLIEßENDE BETRACHTUNG		 141
1.	Entwicklung eines molekularbiologischen Nachweisverfahrens für die Krebspest.....	141
1.1	Wahl einer geeigneten Extraktionsmethode.....	142
1.2	Konstruktion und Auswahl der Primer	144
1.2.1	Strategische Überlegungen zum Primer-Design	145
1.2.2	Selektion der Primer.....	148
1.3	Wahl des PCR-Protokolls	149
1.4	Bestimmung der Spezifität und analytischen Sensitivität.....	154
1.5	RFLP (Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus)	159
2.	Auswertung der Infektionsversuche.....	161
3.	Diskussion und Einsatzmöglichkeiten der entwickelten Methoden.....	164
4.	Molekularbiologischer Nachweis von <i>Aphanomyces astaci</i> aus Krebsgewebe.....	167
5.	Ausblick	169

V. ZUSAMMENFASSUNG 171

SUMMARY 173

VI. LITERATURVERZEICHNIS 175

1. Literaturangaben 175

2. Rechtsvorschriften 195

VII. ANHANG 196

DANKSAGUNG

LEBENS LAUF

ABKÜRZUNGEN

A	Adenin
A.	Aphanomyces
a	atto (10^{-18})
Aqua dest.	destilliertes Wasser
Aqua inj.	Aqua injectabile
bp	<u>B</u> asen <u>p</u> aare
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CBS	<u>C</u> entral <u>b</u> üro für <u>S</u> chimmelpilzkulturen
D	Dalton
DMSO	<u>D</u> imethyl <u>s</u> ulfo <u>x</u> id
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<u>d</u> esoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid)
dNTP	<u>D</u> esoxyn <u>u</u> kleosid <u>t</u> riphosphat
EDTA	<u>E</u> thylendi <u>a</u> min <u>t</u> etra <u>a</u> acetat
f	femto (10^{-15})
G	Guanin
IPTG	<u>I</u> sopropyl- β -D- <u>T</u> hio- <u>G</u> alactopyranosid
ITS	internal <u>t</u> ranscribed <u>s</u> pacer
k	kilo (10^3)
l	Liter
LB-	<u>L</u> uria <u>B</u> ertani-Medium/Agar
LSU	<u>l</u> arge <u>s</u> ubunit
M	Mega (10^6)
μ	mikro (10^{-6})
m	milli (10^{-3})
M	molar, mol/l
min.	Minuten
mRNA	<u>m</u> essenger RNA
mtDNA	mitochondriale Desoxyribonukleinsäure
n	nano (10^{-9})
N	normal

Abkürzungsverzeichnis

p	piko (10^{-12})
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PG1-	Pepton-Glukose-1-Medium/Agar
ProPo	Prophenoloxidase
RAPD	zufällig amplifizierte polymorphe DNA (random amplified polymorphic DNA)
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
rRNA	ribosomale RNA
S.	Saprolegnia
sec.	Sekunden
SSU	small subunit
syn.	synonym
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transfer RNA
U	Unit (Einheit)
U/min.	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt (elektrische Spannung)
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -Galactopyranosid

I. EINLEITUNG

Bei *Aphanomyces astaci* SCHIKORA (1906) handelt es sich um den Erreger der hochinfektiösen, bei empfänglichen europäischen und australischen Flusskrebsspezies in der Regel akut verlaufenden und mit 100 %iger Mortalität einhergehenden Krebspest (UNESTAM 1972, ALDERMAN et al. 1987, SCHÄPERCLAUS 1991). Seit ihrem Auftreten in Europa Ende des 19. Jahrhunderts (HOFER 1906) wurde die Krebspest zu einer andauernden, ernsthaften Bedrohung der einheimischen Krebsbestände und sorgte damals wie heute für bedeutende Verluste in der Aquakultur. Sie stellt die wirtschaftlich bedeutendste Erkrankung der Flusskrebse dar, und es finden weltweit Bemühungen statt, sie zu bekämpfen. Die größte Gefahr geht von Tieren aus, bei deren Import die Erkrankung unerkannt bleibt und die so die sich erholenden einheimischen Bestände erneut gefährden.

Mit der Richtlinie 91/67/EWG, die das Verbringen von Tieren der Aquakultur in bestimmte Gebiete regelt, wurde die Möglichkeit geschaffen, bestimmte Regionen oder Zuchtbetriebe als „seuchenfrei“ zu deklarieren, in die nur Tiere aus ebenfalls seuchenfreien Beständen geliefert werden dürfen. Damit ein Gebiet einen solchen Status erhält, müssen dort regelmäßige und in kurzen Abständen stattfindende Untersuchungen durchgeführt werden. Die bislang verfügbaren Nachweisverfahren waren zu diesem Zweck nicht geeignet, da sie aufgrund der erforderlichen Isolierung und Reinkultivierung des Erregers schwierig, langwierig und zu wenig sensibel waren. Bis vor kurzem betrug die Identifikationsdauer von *Aphanomyces astaci* mindestens zwei Wochen, da nach Anzucht und Zoosporenproduktion erst der Infektionsversuch mit empfänglichen Krebsarten eine endgültige Bestätigung brachte (ALDERMAN und POLGLASE 1986, CERENIUS et al. 1988). Durch die Entwicklung einer Polymerasekettenreaktion mit anschließender Restriktionsenzym-Analyse konnte der Erreger innerhalb mehrerer Tage nachgewiesen werden, doch erforderte diese Methode vor Anwendung immer noch die schwierige Reinkultivierung von *Aphanomyces astaci* (OIDTMANN et al. 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Nested PCR zur spezifischen und sensitiven Diagnose von *Aphanomyces astaci* etabliert, die den frühzeitigen Nachweis des Erregers direkt aus Krebsgewebe (*Astacus astacus*) innerhalb eines Tages ermöglicht. Sie verspricht, ein wertvolles Instrument für die mit der Bekämpfung der Krankheiten aquatischer Tiere beauftragten Untersuchungsstellen zu werden und die Stellung der Krebspest innerhalb des Tierseuchenrechts zu ändern.

II. LITERATUR

1. Allgemeines zu Flusskrebse

1.1 Ökonomische und Ökologische Bedeutung der Flusskrebse

Seit jeher als Handelsobjekt und Nahrungsmittel geschätzter Vertreter der größten wirbellosen Organismen in europäischen Gewässern war der Flusskrebs schon im Spätmittelalter begehrtes Fangobjekt des Menschen (HOLTHUIS 1978, HAGER 1996, PEKNY und PÖCKL 2000). Während des 19. Jahrhunderts fand ein reger Im- und Export vor allem von Edelkrebsen (*Astacus astacus*) in Gesamteuropa statt, wobei Deutschland allein etwa 600 Tonnen jährlich auf den ausländischen Krebsmarkt brachte (DEHUS et al. 1999). Die Bewirtschaftung und das Interesse an den Süßwasserkrebsen fand um 1860 durch das Auftreten eines Massensterbens der einheimischen Bestände ein jähes Ende, das wegen der rasanten Verbreitung und den verheerenden Folgen als Krebspest bekannt wurde (HOFER 1898) und die Edelkrebse in vielen Gewässern fast vollständig ausrottete. Nach fehlgeschlagenen Wiederbesiedlungsversuchen mit heimischen Krebsen wurden amerikanische Krebsarten eingeführt, die zwar für diese Infektion wenig empfänglich waren, aber die Situation noch verschlimmerten, da sie oft unerkannte Träger der Krebspest sind und so die europäischen Flusskrebse infizieren können.

Das willkürliche Aussetzen nordamerikanischer Spezies in die Natur wurde erst vor wenigen Jahren durch die Einführung einer Bewilligungspflicht eingeschränkt, und Bemühungen zur Aufzucht von Edelkrebsen wurden zu Besatzzwecken natürlicher Habitate initiiert (KELLER 1999), um den Schutz der einheimischen Krebse zu fördern und eine Ausbreitung der Krebspest zu minimieren.

Wo auch immer die Krebspest ausbrach, mussten hohe wirtschaftliche Verluste verbucht werden. Dies zeigen Exportrückgänge in Schweden von 90 Tonnen im Jahr 1907 auf 30 Tonnen im Jahr 1908 (DAHLE 1982). In Folge der Krebspestausbrüche in Schweden exportierte Norwegen jährlich bis zu 25 Tonnen dorthin, in den 1960ern wurden sogar bis zu 30 Tonnen produziert, doch als auch dort die Krebspest auftrat, reduzierte sich die Ausbeute um zwei Drittel auf 10 Tonnen im Jahr 1990 (SKURDAL et al. 1993). Ebenso hatte ein

Ausbruch in Estland in den 1930ern große ökonomische Folgen (TUUSTI et al. 1993). In Finnland sorgt die Krebspest heute noch für jährliche Verluste im zweistelligen Millionen Finnmark Bereich (WESTMAN 1991). Die historisch in der europäischen Krebsproduktion führende Türkei exportierte in den 1980ern etwa 6000 bis 7000 Tonnen jährlich vor allem nach Frankreich und Schweden. Ein Krebspestausbruch brachte 1985 den Fang in der Türkei fast vollständig zum Erliegen (BARAN und SOYLU 1989) und reduzierte die Ausbeute an dem dort heimischen *Astacus leptodactylus* um 85 % (ACKEFORS 1999, HOLDICH 2002).

Nach Auftreten der Krebspest in Europa stiegen die Importländer auf Spezies aus den USA, vor allem auf den Roten Amerikanischen Sumpfkrebs, *Procambarus clarkii* (Louisiana), und den Signalkrebs, *Pacifastacus leniusculus* (Westküste), um, wobei besonders Letzterer als latenter Träger der Krebspest für eine weitere Ausbreitung des Erregers (*Aphanomyces astaci* SCHIKORA) und somit immer wieder für Ausbrüche sorgte. Schweden war dabei maßgeblich an der Verbreitung von Signalkrebsen in Europa beteiligt. 1969 wurden 100 000 Tiere vom Lake Tahoe (Californien, USA) importiert und natürliche Gewässer mit ihnen besetzt. Ab 1970 wurden diese „schwedischen“ Signalkrebse vermarktet und in die meisten europäischen Länder exportiert (ACKEFORS 2000).

Die beschriebenen Entwicklungen und wirtschaftlichen Verluste betreffen vor allem den Edelkrebs, der schon immer von großer ökonomischer Bedeutung aufgrund seiner größeren Schwanz- und Scherenmuskulatur im Vergleich zu anderen Flusskrebsarten war, und dessen Fleisch als besondere Delikatesse gilt (EICHERT und WETZLAR 1987).

Tabelle 1 zeigt eine Zusammenfassung von Statistiken der Food and Agriculture Organization (FAO) über die Ein- und Ausfuhr von Flusskrebsen in Europa im Jahr 1990, wobei Italien mit 2170 Tonnen und Schweden mit 1943 Tonnen als Importeure und Spanien mit 867 Tonnen als Exporteur an der Spitze liegen. Die europäische Imbalance (Differenz Export zu Import) beträgt -3767 Tonnen bei einem Wert von US\$ 30 Millionen (EDER und HÖDL 1998), und das ehemals den ausländischen Markt bestimmende Europa wird somit außer in Spanien, Großbritannien, Portugal und Griechenland durch den Import von Krebsen bestimmt.

Tabelle 1: Der Import (I) und Export (E) von Süßwasserkrebsen in verschiedenen europäischen Ländern im Jahr 1990 (nach EDER und HÖDL 1998)

Land:	Import:		Export:		Balance: in Tonnen	(E-I): Wert in 1000 \$US
	in Tonnen	Wert in 1000 \$US	in Tonnen	Wert in 1000 \$US		
Belgien	163	1311	62	400	-101	-911
Dänemark	79	411	0	0	-79	-411
Finnland	77	745	1	7	-76	-738
Frankreich	748	3748	3	20	-745	-3728
Deutschland	72	679	0	5	-72	-674
Griechenland	0	0	18	374	+18	+374
Italien	2170	21616	514	4454	-1656	-17162
Niederlande	140	795	34	406	-106	-389
Portugal	0	1	70	377	+70	+376
Spanien	34	69	867	3860	+833	+3791
Schweden	1943	15434	45	265	-1898	-15169
Großbritannien	3	41	48	878	+45	+837

Diese offiziellen internationalen Statistiken unterschätzen nach aktuellen Untersuchungen die Gesamtproduktion allerdings um mehr als das Vierfache (ACKEFORS 2000).

In Deutschland findet die Produktion und Zucht von Edelkrebsen momentan vornehmlich auf semi-professioneller Basis statt, wobei das deutsche Jahresprodukt von Krebsfleisch bei circa 10 Tonnen mit einem Marktwert von DM 50,00 bis DM 160,00 pro kg Krebs bei einem Individualgewicht von 80 bis 120 g für den Konsum liegt, während zu Zuchtzwecken der Preis von Einzeltieren DM 0,60 für Juvenile (1,2 cm Gesamtlänge) bis DM 5,00 für adulte Weibchen (8–12 cm Gesamtlänge) beträgt (KELLER 1993, HAGER 1996, DEHUS et al. 1999).

Nach Durchzug der Krebspest und der damit entstandenen Lücke in der Nahrungskette kam es auch zu **ökologischen Problemen** wie der Überwucherung von Seen, der Zuwachsverringering bei Fischbeständen (v.a. den Raubfischen) und der Übernahme der Detritusverwertung vermehrt durch Bakterien und Pilze. Dies zeigt die große Bedeutung der Krebse im ökologischen Gleichgewicht als Carni- Herbi- und Detrivoren (UNESTAM 1973, MATTHEWS und REYNOLDS 1992), sowie ihre Indikatorfunktion für eine gute Gewässerqualität (STREIBL et al. 1998). Als Bioindikatoren bezeichnet man Organismen, Arten oder Artenassoziationen, die auf Umwelteinflüsse mit Veränderungen ihrer

Lebensfunktionen und/oder ihrer chemischen Zusammensetzung reagieren, bzw. deren Vorkommen oder Fehlen in einer Biozönose Standort- oder Umweltfaktoren anzeigt, und die somit Mittel der Wahl für die Bewertung menschlichen Einflusses auf aquatische Ökosysteme, wasserbauliche Maßnahmen und Biotopmanagement sind (EDER und HÖDL 1998). Zur genauen Beurteilung der Wasserqualität sind die einheimischen Flusskrebse allerdings nur bedingt geeignet, da sie eine relativ hohe Toleranz gegenüber verschiedenen limnochemischen Parametern (pH-Wert, Gesamt-/Carbonathärte, Nitrat, Phosphat, Leitfähigkeit) aufweisen (BOHL 1989), doch ermöglichen sie aufgrund ihrer benthischen (auf dem Boden von Gewässern lebend) Lebensweise eine Beurteilung der strukturellen Ausstattung eines Gewässers, seiner Uferbeschaffenheit und somit der ökologischen Funktionsfähigkeit als Habitat für gefährdete Arten (HAGER 1996, EDER und HÖDL 1998).

1.2 Systematik und Verbreitung von Süßwasserkrebsen

Die Süßwasserkrebse kommen weltweit auf allen Kontinenten – mit Ausnahme von Afrika und einigen Teilen von Asien – vor und umfassen die auf der Nordhalbkugel vorkommenden Astacoidea (Überfamilie) und die auf der Südhalbkugel zu findenden Parastacoidea (Überfamilie) (SCHOLTZ 1999). Zu den Ersteren gehören die vier, circa 12 Arten umfassenden, Gattungen der Astacidae (Familie) und die drei Subfamilien (12 Gattungen mit circa 335 Arten) der Cambaridae (Familie), während die zweite Überfamilie die zu 14 Gattungen gehörenden etwa 129 Arten der Parastacidae (Familie) beinhaltet, wobei hier die größte Bedeutung der vor allem in Australien vorkommenden 38 Arten umfassenden Gattung *Cherax* zukommt, mit *C. tenuimanus* („Marron“), *C. destructor* („Yabby“) und *C. quadricarinatus* („Redclaw“) als bekannteste und ökonomisch wichtigste Vertreter (HAGER 1996). Es wird geschätzt, dass es etwa 550 Krebsarten weltweit gibt (ACKEFORS 2000).

In der Literatur sind unterschiedliche taxonomische Einteilungen verschiedener Crustaceensystematiker zu finden, wobei sie insbesondere in der Zuteilung zu Über- und Untereinheiten von Stamm und Klasse differieren (EICHERT und WETZLAR 1988, AHNE et al. 2000, *NCBI Genbank: Taxonomy Browser* 2001). EDER und HÖDL (1998) erstellten eine tabellarische Klassifikation, die sich nach eigenen Angaben nach der mehrheitlichen Übereinkunft richtet (Tabelle 2).

Tabelle 2 : Zusammenfassende Darstellung der systematischen Stellung wirtschaftlich bedeutender Flusskrebsspezies (modifiziert nach EDER und HÖDL 1998)

Reich:	Regnum animalium		Tierreich
Unterreich:	Metazoa		Mehrzeller
Stammgruppe:	Articulata		Gliedertiere
Stamm:	Arthropoda		Gliederfüßer
Abteilung:	Mandibulata (Antennata)		Mandibelträger
Unterstamm:	Crustacea (Branchiata, Diantennata)		Krebse (Kiemenatmer)
Klasse:	Malacostraca		Höher entwickelte Krebse
Unterklasse:	Eumalacostraca		das 7. Pleomer ist mit dem 6. Pleomer vereint
Überordnung:	Eucarida		der Carapax ist mit 7 Thorakomeren verschmolzen
Ordnung:	Decapoda		Zehnfüßkrebse
Unterordnung:	Reptantia		Kriecher
	Astacidea (LATREILLE, 1802-1803)		Echte Hummer und Krebse
Überfamilien:	Flusskrebse		
	Astacoidea (DE HAAN, 1841)		Parastacoidea (HUXLEY, 1879)
Familien:	Astacidae (LATREILLE, 1802-1803)	Cambaridae (HOBBS, 1942)	Parastacidae (HUXLEY; 1879)
wirtschaftlich bedeutende Arten :	<i>Astacus astacus</i> (LINNAEUS, 1756) Edelkrebs; noble crayfish, broad-fingered crayfish	<i>Orconectes limosus</i> (RAFINESQUE, 1817) Kamberkrebs; spinycheek crayfish	<i>Cherax destructor</i> (CLARK, 1936) Yabby
	<i>Austropotamobius torrentium</i> (SCHRANK, 1803) Stein-, Bachkrebs; stone crayfish	<i>Procambarus clarkii</i> (GIRARD, 1852) Roter amerikanischer Sumpfkrebs; red swamp crayfish	<i>Cherax tenuimanus</i> (SMITH, 1912) Marron
	<i>Austropotamobius pallipes</i> (LEREBOULLET, 1858) Dohlenkrebs; white-clawed crayfish		<i>Cherax quadricarinatus</i> (VON MARTENS, 1868) Red Claw
	<i>Astacus leptodactylus</i> (ESCHSCHOLTZ, 1823) Galizier-, Sumpf-, Teichkrebs; narrow-clawed crayfish		
	<i>Pacifastacus leniusculus</i> (DANA, 1852) Signalkrebs; signal crayfish		

In den letzten zehn Jahren stieg das Interesse an den einheimischen Flusskrebsspezies und an deren Schutz und es wurde begonnen, Datenmaterial über das Vorkommen der Süßwasserkrebse in Europa zu sammeln (EDER und HÖDL 1998). Dabei wird die Verbreitung der, diese Arbeit betreffenden, Gattung *Astacus* (FABRICIUS, 1775) von Mittel- nach Osteuropa sowie Westasien beschrieben.

In Deutschland unterliegen diese Bemühungen zur Erfassung der Verbreitung der Süßwasserkrebse den einzelnen Bundesländern, wobei Bayern (BOHL 1989, BOHL 1999), Baden-Württemberg (DEHUS 1997) und Schleswig-Holstein (DEHUS 1990) mit gutem Beispiel vorangehen und DEHUS et al. (1999) eine Kartierung der in Deutschland vorkommenden Krebsspezies durchgeführt haben. Abbildung 1 zeigt das Vorkommen des für die vorliegende Arbeit bedeutsamen Edelkrebsses innerhalb Deutschlands.

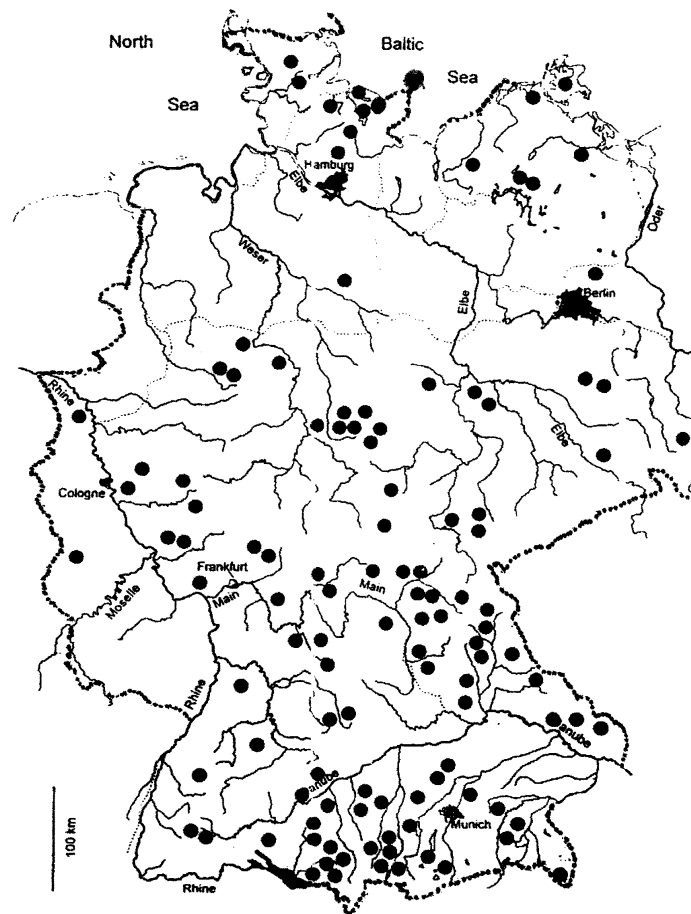


Abbildung 1: Verbreitung von *Astacus astacus* (●) in Deutschland (DEHUS et al. 1999)

Die in Deutschland in der Natur vorkommenden Dekapodenarten (PEKNY und PÖCKL 2000), ihre wichtigsten Bestimmungsmerkmale (HAGER 1996, EDER und HÖDL 1998) sowie ihre innerdeutsche Verbreitung (DEHUS et al. 1999) sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3 : Zusammenfassung der wichtigsten Bestimmungsmerkmale der in Deutschland in der Natur vorkommenden Flusskrebsspezies und deren Verbreitung (modifiziert nach EDER und HÖDL 1998, TROSCHEL 1997)

Krebsspezies	Heimische Arten:			Eingebürgerte Arten:			
	Edelkrebs	Steinkrebs	Dohlenkrebs	Kamberkrebs	Galizischer Sumpfkrebs	Signalkrebs	Roter Amerik. Sumpfkrebs
Länge in cm (Rostrum-Schwanz)	> 15	< 10	< 12	< 10	> 15	> 15	> 12
Scherenform	breit/groß	breit/groß	breit/groß	klein	schmal/langgestreckt	breit/groß	S-förmig geschwungen
Scherenbedornung	kleine Höcker	kleine Höcker	kleine Höcker	kleine Höcker	kleine Höcker	ohne	starke rote Bedornung
Scherenunterseite	rot/orange	weißgrau	weißgrau	weißgrau	bläßgelb	rot/orange	knallrot
Apex	lang, spitz	gleichseit. Dreieck	gleichseit. Dreieck	kurz, spitz	lang, spitz	lang, spitz	kurz, spitz
Rostrumkiel	bedornt	ohne	glatt	ohne	glatt	schwach gekielt	ohne
Rostrumseiten	fast parallel	auseinanderlaufend	auseinanderlaufend	parallel	fast parallel, lang	fast parallel	auseinanderlaufend
Kiel der Fühlerschuppe	glatt	bezahnt	glatt	glatt	glatt	glatt	glatt
Postorbitalknoten	2	1	1	1	2	2	1
Dornen an der Nackenfurche	einzel, stumpf	ohne	2-6	Dornenfeld, 1 Hauptdorn	1-3	ohne	ohne
Rückenfurchen	Abstand	Abstand	Abstand	Abstand	Abstand	Abstand	berühren einander
Hinterleibsfärbung	gleichmäßig	gleichmäßig	gleichmäßig	rotbraune Querbinden	gleichmäßig	gleichmäßig	gleichmäßig
Verbreitungsgebiet in Deutschland	in Seen und Flüssen in höheren Regionen (Gesamt-Deutschland)	Süddeutschland, südlich von Köln, Main-Gebiet, Schwarzwald, südlich der Donau	SW-Deutschland, Rheingegend	in Flüssen, Kanälen, einigen Seen (Gesamt-Deutschland); [eingebürgert aus N-Amerika]	ausschließlich in Seen v.a. in N- und S-Deutschland; [eingebürgert aus der Türkei]	in Seen und Flüssen (Gesamt-Deutschland); [eingebürgert aus N-Amerika]	N- und S-Deutschland; [eingebürgert aus N-Amerika]
[ursprüngliches Herkunftsland]							

Vereinzelt wurden auch Populationen von den amerikanischen Krebsarten *Orconectes immunis* (paper shell crayfish, HAGEN 1870) und *Procambarus zonangulus* (white river crayfish, HOBBS und HOBBS 1990), die in den letzten Jahren als Liebhabertiere in Gartenteichen und Aquarien gehalten wurden, vorgefunden (DUSSLING und HOFFMANN 1998, BOHL 1999). Obwohl jedes Jahr etwa 15 Tonnen australischer Krebsarten nach

Deutschland importiert werden, konnten bislang keine, in freier Natur lebenden Populationen nachgewiesen werden (DEHUS et al. 1999).

1.3 Übersicht über die makroskopische Anatomie der Flusskrebse

Für genaue Angaben zur funktionellen Morphologie sowie der funktionellen und mikroskopischen Anatomie der Süßwasserkrebse wird auf die spezielle Fachliteratur (z.B. (HOLDICH 1988, RENNER 1989, PÖCKL 1998, HOLDICH 2002) verwiesen. Eine Übersicht bieten Abbildung 2 und 3.

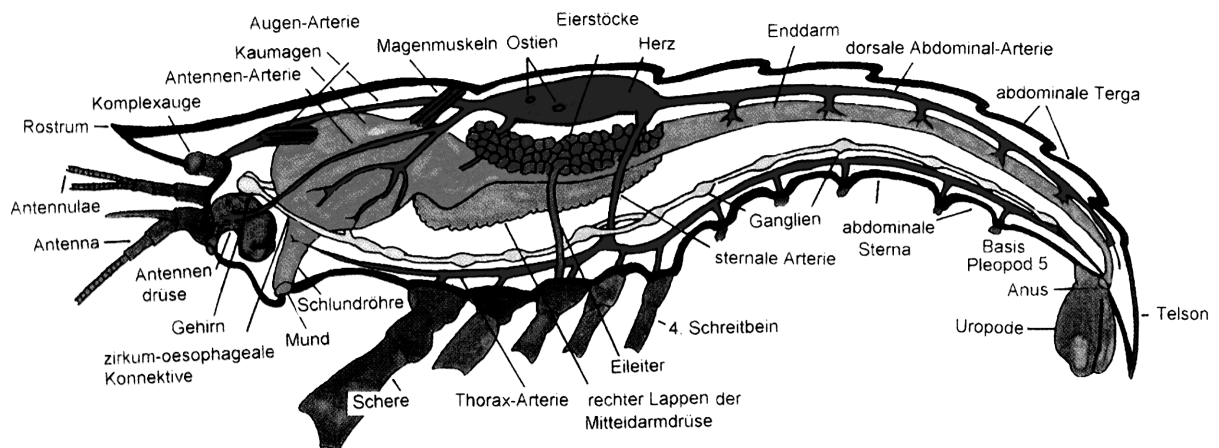


Abbildung 2: Medianer Längsschnitt durch einen weiblichen Flusskrebse zur Veranschaulichung der inneren Anatomie (nach EDER und HÖDL 1998)

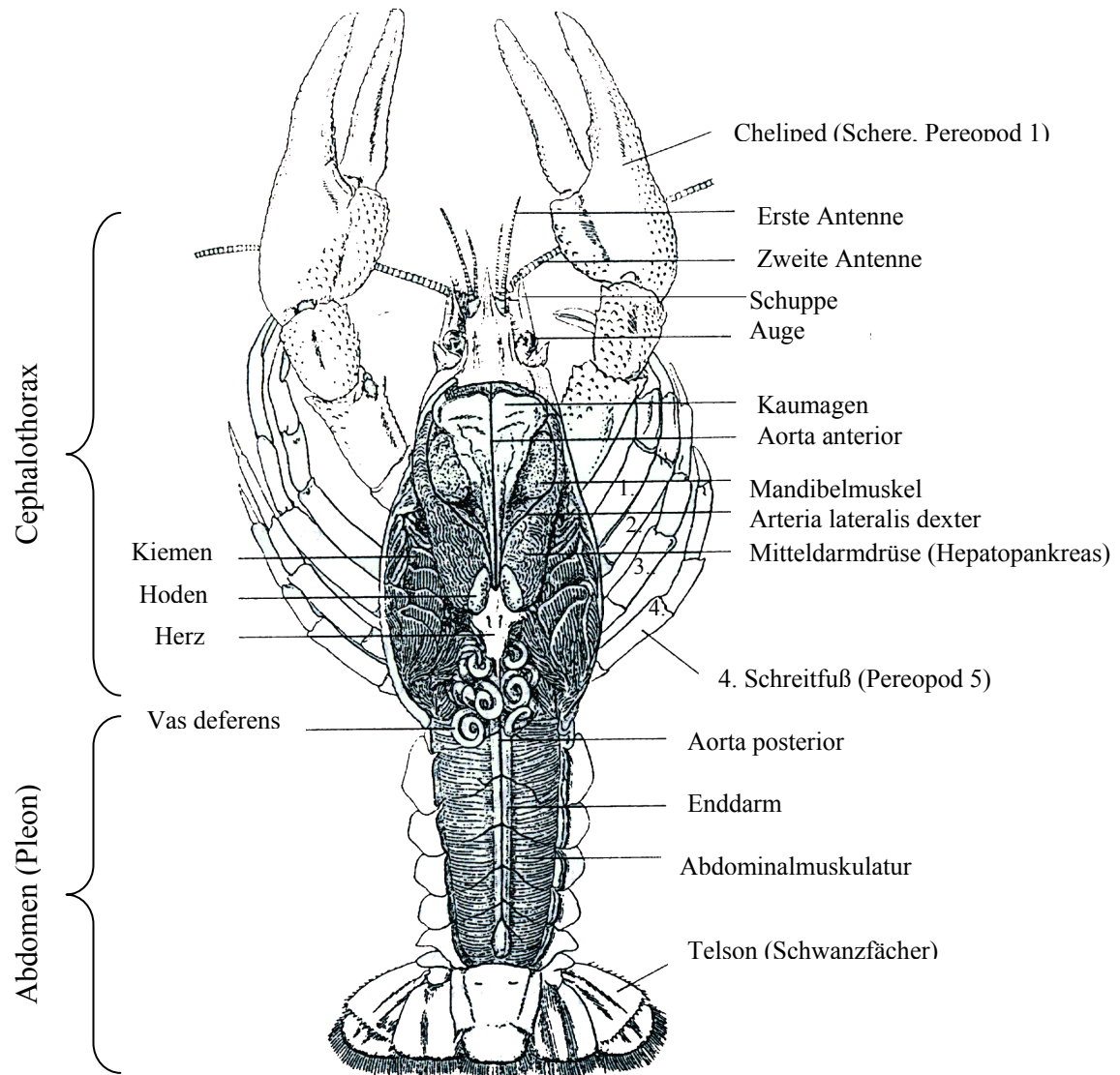


Abbildung 3: Schematische Darstellung der inneren Organe eines männlichen Flusskrebsses (Dorsalansicht, nach Entfernung des Panzers) (nach RENNER 1989, HOLDICH 2002) und der Unterteilung des Körpers

1.4 Abwehrmechanismen der Krebse gegen Pathogene (Immunologie)

Crustaceen besitzen effektive Abwehrmechanismen gegen eindringende obligat und fakultativ pathogene Organismen. Wie bei den Vertebraten kann auch bei den Krebsen im Wesentlichen zwischen einer humoralen und einer zellulären Immunantwort unterschieden werden, doch besteht ein großer Unterschied in dem Fehlen spezifischer Immunglobuline und somit dem Mangel einer erworbenen Immunität (SÖDERHÄLL et al. 1988, SMITH und CHISHOLM 1992, SÖDERHÄLL und CERENIUS 1992, SRITUNYALUCKSANA und SÖDERHÄLL 2000). Eine Übersicht über die Immunabwehr der Krebse gibt Tabelle 4.

Tabelle 4 : Möglichkeiten der Immunantwort von Krebsen (nach SÖDERHÄLL und CERENIUS 1999)

Humorale Abwehr	Zelluläre Abwehr
proPO-System	Phagozytose
Erkennungsproteine	Abkapselung
Proteinase Inhibitoren	Zytotoxizität
Chitinase Inhibitoren	
Antifungale Peptide	
Agglutinine	Hämozytenanzahl

Als erste sowohl mechanische als auch chemische Barriere dient die **harte Kutikula** zum äußeren Schutz (SÖDERHÄLL und CERENIUS 1992).

Die **Blutgerinnung** („clotting“) stellt einen weiteren wichtigen Prozess dar, der dem Verschluss von Wunden und der Verringerung des Hämolymphverlustes im offenen Kreislaufsystem der Krebse dient, sehr schnell und effizient abläuft und durch Koagulantien im Plasma herbeigeführt wird, ähnlich der Fibringerinnung der Vertebraten. Das bei Süßwasserkrebsen vorkommende Blutgerinnungssystem ist von einer Transglutaminase (TGase) abhängig. Bei dem Blutgerinnungsprotein (clotting protein, CP) der Krebse handelt es sich um ein VHDL (very high density lipoprotein)-Dimer, bestehend aus 210 kDa Untereinheiten, die jeweils freie Lysine und Glutamine enthalten, die durch TGasen kovalent aneinander gebunden werden, polymerisieren und in Anwesenheit von Ca^{2+} ein Koagulat bilden (SRITUNYALUCKSANA und SÖDERHÄLL 2000).

Desweiteren zählen zu dem nicht-zellulären Immunsystem **Agglutinine**, **Cytokine** und **mikrobizide Faktoren**, die bakteriostatisch und –lytisch, bakterizid, fungitoxisch, antiviral oder cytotoxisch wirken (SMITH und CHISHOLM 1992).

Die bei den Krebsen als Hämozyten bezeichneten Blutzellen übernehmen die zelluläre Immunabwehr und dienen außer der oben erwähnten Gerinnung der Hämolymphe und Wundheilung vor allem der Abkapselung von Fremdkörpern und der Phagozytose. Sie sind außerdem Träger des Prophenoloxidase(ProPO)-Aktivierungssystems. (SÖDERHÄLL und CERENIUS 1992, SRITUNYALUCKSANA und SÖDERHÄLL 2000). Es können drei verschiedene Blutzellarten bei Crustaceen isoliert werden: **hyaline**, **semigranuläre** und **granuläre Hämozyten** (SÖDERHÄLL und CERENIUS 1992, JOHANSSON et al. 2000). Das Verhältnis der verschiedenen Zellarten, insbesondere der Anteil der hyalinen Hämozyten, schwankt stark zwischen den einzelnen Krebsarten (SÖDERHÄLL und CERENIUS 1992). Die hyalinen Zellen sind frei von Granula und dienen in erster Linie der Phagozytose. Die semigranulären Hämozyten mit ihrer variierenden Anzahl kleiner Granula sind nur begrenzt zur Phagozytose fähig und dienen vor allem dem Erkennen und Abkapseln von Fremdkörpern. Sie sind Träger der Komponenten des inaktiven ProPO-Systems. Die granulären Zellen mit ihren vergleichsweise großen Granula dagegen sind nicht an Abkapselungsreaktionen oder der Phagozytose beteiligt, sondern fungieren bei Krebsen hauptsächlich als Vorratsspeicher für das ProPO-System, weisen aber auch eine cytotoxische Abwehr auf (SÖDERHÄLL et al. 1985, SÖDERHÄLL und CERENIUS 1992).

Das **ProPO-System** stellt eine Enzymkaskade dar, an deren Ende die Melaninsynthese im Krebsorganismus steht (SÖDERHÄLL et al. 1994, SÖDERHÄLL und CERENIUS 1998).

Wie bereits erwähnt, besitzen Invertebraten keine Immunglobuline. Stattdessen erkennen sogenannte PRPs (pattern recognition proteins) Signaturmoleküle an der Oberfläche von Eindringlingen (SRITUNYALUCKSANA und SÖDERHÄLL 2000). Zu diesen Erkennungsmolekülen gehören das β -1,3-Glukan-bindende Protein (BGBP) (SÖDERHÄLL et al. 1988, DUVIC und SÖDERHÄLL 1990, 1993), LPS (Lipopolysaccharid)-bindende Proteine (LPS-BP) (DIMOPOULOS et al. 1997) und Peptidoglykan-bindende Proteine (KANG et al. 1998). Das **β -1,3-Glukan-bindende Protein (BGBP)** ist ein HDL (high density lipoprotein) und ein 100 kDa Monomer (DUVIC und SÖDERHÄLL 1990). Es bildet einen Komplex (BGBP-L) mit β -1,3-Glukanen, die Bestandteile der Zellwände von Pilzen

sind. Dieser Komplex bindet sich wahrscheinlich spezifisch an die Hämozytenoberfläche und induziert die Verbreitung und teilweise Degranulation von granulären Hämozyten (SÖDERHÄLL 1981, DUVIC und SÖDERHÄLL 1992). Außerdem hat das BGBP die Funktion eines Opsonins, das durch Anlagerung an körperfremde Substanzen deren Elimination durch Phagozytose begünstigt. Von den **LPS-bindenden Proteinen (LPS-BP)**, auch GNBPs (gram negative bacterial binding proteins) genannt, sind bisher nur sechs bekannt. Vier davon wurden aus Insektenhämolymph isoliert, eines aus der Coelomflüssigkeit eines Wurmes und eines aus der Hämolymphe von *Pacifastacus leniusculus*. Sie zeigen eine Affinität zu Lipopolysacchariden (LPS), die in Zellwänden gramnegativer Bakterien vorkommen, und scheinen so an der Aktivierung des proPO-Systems bei den semigranulären Zellen beteiligt zu sein (SRITUNYALUCKSANA und SÖDERHÄLL 2000). Diese Aktivierung erfolgt durch eine Degranulation (regulierte Exocytose), die bei den granulären Hämozyten nicht durch Polysaccharide ausgelöst werden kann (JOHANSSON und SÖDERHÄLL 1985). Dort erfolgt sie durch endogene Krebsproteine, dem 76 kDa Faktor (Peroxinectin) und dem β -1,3-Glukan-bindenden Protein (BGBP) nach dessen Koppelung an ein β -1,3-Glukan. Dieser Komplex bindet wiederum an einen spezifischen Rezeptor auf den Hämozyten. Die Exocytose kann aber auch durch eine niedrige Kalziumkonzentration (< 5 mM) bewirkt werden (SÖDERHÄLL 1981, SÖDERHÄLL und HÄLL 1984, SÖDERHÄLL und CERENIUS 1992). Nach erfolgter Freisetzung des ProPO-Systems, die schon bei der Anwesenheit sehr geringer Mengen (pg/l) mikrobieller Zellwandkomponenten erfolgen kann, wird die **Prophenoloxidase** durch eine Serin-Protease (**Prophenoloxidase-aktivierendes Enzym, ppA**) in die aktive Form (**PO, Phenoloxidase**) überführt. Der genaue Mechanismus dieser Aktivierung ist noch nicht bekannt (SRITUNYALUCKSANA und SÖDERHÄLL 2000). Die Phenoloxidase katalysiert die *o*-Hydroxylierung von Monophenolen und die Oxidation von Phenolen zu Quinonen, konvertiert somit Tyrosin zu DOPA, dieses wiederum zu DOPA-Quinon, und führt nach weiteren Zwischenschritten zur Bildung von **Melanin** (SÖDERHÄLL und CERENIUS 1992, SRITUNYALUCKSANA und SÖDERHÄLL 2000). Während dieses Prozesses werden außerdem toxische Metaboliten synthetisiert, die fungistatisch wirken (SRITUNYALUCKSANA und SÖDERHÄLL 2000) und durch Hemmung extrazellulärer Proteinasen und Chitinasen die Ausbreitung und das Wachstum von Infektionserregern verhindern (SÖDERHÄLL und CERENIUS 1992).

Ebenfalls eng verknüpft mit dem proPO-System ist die Funktion des oben schon erwähnten **Peroxinectins**. Es handelt sich hierbei um einen 76 kDa Zelladhäsionsfaktor, der erstmals von JOHANSSON und SÖDERHÄLL (1988) aufgereinigt wurde. Peroxinectin wird in den Hämozyten hergestellt und in seiner inaktiven Form in den Granula der granulären Hämozyten gespeichert. Nach Aktivierung außerhalb der Zellen zeigt es folgende biologische Aktivitäten (SRITUNYALUCKSANA und SÖDERHÄLL 2000): (1) Zelladhäsion, (2) Degranulation, (3) Förderung der Abkapselung, (4) Wirkung als Opsonin und (5) Wirkung als Peroxidase.

Da eine unkontrollierte Aktivierung des ProPO-Systems schwerwiegende Folgen im Wirtsorganismus bis hin zum Tod verursachen könnte, unterliegt dessen Kontrolle gut funktionierenden Regulationsmechanismen (SÖDERHÄLL und CERENIUS 1999): (1) Das in Vesikeln gespeicherte ProPO-System kann nur durch spezifische Aktivierung freigesetzt werden, (2) nach unerwünschter Freisetzung können im Plasma vorhandene Proteinase-Inhibitoren durch Hemmung des ProPO-aktivierenden Enzyms (ppA) die Aktivierung des Systems verhindern und (3) einige aus Hämozyten freigesetzte Faktoren werden außerhalb der Zellen schnell wieder abgebaut.

Abbildung 4 zeigt eine Zusammenfassung der im Krebsorganismus stattfindenden Abwehrreaktionen nach Eindringen eines Infektionserregers, wie sie auch nach Infektion mit *Aphanomyces astaci* auftreten.

Die Effektivität des Immunsystems der Krebse kann stark durch Veränderungen der Umwelt (Temperatur, Licht, Futter, Verschmutzung, etc.) beeinflusst werden, da dies für die Tiere Stress bedeutet und zu Reduktionen der Hämozytenzahl, der ProPO-Aktivierung und Phagozytosereaktionen führen kann (SMITH und CHISHOLM 1992).

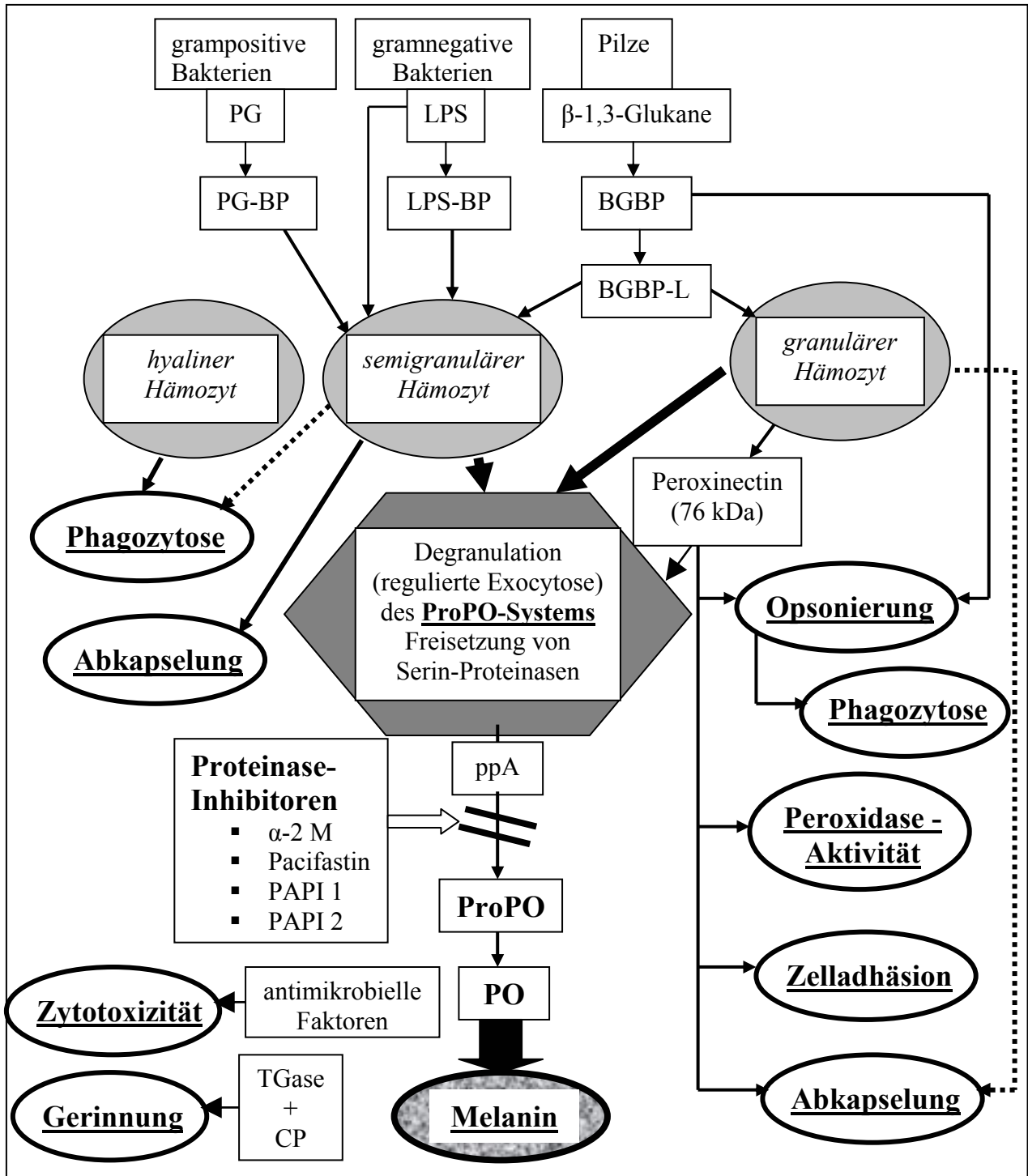


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Abwehrreaktionen der Crustaceen im Überblick

PG = Peptidoglykane, **PG-BP** = PG-bindendes Protein, **LPS** = Lipopolysaccharide, **LPS-BP** = LPS-bindendes Protein, **BGBP** = β -1,3-Glukan-bindendes Protein, **BGBP-L** = Komplex aus BGBP und β -1,3-Glukan, **ProPO** = Prophenoloxidase (inaktiv), **PO** = Phenoloxidase (aktiviert), **ppA** = ProPO-aktivierendes Enzym, **α -2 M** = α -2 Makroglobulin, **TGase** = Transglutaminase, **CP** = clotting protein; *gestrichelte Pfeillinie*: nur limitierte Funktion

1.5 Ursachen für die Gefährdung einheimischer Bestände

Die Gefährdung der autochthonen Krebsarten ist multifaktoriell bedingt. Zum einen spielen Gewässerverschmutzung und die Verbauung von Fließgewässern eine Rolle, doch durch das wachsende Bewusstsein über die Bedeutung des Gewässerschutzes hat sich die Situation in den letzten Jahren verbessert. Zum anderen kann sowohl ein zu hoher als auch zu niedriger Fischbesatz zu einer Bedrohung werden. Erhöhter Fraßdruck durch zu hohe Fischdichten als auch der Besatz mit natürlichen Feinden wie dem Aal, Barsch oder Döbel, sowie Nahrungsmangel durch eine zu hohe Populationsdichte der Krebse selbst kann die Individuenzahl langfristig vermindern. Aber auch Kannibalismus gegenüber den Jungtieren und interspezifische Aggressionen spielen eine Rolle. In diesem Zusammenhang neigen vor allem die in Europa eingebürgerten amerikanischen Signalkrebse dazu, einheimische Galizier- und Edelkrebse zu vertreiben. Auch hohe Dichten auftretender Galizierkrebse verdrängen Edelkrebse aus ihren ökologischen Nischen. Die größte Gefährdung für einen einheimischen Krebsbestand geht aber von einer durch *Aphanomyces astaci* verursachten Pilzerkrankung aus, die als Krebspest bezeichnet wird. Die europäischen Flusskrebse sind für diese schnell verlaufende und mit meist 100 %iger Mortalität einhergehenden Infektion hochempfindlich. Häufig findet eine Infektion über allochthone, amerikanische Krebsarten statt, die selbst gegen diesen Pilz widerstandsfähiger sind und ihn jahrelang in sich tragen können; sie sorgen als unerkannte Vektoren für die Verbreitung der Krebspest (HUNER 1994, HAGER 1996, ACKERFORS 2000, PEKNY und PÖKL 2000, HOLDICH 2001).

1.6 Gesetzliche Bestimmungen zum Schutz der einheimischen Bestände

In Deutschland gibt es eine Reihe von rechtlichen Bestimmungen, die dem Schutz der hier lebenden Krebspopulationen dienen sollen, und die zum einen den Schutz gefährdeter wildlebender Crustaceen und zum anderen ihre Nutzung durch Wirtschafts- und Freizeitfischerei betreffen.

Das **Bundesnaturschutzgesetz** (BNatSchG) und darauf basierend die **Bundesartenschutzverordnung** (BArtSchV) haben die Erhaltung und Pflege der Landschaft als natürliche Lebensräume (Biotopschutz) und die Aufrechterhaltung und Förderung des Artenreichtums der einheimischen Flora und Fauna (Artenschutz) zum Ziel. Allerdings stellt die Definition

von „einheimischen Arten“ im Bundesnaturschutzgesetz ein Problem dar, da nicht nur die ursprünglich einheimischen Arten wie *Astacus astacus* (Edelkrebs), *Austropotamobius torrentium* (Steinkrebs) und *Austropotamobius pallipes* (Dohlenkrebs) darunterfallen, sondern auch ursprünglich fremde Spezies wie *Astacus leptodactylus* (Galizierkrebs), *Orconectes limosus* (Kamberkrebs), *Pacifastacus leniusculus* (Signalkrebs) und *Procambarus clarkii* (Roter Amerikanischer Sumpfkrebs). Diese Arten werden durch das Verbot der Freilassung nicht-heimischer Krebse in die Natur nicht erfasst, da es ihnen über Generationen hinweg gelang, sich nach ihrer Freilassung selbst zu erhalten. Im Anhang 1 der Bundesartenschutzverordnung werden Edel- und Steinkrebs als „besonders geschützte“ Arten aufgeführt.

Als anwendbare Bestimmungen dienen die **Fischereigesetze** und Verordnungen der einzelnen Bundesländer der Erhaltung und erforderlichenfalls der Wiederherstellung eines gesunden Bestandes an Fischen, Krustentieren und Muscheln. Diese Eigenverantwortlichkeit der Länder für ihre Krebsbestände macht Sinn aufgrund der unterschiedlichen Lebensräume (klimatische Bedingungen, Wasserressourcen, etc.) und Verbreitung der Spezies. Ein allgemeines Verbot der Freilassung fremder Arten in die Natur haben sie alle, außer Bremen, gemeinsam (VON LUKOWICZ 1999). Im Gegensatz zum BNatSchG erachten die Fischereigesetze nur endemische Arten, nicht aber die eingeführten und heimisch gewordenen Spezies, als einheimisch und listen diese namentlich auf; desweiteren legen sie Schonzeiten und Mindestfangmaße im Rahmen der Fischerei für den Eigenverbrauch fest. In Bayern bedarf der Krebsbesatz in freie Gewässer unter Herkunftsangabe der Genehmigung der Kreisverwaltungsbehörde (Fischerei-Referat), die Freilassung nicht-einheimischer Arten ist prinzipiell verboten, während es bei *Astacus astacus* keine Beschränkungen gibt. Regulierungen bezüglich der Mindestfanglänge gibt es in Bayern nur für Edel- (12 cm) und Steinkrebs (10 cm) und Schonzeiten für deren weibliche Vertreter (01.10. bis 31.07.), wobei die nativen Krebsarten als bedroht angesehen werden (BOHL 1992).

Wie schon zuvor beschrieben stellt die größte Bedrohung der natürlichen Krebsbestände die Krebspest dar, die durch amerikanische Krebsarten übertragen wird und bei den europäischen Spezies meist mit 100 %iger Mortalität endet. Das BNatSchG kann durch seine Definition von „einheimischen Arten“ keinen ausreichenden Schutz von Edel-, Stein- und Dohlenkrebs gewährleisten; einzig die Fischereigesetze der Länder versuchen die Freilassung problematischer Krebsarten zu regulieren, doch können dadurch nicht die illegal in die Natur entlassenen und mit *Aphanomyces astaci* infizierten Individuen erfasst werden. Dies könnte

nur durch Überwachung des Importes fremder Spezies nach Deutschland erreicht werden, wofür die durch die Fischseuchenverordnung umgesetzte **EU Richtlinie 91/67/EWG** geeignet erscheint. Mit dieser Direktive könnten Programme zum Schutz vor der Krebspest (Anhang A, Spalte 1, Liste III) durchgesetzt werden, da sie die legale Möglichkeit bietet, bestimmte Gebiete zu krankheitsfreien Zonen zu erklären, in die dann nur Tiere aus ebenfalls anerkannten und so bescheinigten krankheitsfreien Regionen importiert werden dürfen, so dass ein Ausbreiten der Krebspest verhindert wird. Allerdings gibt es derzeit in der EU keine solche bestätigte „Krebspest-freie Zone“ (DEHUS et al. 1999). Hauptvoraussetzungen für solch eine Zone sind eine umfangreiche Kenntnis der dort lebenden auto- und allochthonen Krebspopulationen und ein umfangreiches Monitoring der Besitzverhältnisse in ganz Deutschland. Durch die Entwicklung geeigneter spezifischer und schneller Diagnosemethoden könnte erreicht werden, dass mit dem Einverständnis aller Bundesländer die Krebspest als meldepflichtige Krankheit in das Tierseuchengesetz aufgenommen wird. Erst wenn frühzeitig *Aphanomyces astaci* infizierte Tiere schon bei der Einfuhr erkannt werden können ist es möglich, die europäischen Süßwasserkrebse durch ein Importverbot zu schützen und eine Ausbreitung der Krebspest zu verhindern (DEHUS et al. 1999, VON LUKOWICZ 1999).

2. Zusammenfassung der geschichtlichen Entwicklung und Auswirkung der Krebspest

Die durch den Fadenpilz *Aphanomyces astaci* (SCHIKORA 1906) verursachte Krebspest wurde Ende des 19. Jahrhunderts wahrscheinlich durch amerikanische Flusskrebse aus Nordamerika nach Europa verschleppt. Sie trat dort erstmalig 1860 in Norditalien auf (NINNI 1865, HOFER 1906, ACKEFORS 1999) und verbreitete sich in Folge mit dem Speisekrebshandel über ganz Europa und erreichte Deutschland um 1870 (ALDERMAN 1996) (Abbildung 5). Als betroffene Länder vermehrt amerikanische Arten importierten, um die Nachfrage nach Krebsfleisch zu erfüllen, kam es durch die in die Natur gelangten fremden Krebsarten zu einer ernsten Bedrohung der einheimischen Arten (HOLDICH 1988, SÖDERHÄLL und CERENIUS 1992, KELLER 1997).

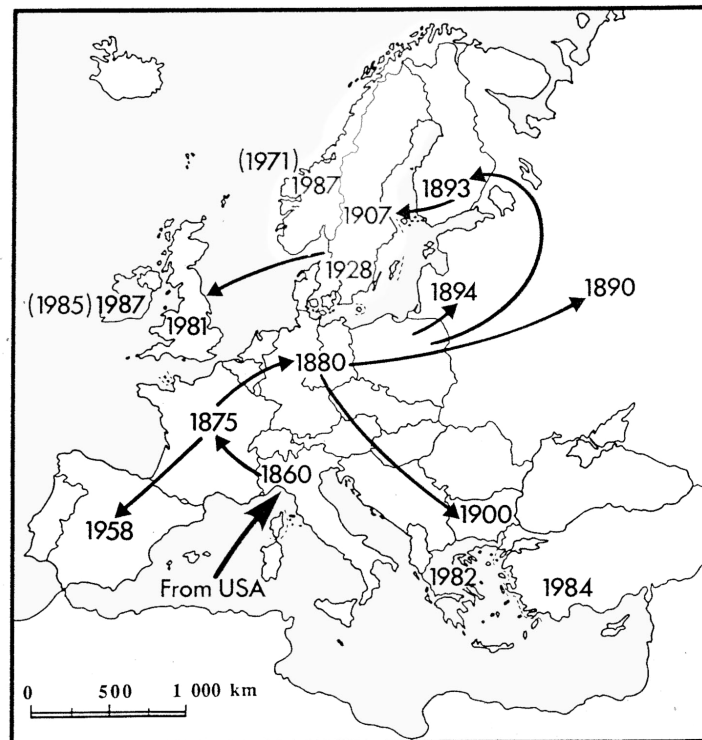


Abbildung 5: Die Ausbreitung des Krebspesterreger, *Aphanomyces astaci*, in Europa (nach ACKEFORS 1989)

Anfangs wurde der Erreger dieses massenartigen Krebssterbens für ein Bakterium, *Bacillus pestis astaci*, gehalten (HOFER 1898, 1900, 1906). Dem widersprach SCHIKORA (1903, 1906), der, wie schon 1884 HILGENDORF und MAGNUS aufgrund von Sporangien, einen Pilz der Gattung *Aphanomyces* als Ursache der Erkrankung sah und diesen *Aphanomyces astaci* nannte, was durch spätere Untersuchungen bestätigt wurde (SCHÄPERCLAUS 1928, 1935, NYBELIN 1936, RENNERFELT 1936, MANNSFELD 1942). NYBELIN gelang es 1934 als Erstem, diesen Pilz zu isolieren. Er wies dessen Verantwortlichkeit für die Krebspest anhand von Infektionsversuchen nach. RENNERFELT (1936) gab erste detaillierte Beschreibungen über die Physiologie des Pilzes und der Zoosporen und konnte als einziger sexuelle Stadien beobachten, die aber bisher unbestätigt blieben.

Beobachtungen über die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Krebspest reichen von 8 km stromaufwärts in zwei Jahren (ALDERMAN und POLGLASE 1988) bzw. 3 km in einem Jahr (WESTMAN und NYLUND 1979) bis zu 1,5 km stromaufwärts in einem Monat (HASTEIN und GLADHAUG 1972).

Überall wo die Krebspest ausbrach kam es zu großen ökologischen und wirtschaftlichen Verlusten, auf die ausführlich in Kapitel 1: „*Ökonomische und ökologische Bedeutung der Flusskrebse*“ eingegangen wurde, und auch heute noch ist die Bedrohung durch *Aphanomyces astaci* Schikora (Oomycetes, Saprolegniales) mit seinen verheerenden Folgen sowohl in der Natur als auch in Krebszuchten aktuell. Betroffene Länder in ganz Europa, darunter Deutschland, Schweden, England, Österreich und andere bemühen sich, einen Überblick über ihre Krebsbestände (Monitoring) und deren Entwicklung zu verschaffen und Managementpläne mit Regelungen zur Kontrolle der Krebspest und ihrer Ausbreitung zu entwickeln (ALDERMAN 1993, 1996, HOLDICH 2002).

3. Taxonomie und Morphologie der Oomyceten

3.1 Klassische Taxonomie

Die klassische Einteilung der Oomyceten in ein System beruht auf **morphologischen Kriterien**. Innerhalb diese Systems gehören sie dem Reich der **Pilze** (Fungi, Mycota) an, die in die Abteilung der Myxomycota (Schleimpilze) und die Abteilung der echten Pilze (**Eumycota**) eingeteilt werden. Die Letzteren umfassen die sogenannten Höheren Pilze und die **Niedereren Pilze** (Phycomyceten, Algenpilze), zu denen wiederum die Unterabteilungen der Zygomycotina und **Mastigomycotina** gehören, die durch einen schlauchförmigen und querwandlosen Thallus (Hyphen oder Sprosszellen) charakterisiert sind (GEDEK 1980). Die Mastigomycotina sind durch die Bildung von begeißelten Zoosporen an das aquatische Leben angepasst und können anhand deren Anzahl, Typ und Insertion unterschieden werden (WEBSTER 1980, FULLER und JAWORSKI 1987). Innerhalb der Klasse der Oomyceten (Wasserschimmel, Weißroste, falsche Mehлтаupilze) gehört der Krebspesterreger *Aphanomyces astaci* zu der Ordnung der **Saprolegniales** (Abbildung 6).

Die Oomyceten leben in der Regel im Wasser als Saprophyten oder Parasiten von Algen und niederen Wassertieren, allerdings zeigen einige schon eine Anpassung an das Landleben in Form einer Spezialisierung auf bestimmte Wirte, höhere Ansprüche gegenüber dem Nährsubstrat und der Entwicklung unbeweglicher Fortpflanzungszellen (Aplanosporen). Bekannt sind in diesem Zusammenhang vor allem die Peronosporales als Verursacher des

falschen Mehltaus der Weinreben und *Phytophthora infestans* als Erreger der Kraut- und Knollenfäule bei Kartoffeln (AINSWORTH et al. 1973, GEDEK 1980).

Besonders bedeutende Krankheitserreger bei aquatischen Tieren, die Läsionen und zum Teil sehr hohe Mortalitäten bei betroffenen Tieren verursachen, sind Vertreter der Gattungen Saprolegnia, Aphanomyces, Dictyuchus und Achlya (SEEGERT 1997, HOLDICH 2002).

UNTERABTEIL.: KLASSE: ORDNUNG: GATTUNG: ART:

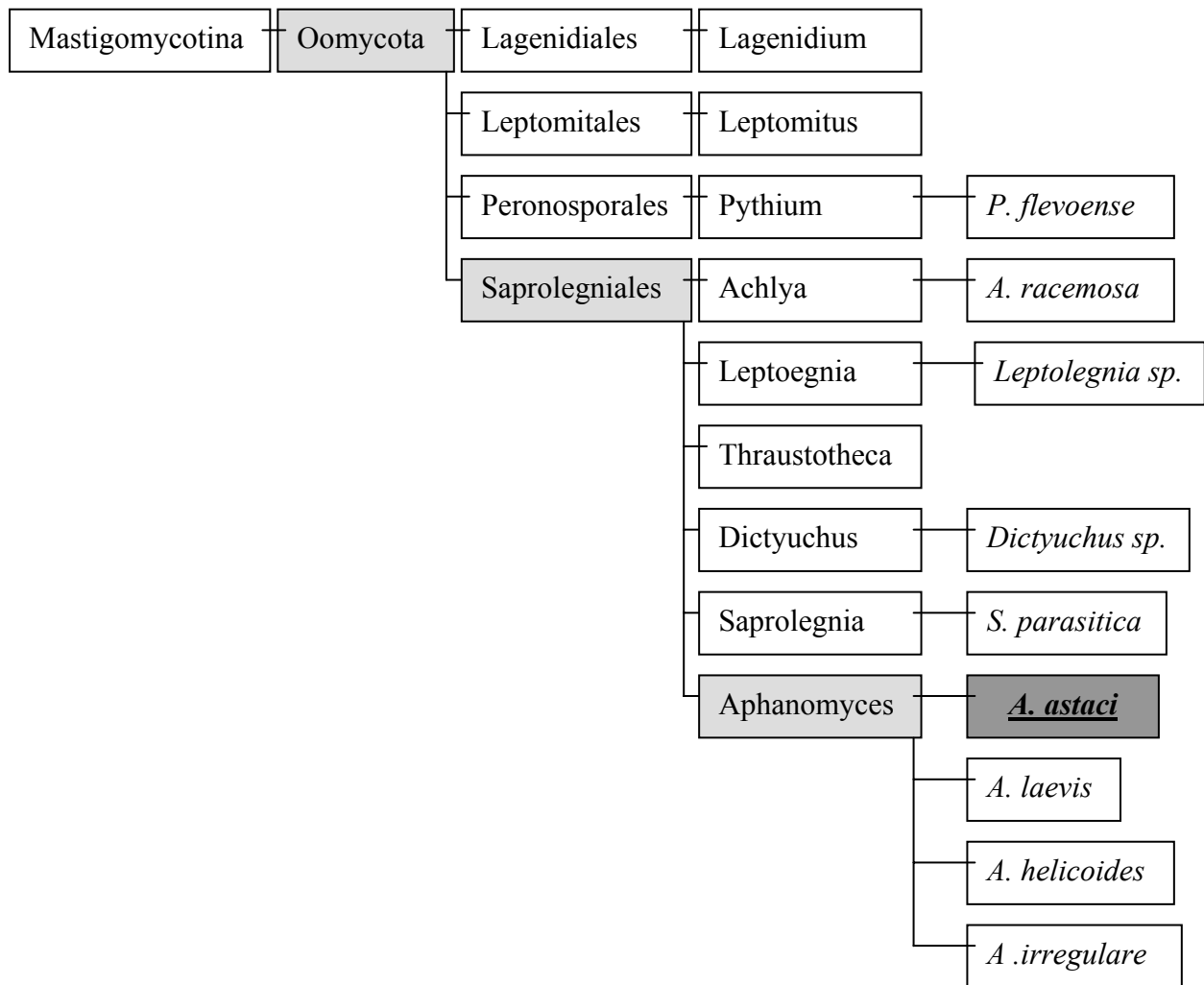


Abbildung 6: Klassisch-morphologische Einteilung der Oomycota als Niedere Pilze (Phycomycetes) in das System der Fungi (modifiziert nach AINSWORTH et al. 1973, GEDEK 1980) unter Nennung einiger für aquatische Tiere bedeutender Arten

Charakteristisch für die Oomyceten sind die in Oogonien (vielkernige kugelförmige weibliche Gametangien) gebildeten Oospheren (Eier), die sich nach Befruchtung (Oogamie) durch männliche Kerne aus Antheridien (männliche Gametangien) zu Oosporen mit einer zweischichtigen Wand entwickeln, denen die Oomyceten auch ihren Namen verdanken (WEBSTER 1980). Die vegetativen, asexuellen Vermehrungsstadien bestimmen in der Regel die Zugehörigkeit zu den einzelnen Gattungen, die Eigenschaften der Sexualstadien entscheiden über die Pilzart (SCOTT 1961, MÜLLER und LÖFFLER 1992). Obwohl *Aphanomyces astaci* zu dieser Klasse gehört, ist es charakteristisch für ihn, keine sexuellen Reproduktionsorgane zu bilden (ALDERMAN und POLGLASE 1986, CERENIUS et al. 1988, SÖDERHÄLL 1988, BARAN und SOYLU 1989).

3.2 Molekulargenetische Taxonomie

Das oben beschriebene Klassifikationssystem basiert hauptsächlich auf morphologischen Kriterien, im Rahmen dessen die Oomyceten aufgrund ihres fadenartigen Wachstums (Myzelbildung) und ihrer saprophytären Lebensweise zu den Pilzen gezählt werden. Unbestreitbar bleibt, dass die Gattung *Aphanomyces* zu den Oomyceten und innerhalb dieser zu der Ordnung der Saprolegniales gehört, doch hat eine Neuordnung der Oomycota innerhalb der Eukaryoten stattgefunden.

Als seit den 80er Jahren modernere phylogenetische Studien außer der Morphologie auch zellbiologische, biochemische und vor allem molekularbiologische Eigenschaften miteinschlossen, mussten ursprüngliche Einteilungen von Pilzarten neu überdacht werden (COOKE et al. 2000).

Das traditionelle Fünf-Reiche-Klassifikationssystem (WHITTAKER 1969, MARGULIS und SCHWARTZ 1988), das die Eukaryoten in vier Reiche (Protozoen, Pilze, Tiere und Pflanzen) unterteilt, zählte die Oomyceten noch zu den Pilzen mit Flagellen. Vielfach wurden Untersuchungen an Ascomyceten und Basidiomyceten als Model für biologische und genetische Eigenschaften der Oomyceten herangezogen, doch wie sich herausgestellt hat, zeigen Letztere nur wenig Verwandtschaft zu den sogenannten echten Pilzen, sondern bilden taxonomische Gruppierungen mit Vertretern der Protisten, insbesondere den Algen (KWOK et al. 1986, FÖRSTER et al. 1990a).

In den letzten Jahren wurde immer deutlicher, dass ein Klassifikationssystem mit nur fünf Reichen zu vereinfacht und inadäquat ist, der Vielfältigkeit von Organismen auf der Erde gerecht zu werden (LEEDALE 1974, LIPCOMB 1985). Die bis dato einzelnen Stämme der **Protista** sind so unterschiedlich, dass sie eher als eigene Reiche beschrieben werden sollten (HASETON 2000). CORLISS (1990) diskutierte die Problematik einer einheitlichen Nomenklaturfindung und der Einordnung der einzelnen Protisten in Stämme und Klassen, die darin besteht, dass sich die Vertreter der Protista durch ihre „Nicht-Zugehörigkeit“ zu einer der anderen Reiche definieren und Organismen umfassen, die zu den Mini-Tieren, Mini-Pflanzen und Mini-Pilzen mit den entsprechenden Namen der *International Codes of Nomenclature* gehören. Für den Autor ist es dabei aber undenkbar, zu der konservativen Einteilung in nur wenige Taxa zurückzukehren. Eine eindeutige Systematik ist noch in der Entwicklung und Wissenschaftler sind sich derzeit noch uneinig wie viele Reiche (vier bis 16) oder Stämme (12 bis 45) innerhalb der Eukaryota es überhaupt geben sollte (CORLISS 1990).

Sequenzanalysen der für die ribosomale RNA kodierenden DNA (vor allem der kleinen Untereinheit, small subunit, SSU) eignen sich besonders, um Informationen über die Entwicklung eukaryotischer Abstammungslinien (Lineage) zu erhalten (SOGIN 1989). Solche Untersuchungen zeigten, dass die pilzartigen Oomyceten nahe verwandt sind mit den auch als Heterokonten oder Chrysophytes bezeichneten Algen (LEIPE et al. 1994). PATTERSON (1989) benannte diese Gruppe von Protisten anhand zytologischer Eigenschaften **Stramenopiles**. Auch wurden in der Literatur Termini wie **Heterokonta** und **Chromobionta** verwendet, doch standen diese für eingegrenzte Untergruppierungen. Heute hat man sich auf die Bezeichnung **Chromista** (CAVALIER-SMITH 1986, HAWKSWORTH et al. 1995, WAGGONER und SPEER 1999) geeinigt. Diese scheinen sich evolutionär unabhängig von den Pflanzen, Tieren und Pilzen von einem gemeinsamen Vorfahren entwickelt zu haben, aber es ist immer noch ungeklärt, wie ihre einzelnen Taxa untereinander verwandt sind (WAGGONER und SPEER 1999, PATTERSON und SOGIN 2000).

Die charakteristischen Merkmale der Chromisten sind ihre tubulären Härchen (Mastigonemes), die sich an nur einer ihrer zwei Flagellen befinden. Beide Flagellen sind an einer gemeinsamen Seite der Zelle befestigt. Bei den multizellulären Chromisten, wie den Oomyceten, ist diese Eigenheit bei ihren Zoosporen zu finden. Viele Chromista sind zur Photosynthese fähig und besitzen eine besondere Form des Chlorophylls (Chlorophyll c) und

typischerweise ist ihr Kern und Chloroplast, der einen lichtsensitiven Augenpunkt (Stigma) enthält, von einer gemeinsamen Membran umgeben. Diese Eigenheit fehlt den Oomycota, die keine Pigmentation (**Achromische Chromista**) besitzen. Abbildung 7 stellt einen einfachen, zur Photosynthese fähigen, Chromisten dar. Ein weiterer Unterschied zu den Pilzen besteht darin, dass sich die Zellwand nicht aus Chitin, sondern aus zelluloseartigen Bestandteilen und Glykanen zusammensetzt. Die Kerne in den Filamenten sind diploid, und nicht wie bei den Fungi haploid. Außerdem besitzen die Chromista ein Energiespeichermolekül, das bei den Oomyceten als Mycolaminarin bezeichnet wird (WAGGONER und SPEER 1999).

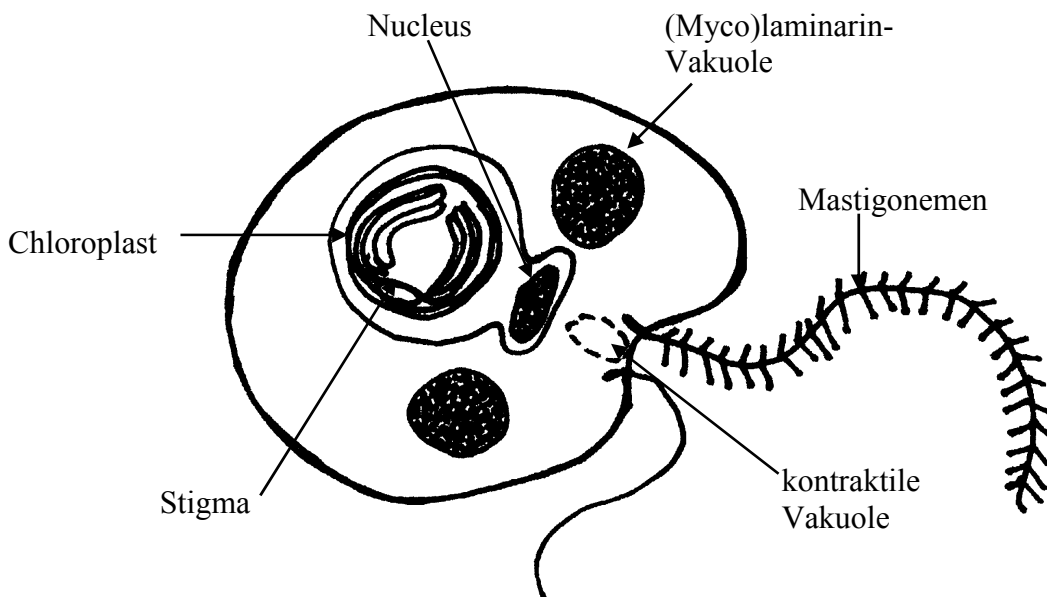


Abbildung 7: Vereinfachte Darstellung eines Chromisten (WAGGONER und SPEER 1999)

Derzeit sind etwa 60 Abstammungslinien (Lineages) innerhalb der Eukaryoten identifiziert (PATTERSON und SOGIN 2000). Weiterführende Studien im Bereich der DNA-Sequenz-Distanzanalysen werden den Aufbau derzeit konstruierter phylogenetischer Bäume in Zukunft sicher noch ändern. VAN DE PEER et al. (1996, 1997) verglichen 550 SSU rDNA-Sequenzen und konstruierten einen Evolutionsbaum, der dem von LIPCOMB et al. (1998) ähnelt. In diesem werden die Pflanzen, Pilze, Tiere und Alveolata zu der sogenannten „Krone der Eukaryoten“ („crown taxa“) zusammengefasst (WAGGONER und SPEER 1999, LIPCOMB et al. 1998). Abbildung 8 zeigt eine Übersicht der dort dargestellten eukaryotischen Hauptgruppen und die Einordnung von *Aphanomyces astaci* in die zum Teil als

Klasse angesehenen, heute meist als Stamm deklarierten, Oomyceten. Die Unterteilung der Oomycota wurde dem *Taxonomy Browser* der *NCBI Genbank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) entnommen. Auf eine Zuordnung zu bestimmten Klassen, Unterklassen und Familien wurde hier bewusst verzichtet, da keine aktuelle einheitliche Klassifikation existiert und zum Teil heutige Gattungen ursprünglich als Familien bezeichnet wurden und manche Taxa nur provisorisch bestimmten Familien zugeordnet sind (DICK 1990). Im Allgemeinen werden die Saprolegniomycetidae (als Klasse oder Unterklasse bezeichnet) als übergeordnete Gruppe der Ordnung Saprolegniales gesehen, die wiederum nur eine Familie, die Saprolegniaceae, beinhaltet. Die exakte Lineage wurde in der Abbildung 8 ausschließlich für *Aphanomyces astaci* angegeben und auf eine Nennung der anderen Gattungen und Arten verzichtet. Auf phylogenetische Untersuchungen und Verwandtschaftsgrade innerhalb der Oomyceten wird in Kapitel 10: „Übersicht über das Genom der Oomycota“ näher eingegangen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Oomycota, auf der Morphologie von Sporangien und Gametangien basierend, auch heute noch oft zu dem Reich der Pilze gezählt werden. Aktuelle molekulargenetische Untersuchungen zeigen allerdings ihre enge phylogenetische Verwandtschaft zu den Algen und ordnen sie dem Reich der Protista zu. In neuerer Zeit zeichnet sich eine starke Tendenz zu einem Viel-Reiche-System der Eukaryoten ab, da ein System, das Organismen in nur vier oder fünf Reiche einteilen möchte, zu einfach ist, um eine realistische Beschreibung der Vielfältigkeit der Lebensformen zu geben. Dabei werden die Protista zum Teil als eigenes Reich (CAVALIER-SMITH 1981) oder von anderen Autoren (LEEDALE 1974) nicht als taxonomische Einheit sondern einfach als übergeordnete Organisationsstufe angesehen. Nach neuester Nomenklatur gehören die Oomycota zu den Chromista (Stramenopiles). Derzeit gibt es keine allgemeingültige Auflösung der eukaryotischen Organismen auf Klassen-, Stammes- und Reichsebene und solange weitere Untersuchungen der Taxa auf molekularer Basis stattfinden, wird es immer wieder neue Klassifikationsvorschläge geben.

REICH: STAMM: ORDNUNG: GATTUNG: ART:

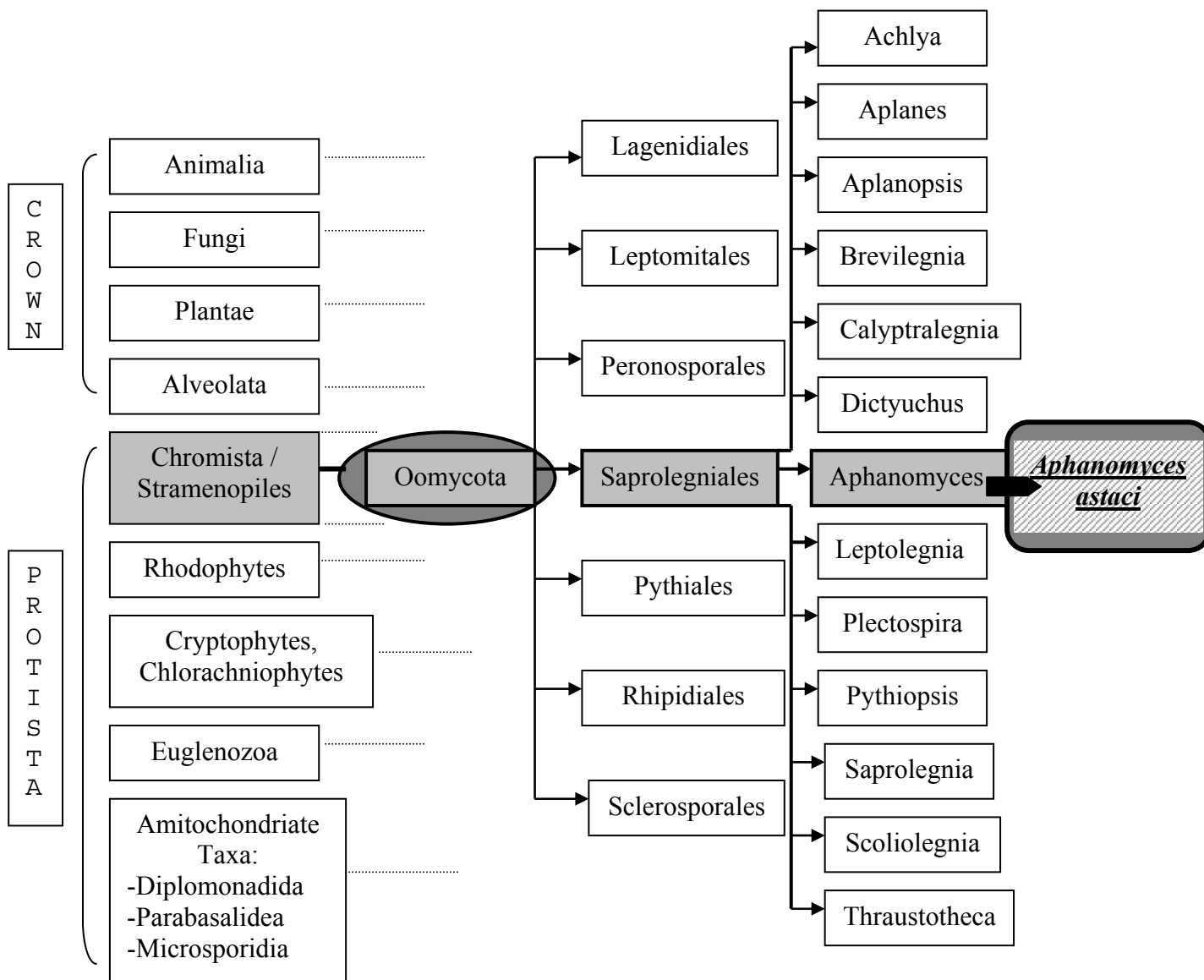


Abbildung 8: Zusammenfassende Darstellung der derzeit gültigen Systematik der Oomyceten und der taxonomischen Stellung von *Aphanomyces astaci* innerhalb dieses Systems basierend auf molekulargenetischen Kriterien

4. Ätiologie und Pathogenese

Wie bereits erwähnt, ist der Erreger der Krebspest (Aphanomykose der Krebse, Aphanomyces-Pest, Crayfish Plague Fungus) der Fadenpilz *Aphanomyces astaci* SCHIKORA (1906), zugehörig den heute taxonomisch nicht mehr als Pilze betrachteten Oomycota. Bei der Krebspest handelt es sich um eine hochinfektiöse, in der Regel akut verlaufende und mit 100 %iger Mortalität der empfänglichen europäischen Flusskrebse einhergehende Erkrankung (UNESTAM 1972, ALDERMAN et al. 1987, MATTHEWS und REYNOLDS 1990, SCHÄPERCLAUS 1991, OIDTMANN und HOFFMANN 1998).

4.1 Morphologie und Physiologie des Erregers

Die vegetativen Hyphen von *Aphanomyces astaci* sind unseptiert, an ihren Enden stumpf abgerundet und haben einen Durchmesser von (5)7 bis 9(10) µm. Jüngere Hyphen sind grobkörnig und hyalin, während ältere weitgehend vakuolisiert erscheinen (RENNERFELT 1936, ALDERMAN und POLGLASE 1986). Zur Zoosporenbildung kommt es in der Natur bei aus der Kutikula ausgewachsenen Hyphen von infizierten Krebsen und *in vitro* durch Überführen des Mycels aus Anzuchtmedium in Wasser (UNESTAM 1966a). Pro Zoosporangium werden wenige (8 bis 15), selten bis zu 40, Primärsporen gebildet, die 16 bis 25 x 8 µm groß sind und sich am Sporangiumende zu einem für die Gattung *Aphanomyces* typischen **Sporenball** (spore ball) formieren. Dort erfolgt eine Enzystierung innerhalb von 20 Minuten durch Abrundung und Bildung einer alkalifesten Zystenwand (CERENIUS und SÖDERHÄLL 1985), die durch eine Änderung des Brechungsindex erkennbar ist. Die enzystierten kugelförmigen Primärsporen weisen einen Durchmesser von (8)9 bis 11(15) µm auf und verbleiben so 8 bis 12 Stunden. Durch eine Pore an einer Zystenpapille werden nierenförmige, durch zwei Flagellen motile, 8 bis 12 µm große Sekundärsporen entlassen, die ihren Wirt aufsuchen. Die Bewegungsfähigkeit der Sekundärsporen entwickelt sich innerhalb von 5 bis 20 Minuten nach Abgabe und dauert bei Temperaturen von 16 bis 20°C ohne vorzeitig induzierte Enzystierung mindestens 48 Stunden an (ALDERMAN und POLGLASE 1986). SCHMID (1998) bietet eine ausführliche Beschreibung der Eigenschaften von *Aphanomyces astaci* und differentialdiagnostisch wichtigen Erregern, während KLÄRDING (2001) ultrastrukturelle Untersuchungen zum Erreger durchführte.

4.2 Infektion

Eine Übersicht über den Entwicklungs- und Infektionszyklus von *Aphanomyces astaci* gibt Abbildung 9.

Die infektiöse Einheit der Krebspest ist die biflagellate **Zoospore**. Untersuchungen bezüglich des asexuellen Entwicklungszyklus von *Aphanomyces astaci*, bei dem bisher, außer von RENNERFELT (1936), keine sexuellen Stadien nachgewiesen werden konnten, wurden *in vitro* durchgeführt (CERENIUS und SÖDERHÄLL 1984b, SÖDERHÄLL und CERENIUS 1987). CERENIUS und SÖDERHÄLL (1984a) zeigten, dass die Anwesenheit von Calcium-Ionen notwendig ist, um die Entwicklung und Freisetzung motiler Sporen zu gewährleisten, Mg^{2+} diese aber hemmen kann. So ist der Erreger nicht fähig, bei Teichwasser mit 25 mM $MgCl_2$ Zoosporen freizusetzen (RANTAMÄKI et al. 1992), obwohl ein Hyphenwachstum in der Kutikula stattfindet. Die Zoosporen erreichen ihren Wirt schwimmend und zeigen diesem gegenüber eine wenig spezifische Chemotaxis, insbesondere gegenüber Krebshämolymph und den Schreitbeinen (UNESTAM 1969a, CERENIUS und SÖDERHÄLL 1984b). Treffen sie auf Kutikula, enzystieren sie sich und bilden innerhalb einer Stunde einen sogenannten **Keimschlauch** (penetration peg). Die Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration im Wasser von 1 mM auf 50 mM bewirkt eine synchrone Enzystierung der Zoosporen (CERENIUS und SÖDERHÄLL 1984a, PERSSON und SÖDERHÄLL 1986) und kann Sporen, die aufgrund zu starker Erschütterung enzystierten, zur Keimung (Germination) bringen. Besonders Wunden in der Kutikula scheinen durch austretende Hämolymph ein geeignetes Milieu für die Keimung der Zoosporen zu bieten (SVENSSON und UNESTAM 1975, UNESTAM 1981). Die Ultrastruktur der Zoosporen und Zyste wurde von OLSON et al. (1984), CERENIUS et al. (1984b), NYHLÉN und UNESTAM (1978) untersucht. Der Keimschlauch ist eine Hyphe mit engem Durchmesser, die die äußere Epikutikula zunächst mechanisch durchdringt. Dies geschieht meist an der weichen Kutikula an der Unterseite des Krebschwanzes, Gelenken, Körperöffnungen und Wunden. Auch Proteinase und Chitinase sind an dem Durchdringen der Kutikula beteiligt, die aus einer Lipidschicht, innerhalb der die Hauptbestandteile Chitin und Proteine sind, besteht (UNESTAM 1966b, UNESTAM und WEISS 1970, NYHLÉN und UNESTAM 1975, SÖDERHÄLL und UNESTAM 1975, SÖDERHÄLL et al. 1978, NYHLÉN und UNESTAM 1980, PERSSON et al. 1984, PERSSON und SÖDERHÄLL 1986). Im weiteren Verlauf der Infektion dringt der Parasit auch in die Leibeshöhle ein, verbreitet sich entlang des Strickleiternervensystems und

penetriert die Epikutikula von innen (UNESTAM und WEISS 1970). Zoosporen werden dann gebildet, wenn *Aphanomyces astaci* einen neuen Wirt benötigt, da der Frühere sich gehäutet hat oder tot ist. Außerhalb des Krebses sind diese nur wenige Tage, drei bis fünf (RENNERFELT 1936) bzw. sechs bis neun (MATTHEWS und REYNOLDS 1990), überlebensfähig (UNESTAM 1969b, OIDTMANN und HOFFMANN 1998). Findet die Zoospore keinen Wirt oder trifft beispielsweise auf ein Insekt, so bildet sich zwar eine Zyste, doch kann diese nicht keimen, da das entsprechende Signal fehlt. Nach einigen Stunden entwickelt sich aus der Zyste wieder eine Zoospore, die wiederum einen Krebs sucht. Dieser Vorgang der Enzystierung kann sich mindestens dreimal (**repeated zoospore emergence**) wiederholen und verlängert die Überlebenszeit der Sporen außerhalb des Wirtes auf zwei Wochen (UNESTAM 1969a, CERENIUS und SÖDERHÄLL 1984a, CERENIUS und SÖDERHÄLL 1985). Die wiederholte Entwicklung von motilen Zoosporen, die asexuelle Vermehrung, die Lokalisation des Zoosporenangriffs an leichter zu durchdringenden Körperstellen und die auch nach Eindringen in die Kutikula andauernde Chitinase-Produktion stellen eine Anpassung an die parasitische Lebensweise von *Aphanomyces astaci* dar (SÖDERHÄLL und CERENIUS 1999).

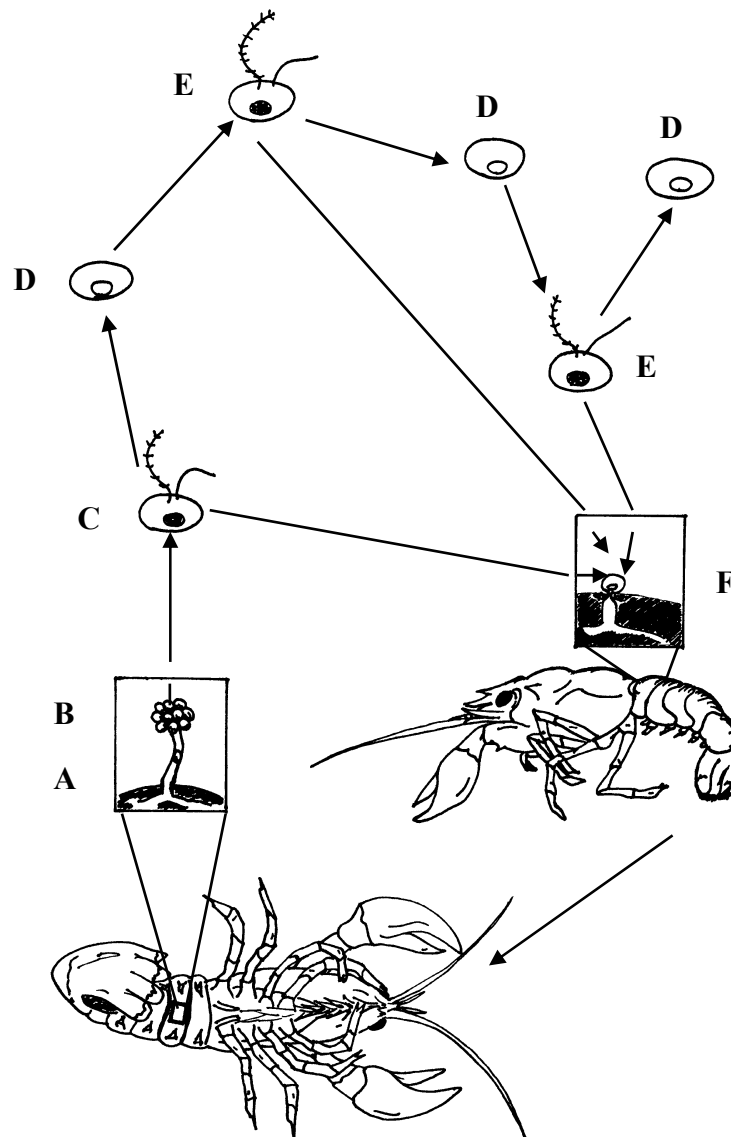


Abbildung 9: Der Entwicklungszyklus des Krebspsterregers *Aphanomyces astaci*

A: nach Tod oder Häutung des Krebses Auswachsen der Hyphen aus der Kutikula; **B:** durch Nährstoffmangel im Wasser Induktion der Sporulation und Ausbildung eines typischen Sporenballs (spore ball) und Enzystierung zu Primärsporenzysten; **C:** Abgabe von biflagellären Sekundärsporen, die mittels wenig spezifischer Chemotaxis einen neuen Wirt suchen; **D:** Enzystierung der Zoospore wenn kein Krebs gefunden wird; **E:** Ausbildung eines neuen Sekundärsporenstadiums (repeated zoospore emergence); **F:** bei Auffinden eines Krebses Anheftung der Zoospore an das Exoskelett, Abwurf der Flagellen, Enzystierung und Ausbildung eines Keimschlauches (penetration peg), durch den sich das Mycel im Wirtsorganismus ausbreitet.

5. Wirtsspektrum und Empfänglichkeit

Sobald der Erreger in den Wirtsorganismus eingedrungen ist, muss er sich mit dem Immunsystem (siehe auch Kapitel 1.4: „Abwehrmechanismen der Krebse gegen Pathogene“) des befallenen Krebses auseinandersetzen. Dabei ist die Empfänglichkeit verschiedener Krebsarten gegenüber *Aphanomyces astaci* unterschiedlich. Die in Europa, Australien und Ostasien einheimischen Krebse sind hoch empfänglich, während die nordamerikanischen Cambaridae und Parastacidae wenig empfindlich sind (siehe auch Kapitel 1.2: „Systematik und Verbreitung von Süßwasserkrebsen“) (UNESTAM 1969c, UNESTAM und WEISS 1970, UNESTAM 1972, 1975). Vermutet wird, dass sich Krebs und Parasit im Laufe der Evolution in Nordamerika aneinander anpassen konnten, und so der Krebs dort zwar befallen, aber in der Regel nicht ernsthaft geschädigt wird (UNESTAM 1969a). Im Unterschied zu den empfänglichen Arten, bei denen das Mycelwachstum ungebremst verläuft, gibt es bei den amerikanischen Krebsen Enzyme in der Kutikula, die die Enzyme von *Aphanomyces astaci* angreifen, sein Eindringen so auf die äußere Hautschicht beschränken und eine Ausbreitung des Erregers verlangsamen. Damit hat das Immunsystem des amerikanischen Krebses genug Zeit, Abwehrreaktionen in Gang zu setzen und die zuvor schon beschriebene Kaskade (II.1.4) auszulösen, an deren Ende das schwarzbraune Pigment Melanin entsteht, das um die Hyphen herum abgelagert wird und ein weiteres Wachstum verhindert. Dabei wird der Erreger in der Regel aber nicht abgetötet und kann nach Häutung des Tieres wieder ins Wasser gelangen, um so erneut Tiere zu infizieren (CERENIUS et al. 1984a, OIDTMANN und HOFFMANN 1998). Es wird davon ausgegangen, dass *Aphanomyces astaci* ursprünglich auf nordamerikanische Spezies als Wirt beschränkt war, denen es gelang eine natürliche Resistenz, die den Krebsen anderer Kontinente fehlt, auszubilden. Sie tragen somit die Infektion in der Regel nur chronisch oder latent in sich (SÖDERHÄLL et al. 1988). Wird aber beispielsweise *Pacifastacus leniusculus* Stress ausgesetzt, wie durch die experimentelle Verringerung der Anzahl der zirkulierenden Blutzellen durch β -1,3-Glukan- oder Zymosan-Injektion, so kann auch er der Infektion mit *Aphanomyces astaci* erliegen (SÖDERHÄLL et al. 1988). Im Gegensatz zu JÄRVENPÄÄ et al. (1987), die keine signifikanten Veränderungen in der Hämolymphe bei infizierten Krebsen feststellen konnten, zeigten SÖDERHÄLL und CERENIUS (1992), dass die Hämozyten durch eine Krebspestinfektion beeinflusst werden. Sie maßen die Fähigkeit der Blutzellen, in nicht-aktiviertem Zustand einen spezifischen Liganden (Fluorescein-Isothiocyanat markiert mit Concanavalin A, FITC

Con A) zu binden. Dabei stellten sie fest, dass bei einem latent mit Krebspest infiziertem Signalkrebs etwa 90 % der Hämocyten aktiviert waren, im Gegensatz zu 10 % bei einem gesunden Krebs. Diese Aktivierung konnte auch bei Infektion mit einem anderen Krebs-Parasiten, *Psorospermium haeckeli*, beobachtet werden (CERENIUS et al. 1991). Weitere Untersuchungen in diesem Zusammenhang finden derzeit statt (SUKRAKANCHANA, unveröffentlicht).

Die Häutung und anderer Stress können das Immunsystem auch amerikanischer Krebse zum Erliegen bringen und das ausgewogene Parasit-Wirt-Gleichgewicht zerstören. Nach der Häutung können diese dann durch Sporenabgabe in das Wasser als Vektoren der Krebspest fungieren und empfängliche einheimische Arten bedrohen (SÖDERHÄLL et al. 1988, ALDERMAN et al. 1990, DIÉGUEZ-URIBEONDO und SÖDERHÄLL 1993, ALDERMAN 1996, DIÉGUEZ-URIBEONDO et al. 1995, KELLER 1997). Bei den empfänglichen Krebsarten ist der Krebspesterreger nicht auf die Kutikula beschränkt, sondern dringt in das Hämocoel ein und befällt nahezu alle Gewebe, besonders die Muskulatur, das Nervensystem und bei Eindringen über die Augen den Kopfbereich (OIDTMANN et al. 1997, KLÄRDING 2001).

Der Verlauf eines Krebspestausbruches steht in engem Zusammenhang mit der Jahreszeit, der Wassertemperatur, der Sporenkonzentration, der Populationsdichte und Anzahl der infizierten Tiere, sowie der Gewässerstruktur und der chemischen Wasserqualität (OIDTMANN und HOFFMANN 1998).

6. Symptomatologie und Pathologie bei empfänglichen Spezies

6.1 Klinische Symptome

Nach der Exposition der Krebse mit Zoosporen folgt eine Inkubationsperiode, in der das Verhalten der Tiere normal ist. In Folge kommt es frühestens nach einem Tag, oft erst nach zehn Tagen, zu Verhaltenstörungen und schließlich dem Tod des Tieres. Der Zeitraum, in dem dies geschieht, ist abhängig von der Infektionsdosis und der Umgebungstemperatur (SCHÄPERCLAUS 1935, ALDERMAN et al. 1987).

MATTHEWS und REYNOLDS (1990) unterscheiden sieben Phasen im Verlauf einer Krebspest-Erkrankung: (1) gesunde Tiere, (2) lethargische Tiere, (3) schwache Tiere, (4) torkelnde Tiere, (5) erschöpfte Tiere, (6) naher Tod und (7) Tod. Die Symptome dieser Stadien wurden auch von anderen Autoren beobachtet. Anfänglich erscheinen die Tiere völlig gesund. Sie sind nachtaktiv, zeigen einen ungestörten Fluchtreflex bei Störungen, drohen bei Gefahr mit den Scheren und können sich, wenn sie auf den Rücken gedreht werden, innerhalb von Sekunden wieder aufrichten. Mit der Zeit werden die Krebse lethargisch und die zuvor beschriebenen Vorgänge verlaufen wesentlich langsamer bis sie ganz schwach werden, die Tiere sich nur nach Anschubsen mühsam bewegen und auch bei Tageslicht außerhalb ihres Unterschlupfes zu finden sind (NYBELIN 1936, MANNSFELD 1942, ALDERMAN et al. 1984, ALDERMAN und POLGLASE 1988, HALDER 1989). Sie zeigen Anzeichen einer schlaffen Lähmung, die Extremitäten hängen beim Hochheben des Krebses schlaff herunter (SCHÄPERCLAUS 1935, DAHLE 1982) und der Fluchtreflex ist nicht mehr auslösbar (UNESTAM und WEISS 1970, ALDERMAN et al. 1984, HALDER et al. 1989). Im Endstadium der Krebspest können sich die Flusskrebse kaum mehr gerade fortbewegen, fallen andauernd um und haben ihre Balance verloren. Dies hängt zum Teil mit dem Verlust einzelner bis mehrerer Gliedmaßen zusammen (BARAN und SOYLU 1989, HALDER et al. 1989, OIDTMANN et al. 1996). Desweiteren zeigen die Tiere einen starken Juckreiz, der durch ausgeprägte Kratzbewegungen an den Gliedmaßen, den Augen und dem Telson zu erkennen ist (JÄRVENPÄÄ 1987). Schließlich sind die Krebse so erschöpft, dass auch diese Kneifbewegungen kaum mehr auftreten und sie fast regungslos auf dem Rücken oder einer Seite liegen. Die zum Teil vorkommenden klonischen Krämpfe werden auf Sekundärinfektionen zurückgeführt (MANNSFELD 1942, SCHÄPERCLAUS 1991). Kurz vor dem Tod sind die Tiere extrem schwach und reagieren selbst auf deutliche Reize von außen nicht mehr. Die anscheinend toten Krebse weisen aber immer noch eine Herzaktivität auf (BARAN und SOYLU 1989). Vereinzelt kann an lebenden Tieren ein watteähnlicher Belag an der weichen Kutikula des Abdomens oder der Gelenke, sowie den Augen beobachtet werden (OIDTMANN et al. 1996).

In der Regel führt die Krebspest bei empfänglichen Krebsarten zu einer 100 %igen Mortalität (UNESTAM 1969c), und ihre LD 50-Dosis ist mit 30 Sporen/ml beschrieben (UNESTAM und WEISS 1970, DIÉGUEZ-URIBEONDO et al. 1995). Da aber auch bei diesen Versuchen eine 100 %ige Mortalität auftrat, stellte SCHMID (1998) in Frage, ob die Berechnung dieses Wertes für die Krebspest überhaupt sinnvoll ist. Sie selbst beobachtete bei einer

Zoosporenexposition von 10 Sporen/ml, dass bei einer Temperatur von 15°C und 20°C alle Tiere verstarben, bei einer Temperatur von 10°C aber keine Todesfälle über einen Beobachtungszeitraum von drei Monaten auftraten. Die mittlere Überlebenszeit der infizierten Tiere, die zwischen 5 und 15 Tagen lag (UNESTAM und WEISS 1970, SCHMID 1998), verkürzte sich signifikant bei dem Vergleich der zunehmenden Temperaturstufen 10°C, 15°C und 20°C und den ansteigenden Sporendichten 10, 100 und 1000 Sporen/ml (SCHMID 1998).

6.2 Pathologisch-anatomische Veränderungen

Bei der Untersuchung verendeter oder getöteter Krebse fallen gelegentlich bräunliche Flecken in der weichen Kutikula auf, die auf eine Melanisierung von Hyphen zurückzuführen sind (SCHÄPERCLAUS 1935, NYBELIN 1936, MANNSFELD 1942, UNESTAM und WEISS 1970, ALDERMAN et al. 1984, BARAN und SOYLU 1989, MATTHEWS und REYNOLDS 1990) und laut UNESTAM (1981) nur bei Infektion mit schwach virulenten *Aphanomyces astaci*-Stämmen zu finden sind. Es scheint, dass sowohl bei natürlicher als auch experimenteller Infektion oben beschriebene Verhaltensstörungen auftreten, die Melanisierungen aber nur bei Letzter zu finden sind (NYBELIN 1936, BARAN und SOYLU 1989).

Zum Teil sind aufgehellte Bereiche an der weichen Abdominalkutikula, selten an den Gelenken, zu sehen, die allerdings von der darunterliegenden Muskulatur stammen. Diese ist nicht wie üblich transparent, sondern weißgefärbt, was wahrscheinlich auf nekrotische Vorgänge zurückzuführen ist (ALDERMAN et al. 1984, 1987, 1990). In der darüberliegenden Kutikula sind lichtmikroskopisch meist Hyphen zu finden (OIDTMANN und HOFFMANN 1998).

Bei einigen Tieren kommt es zur Ausbildung eines mit bloßem Auge sichtbaren Pilzrasens, der meist das gesamte Auge überzieht und auch an der weichen Kutikula gefunden werden kann (SCHÄPERCLAUS 1935, NYBELIN 1936, MANNSFELD 1942, UNESTAM und WEISS 1970, ALDERMAN et al. 1984, 1987, MATTHEWS und REYNOLDS 1990, OIDTMANN et al. 1997).

Sowohl die klinischen Symptome als auch pathologische Veränderungen treten bei als resistent bezeichneten Krebspezies wesentlich seltener auf. Oft weisen sie fleckenartige Braunfärbungen der Kutikula auf (ALDERMAN et al. 1990), können sonst aber völlig

unauffällig sein. Wird allerdings unter Stress (siehe Kapitel 5: Wirtsspektrum und Empfänglichkeit) ihr Immunsystem supprimiert, können an ihnen ähnliche Veränderungen wie bei den empfänglichen Arten beobachtet werden.

Postmortal breitet sich das Mycel uneingeschränkt im gesamten Wirtsorganismus aus (UNESTAM und WEISS 1970, UNESTAM und AJAXON 1978, ALDERMAN und POLGLASE 1988). Dabei wachsen Hyphen aus der Kutikula nach außen, um Zoosporangien abzugeben, durch die erneut Tiere infiziert werden können (UNESTAM und WEISS 1970, UNESTAM und AJAXON 1978).

6.3 Mikroskopische Veränderungen

Insbesondere bei der zuvor schon beschriebenen, bevorzugt befallenen, weichen Kutikula des Abdomens und der Gelenke vor allem der empfänglichen Krebsarten können mikroskopisch einzelne Pilzhyphen bis zu einem verzweigten Mycel nachgewiesen werden. Das Wachstum der Hyphen findet zunächst parallel zur Epikutikula statt, später breiten sie sich auf die tieferen Schichten aus und sind als dreidimensionales Geflecht im Lichtmikroskop zu erkennen (SCHÄPERCLAUS 1935, NYHLÉN und UNESTAM 1975, 1980, HALDER et al. 1989). Erreichen die Hyphen die Epidermis, werden sie sofort von Hämocyten eingekapselt (UNESTAM 1981, KLÄRDING 2001), erst kurz vor dem Tod des Krebses dringen sie auch in das Hämözöl ein (UNESTAM und AJAXON 1978). NYBELIN (1936) wies mit methylenblau-gefärbten Quetschpräparaten Mycel im Nervensystem, zum Teil in der Muskulatur der Krebse nach und beschrieb Fälle, in denen die Kutikula nicht betroffen war. Auch wenn Autoren unterschiedliche Gewebe als betroffen bezeichnen, so stimmen sie doch darin überein, dass sowohl das Nervengewebe als auch die Kutikula am häufigsten befallen sind (SCHÄPERCLAUS 1935, RENNERFELT 1936, UNESTAM 1965, 1973, UNESTAM und WEISS 1970, HALDER et al. 1989). KLÄRDING (2001) beschrieb die Befallshäufigkeit verschiedener Teile des Krebskörpers und fand heraus, dass Schreitbeine, Abdominalkutikula, Augen, Nervensystem, Muskulatur und Kopfbereich in abfallender Reihenfolge betroffen waren. ALDERMAN und POLGLASE (1988) entdeckten, dass sich die Hyphen vorwiegend durch das Bindegewebe verbreiten und sich der Befall des Nervensystems sowie der Muskulatur auf die Bindegewebsschichten beschränkt. Zum Teil kann man eine schon oben erläuterte Melanisierung der Hyphen und mit ihr einhergehend eine Verdickung der

Hyphenwände beobachten. Dies trifft vor allem auf die nordamerikanischen Krebspezies zu (OIDTMANN und HOFFMANN 1998). Im Gegensatz zu den empfänglichen Arten werden bei ihnen solche Veränderungen weniger in der Abdominalkutikula, sondern vermehrt an den Gelenkhäutchen und Pleopoden beobachtet. Diese Melanisierungen und Anlagerung von Hämozyten an die innere Oberfläche betroffener Stellen hemmen das Wachstum der Hyphen in tiefere Schichten (UNESTAM 1972). Wächst der Pilz allerdings aus der Wundregion heraus, entsteht ein dichtes, nicht-melanisiertes Mycel (NYHLÉN und UNESTAM 1980), das auch auf die Muskulatur übergreifen kann (ALDERMAN et al. 1990).

Elektronenmikroskopisch können jüngere, organellenreiche Hyphen von älteren, leer erscheinenden unterschieden werden. Relativ häufig können dabei intrahyphale Hyphen beobachtet werden. Die Hyphen werden meist interzellulär gefunden, nur selten wachsen sie durch die Zellen des Wirtes hindurch. Dabei zeigt das infizierte Gewebe Vakuolisierungen, Kernpyknosen und eine Auflösung der Zellwandstruktur (KLÄRDING 2001).

7. Diagnose

Es hat lange gedauert, bis *Aphanomyces astaci* als Erreger der Krebspest endgültig feststand (SCHIKORA 1903, 1906, NYBELIN 1943). Tritt bei empfänglichen Flusskrebarten ein Massensterben auf, ohne dass die andere Gewässerfauna betroffen ist, liegt der Verdacht eines Krebspestausbruches nahe (OIDTMANN und HOFFMANN 1998). Hinzu kommen die oben beschriebenen Symptome. Um die Diagnose stellen zu können, bedarf es aber weiterer Untersuchungen.

Zur Diagnose wird die weiche Kutikula frisch verendeter Krebse lichtmikroskopisch auf typische Hyphen (6-8 µm Durchmesser, unseptiert, kein Protoplasma, runde Hyphenspitze) untersucht (SCHÄPERCLAUS 1991). Ein sicherer Nachweis kann so aber nicht erfolgen, sondern schließt die Isolierung und Identifizierung des Erregers mit ein (HALDER et al. 1989, OIDTMANN und HOFFMANN 1998). Dazu werden verdächtige Kutikulaabschnitte entnommen und in einem aufwendigen Verfahren auf Nährböden angezchtet. Diese Kultivierungsverfahren wurden in den letzten Jahrzehnten weiterentwickelt (NYBELIN 1934, RENNERFELT 1936, UNESTAM 1965, CERENIUS et al. 1984a, ALDERMAN und POLGLASE 1986, SCHMID 1998, OIDTMANN et al. 1999a), doch bereitet auch dabei die Erregerisolierung immer noch Schwierigkeiten, da der langsam wachsende *Aphanomyces*

astaci häufig von sekundären Pilzen und Bakterien überwuchert wird (CERENIUS et al. 1984a). Eine Isolierung des Pilzes verläuft so nur aus frischem Krebsgewebe einige Stunden prae mortem bis zu 24 Stunden post mortem erfolgreich (ALDERMAN und POLGLASE 1986, HALDER und AHNE 1988). Außerdem ist es bisher nicht gelungen, den Krebspest-Erreger aus latent infizierten nordamerikanischen Flusskrebsen auf diese Weise zu isolieren (OIDTMANN, persönliche Mitteilung). Ein weiteres Problem bei der sicheren Diagnose-Stellung ist die Tatsache, dass *Aphanomyces astaci* keine sexuellen Vermehrungsstadien ausbildet, die zur morphologischen Bestimmung beitragen könnten (CERENIUS et al. 1984b, DIÉGUEZ-URIBEONDO et al. 1995). Somit ist zwar eine Unterscheidung der verschiedenen Gattungen der Oomycota aufgrund ihres asexuellen Vermehrungsapparates und der Art der Sporenfreisetzung möglich (DAUGHERTY 1998, LECLERC 2000), doch innerhalb der Gattung *Aphanomyces* ist nur schwer eine Diagnose zu stellen (CERENIUS et al. 1984b, ALDERMAN und POLGLASE 1986, SÖDERHÄLL 1988, BARAN und SOYLU 1989, HUANG et al. 1994, DIÉGUEZ-URIBEONDO et al. 1995). Die endgültige Identifizierung kann in diesem Zusammenhang nur über einen Tierversuch durch Kontakt gesunder Krebse mit infiziertem Material (infizierte Tiere direkt oder durch *in vitro* gewonnene Zoosporen) erfolgen. Dabei gilt die Krebspest bei 100 %iger Mortalität der Versuchstiere als bestätigt (OIDTMANN und HOFFMANN 1998, SCHMID 1998).

HALDER et al. (1989) gelang es erstmals, durch Entwicklung einer serologischen Nachweismethode, den Reinfektionsversuch zu ersetzen. Mit Hilfe eines im Kaninchen hergestellten *Aphanomyces astaci*-Antiserums konnten sie den aus erkrankten Edelkrebsen isolierten Erreger erfolgreich als *Aphanomyces astaci* identifizieren.

BAUSEWEIN (1999) etablierte eine PCR (Polymerase-Kettenreaktion) zum Nachweis reiner Pilzisolat. Dabei konnte *Aphanomyces astaci* durch anschließende Restriktionsenzym-Analysen von anderen getesteten Pilzspezies differenziert werden. Die Anzucht von Reinkulturen stellte weiterhin ein Problem dar, doch konnte auch hier auf den Tierversuch verzichtet werden. Die PCR ermöglicht den Nachweis der Krebspest in wesentlich kürzerer Zeit als bisherige Untersuchungsmethoden.

8. Übertragungswege

Wie bereits mehrfach erwähnt fungieren nordamerikanische **Flusskrebse** als oft unerkannte Carrier (Träger) der Krebspest und haben eine besondere Bedeutung bei der Verbreitung dieser Krankheit. Sie wurden in den 60er und 70er Jahren vermehrt in die Natur ausgesetzt, und auch heute noch kommt es zur Freilassung unerwünschter Aquarienkrebse, Ködertiere und solcher, die aus Gartenteichen, Krebszuchten und Vorratshältern der Gastronomie entkommen konnten. Natürlich können auch empfängliche Krebsarten, die die Infektion in sich tragen, für eine Übertragung sorgen (UNESTAM 1969c, 1972, CERENIUS und SÖDERHÄLL 1992, HUNER 1994, HAGER 1996, OIETMANN und HOFFMANN 1998, PEKNY und PÖKL 2000).

Aber auch kontaminierte Fischfang- und Transportgeräte sowie im Freizeitbereich verwendete Gummistiefel, Badekleidung, Surfbretter und andere Gerätschaften können zur Verbreitung von *Aphanomyces astaci* beitragen (RENNERFELT 1936, HÄLL und UNESTAM 1980, ALDERMAN et al. 1987, OIETMANN und HOFFMANN 1998). Außerdem sollte an das Verschleppen von **sporenhaltigem Wasser**, in dem die Zoosporen mindestens zwei Wochen überleben können (UNESTAM 1969b, CERENIUS und SÖDERHÄLL 1985), gedacht werden (OIETMANN und HOFFMANN 1998).

Auf Schuppen von Salmoniden befindliche Zoosporen können sich *in vitro* dort sogar weiterentwickeln und ebenfalls gesunde Krebse infizieren (HÄLL und UNESTAM 1980, HALDER und AHNE 1988). OIETMANN et al. (2001) wiesen nach, dass **Fische** (Forellen, Flussbarsche, Aale und Karpfen) nach oraler Aufnahme von infiziertem Krebsgewebe kontaminierten Kot ausscheiden und so als Überträger fungieren können. Möglicherweise könnten auch krebsfressende Säugetiere und Vögel, die ebenfalls sporenhaltiges Wasser verschleppen könnten, an der Ausbreitung der Pest beteiligt sein (SCHÄPERCLAUS 1935).

9. Bekämpfung und Prävention

Es finden rege Bemühungen statt, die tödliche Krankheit zu bekämpfen.

Als wirksam haben sich Malachitgrün (ALDERMAN et al. 1987), Dichlorphennatrium, Hexachlorphene (ALDERMAN und POLGLASE 1984) und Jodophore (ALDERMAN und POLGLASE 1988) erwiesen. Insbesondere **Malachitgrün** zeigt eine hohe Wirksamkeit. Bei

einer Konzentration von 2 mg/l inhibiert es die Sporenkeimung auf Fischschuppen, und bei 1 mg/l in Teichwasser (HÄLL und UNESTAM 1980). Die Wirksamkeit von Malachitgrün steht dabei in engem Zusammenhang mit der Einwirkzeit und der Temperatur (ALDERMAN und POLGLASE 1984).

Desweiteren wurde der Effekt von **MgCl₂** auf die Zoosporenproduktion untersucht. CERENIUS (1985) beschrieb eine irreversible Hemmung der Zoosporenproduktion ab einer Konzentration von 1 mM MgCl₂ im Wasser, PERSSON und SÖDERHÄLL (1986) beobachteten eine Lysis derselben bei 50 mM, und RANTAMÄKI et al. (1992) zeigten, dass bei 100 mM MgCl₂ Krebse vor einer Infektion mit Zoosporen geschützt waren. Bei bereits infizierten Tieren kann das Hyphenwachstum allerdings nicht aufgehalten werden. Die Wirksamkeit von MgCl₂ verringert sich stark bei Vorhandensein der gleichen Menge CaCl₂ (UNESTAM 1966a, CERENIUS 1985).

SÖDERHÄLL und CERENIUS (1983) beobachteten die hemmende Wirkung von Actinomycin D und Cycloheximid auf die Keimung der Sporen, während das Fungizid Ampropylfos ((RS)-1-Aminopropylphosphorsäure) das Mycelwachstum von *Aphanomyces astaci* reduziert (CERENIUS et al. 1992). LILLEY und INGLIS (1997) entdeckten, dass *Aphanomyces astaci* gegenüber den meisten der getesteten **Antibiotika** und **Chemikalien** (Penicillin, Streptomycin, Oxolinsäure, Malachitgrün, Wasserstoffperoxid und Natriumchlorid) empfindlich war und schlugen Wasserstoffperoxid und Proxitane 0510[®] (Peroxyessigsäure) zur desinfizierenden Anwendung in der Aquakultur vor.

Probleme in der Verwendung der Wirkstoffe treten auf, da sie zum Teil für den Wirt und andere Organismen toxisch sind, und ihre Wirksamkeit durch unterschiedliche Temperaturen und Verdünnungseffekte durch Wasser in Mitleidenschaft gezogen werden kann (ALDERMAN und POLGLASE 1984).

Da derzeit noch keine in der Natur wirksame Therapie gegen die Krebspest existiert (SCHÄPERCLAUS 1991), versucht man bei einem Pestausbruch vor allem die weitere Ausbreitung durch schon oben beschriebene Vektoren zu verhindern. Zunächst sollten tote und kranke Krebse abgesammelt werden, um eine erneute Sporenproduktion und ein Verschleppen infektiösen Materials zu verhindern. Als Desinfektionsmittel kann man Jodoform oder Wasserstoffperoxid verwenden, aber auch ein Austrocknen von Geräten für 48 Stunden ist wirksam. Tiefgefrieren bei -20°C für zwei Stunden oder Erwärmen bei 30°C für

30 Stunden kann den Erreger abtöten (PERSSON und SÖDERHÄLL, unveröffentlicht; zitiert bei SMITH und SÖDERHÄLL 1984).

Maßnahmen zur Prävention von Krebspestausbüchen bestehen vor allem in der Aufklärung der Öffentlichkeit, insbesondere betroffener Personen wie beispielsweise Fisch- und Krebszchter, Angler und Aquarienbesitzer. Es soll dabei verhindert werden, dass infizierte Krebse, sowohl europäische empfängliche Arten als auch nordamerikanische Carrier, in die Natur gelangen. Durch regelmäßige Krebsbefischung kann man die Populationen amerikanischer Krebse so niedrig halten, dass ein Abwandern von Krebsen und damit eine Ausbreitung des Erregers unwahrscheinlich ist (OIDTMANN und HOFFMANN 1998). Bei der Planung von Fischbesatz sollte darauf geachtet werden, dass die Fische aus krebspest-unbelasteten Gewässern stammen (OIDTMANN et al. 2001).

10. Übersicht über das Genom der Oomycota

Untersuchungen am und fundamentales Wissen über das Genom von Spezies sind wichtig, um die Grundsätze der Biologie und der Genetik der Arten zu verstehen. Diese Informationen ermöglichen die Isolierung und Klonierung von Genen an bestimmten Positionen des Genoms und bieten Material für populationsgenetische Studien.

Unter der **Genomgröße** versteht man die Masse an DNA in einem nicht-replizierten haploiden Genom, die auch alternativ als „C-Value“ bezeichnet wird. Die Maßeinheit der zellulären Genomgröße ist Picogramm ($1 \text{ pg} = 10^{-12} \text{ g}$), kleinere prokaryotische Genome werden auch in Dalton ($1 \text{ d} \approx 1,66 \times 10^{-12} \text{ pg}$) und die von Plasmiden in Kilobasen doppelsträngiger DNA ($1 \text{ kb} = 1000 \text{ Basenpaare} \approx 6,18 \times 10^5 \text{ d}$; $1 \text{ pg} \approx 0,98 \times 10^6 \text{ kb}$) ausgedrückt (CAVALIER-SMITH 1985).

Die Größe des Genoms korreliert nicht mit der Anzahl der Gene eines Organismus, da manche einzellige Organismen riesige Mengen an DNA pro Genom besitzen, hochkomplexe vielzellige Organismen dagegen oft nur einen Bruchteil davon. Dieses Phänomen wird als das „C-Value Paradox“ bezeichnet (CAVALIER-SMITH 1985).

Im Folgenden werden einige in der Literatur vorkommende Angaben zu Genomgrößen, insbesondere der Oomycota, beschrieben.

Die Anzahl an Chromosomen (8 bis 21) erwies sich in *Saprolegnia ferax* als sehr variabel, wobei dies auf die Menge an DNA pro Genom nicht in diesem Ausmaß zutrifft (MORT-BONTEMPS und FÈVRE 1995).

Die Größe sowohl der ribosomalen RNA (rRNA) als auch der heterogenen nuclearen RNA (hnRNA) wurde bei *Achlya ambisexualis* als Vertreter der Oomycota von CAVALIER-SMITH (1985) mit je 1150 Nucleotiden angegeben, wobei diese Art 2600 verschiedene mRNAs besitzt.

Um einen Vergleich zu bieten gibt Tabelle 5 eine Übersicht über den Umfang der Genomgrößen einzelner eukaryotischer Taxa in Picogramm. Die Genomgröße der Bakterien variiert von $0,12 \times 10^9$ Dalton bis zu $8,6 \times 10^9$ Dalton.

Tabelle 5: Vergleich der Größen des Genoms verschiedener Reiche (nach CAVALIER-SMITH 1985)

Reich	Genomgröße (pg)
Fungi	0,009 bis 1,5
Chromista	0,036 bis 25
Animalia	0,055 bis 142
Protozoa	0,024 bis 700

Die Genomgröße von *Achlya ambisexualis* beträgt 0,05 pg (CAVALIER-SMITH 1985), was nach Umrechnung circa 49 Mb entspricht und mit Werten anderer Oomycota übereinstimmt.

MORT-BONTEMPS und FÈVRE (1995) untersuchten den Karyotyp von *Saprolegnia monoica* (51 Mb, 16 Chromosome) und verglichen die Genomgröße mit der von *Achlya ambisexualis* (42 Mb), *Bremia lactucae* (50 Mb) und *Phytophthora megasperma* (62 Mb). Unter Verwendung einer anderen Methode wurden für *Phytophthora megasperma* nur 46,5 Mb angenommen (TOOLEY und CARRAS 1992), während *Phytophthora sojae* mit seinem $6,2 \times 10^7$ bp großen Genom (MAO und TYLOR 1991) im erwarteten Bereich liegt, aber *Phytophthora infestans* ($2,5 \times 10^8$ bp) etwas aus dem Rahmen zu fallen scheint (JUDELSON 1997).

Insgesamt scheint die Gesamtgenomgröße der Oomyceten (40 –60 Mb) etwas höher zu liegen als bei den Höheren Pilzen (30-40 Mb) (MORT-BONTEMPS und FÈVRE 1995).

Innerhalb dieses Gesamtgenoms wird für Studien taxonomischer Verwandtschaftsgrade und genetischer Variationen vor allem auf den Bereich der ribosomalen RNA zugegriffen. Die Gene, die die ribosomalen RNA-Moleküle kodieren, sind meistens in speziellen Bezirken der Chromosomen lokalisiert, die mit den Nucleoli in Verbindung stehen. Außerdem liegen sie in Clustern von etwa 13 kb Länge vor und wiederholen sich viele Male in Tandemanordnung, getrennt durch nichttranskribierte Spacer. Der Cluster aus drei RNA-Genen (18S, 5.8S, 28S) wird in den Nucleoli durch die RNA-Polymerase I in eine 45S-RNA transkribiert, aus der nach enzymatischer Modifikation reife 18S-, 5.8S- und 28S-rRNA-Moleküle entstehen (STRYER 1996). Um das 5.8S ribosomale Gen befinden sich die ITS-Regionen (ITS 1 zwischen 18S und 5.8S, ITS 2 zwischen 5.8S und 28S). Durch die Tandemanordnung mit einer hohen Anzahl an Kopien und ihre Variabilität hochkonservierter Bereiche eignen sich diese Regionen besonders für vergleichende Untersuchungen der Nucleotidsequenzen im Rahmen phylogenetischer Untersuchungen. Die ITS-Region (ITS 1 + 5.8S + ITS 2) der Oomycota ist etwa 760 bp (200 bp + 160 bp + 400 bp) groß (LEE und TAYLOR 1992, VAN DER AUWERA et al. 1994, Daten der *NCBI Genbank*), im Vergleich zu der von Pilzen (*Trichosporon* AB028648, *Aspergillus* AF261658, *Fusarium* AF178406, *Candida* AB018037), die zwischen 440 bp und 480 bp beträgt.

11. Derzeitiger Kenntnisstand über die Oomycota und ihre Phylogenie

Bereits zuvor (Kapitel 3) wurde auf phylogenetische Untersuchungen im Zusammenhang mit der taxonomischen Stellung der Oomycota im System der Eukaryonten eingegangen. Dieses Kapitel soll eine Zusammenfassung des heutigen Kenntnisstandes über einzelne Arten der oft auch als Peronosporomycetes bezeichneten Oomycetes bieten.

Die erste Zeichnung eines zu den **Oomyceten** gehörenden Organismus wurde 1750 angefertigt und stellte sich später als *Saprolegnia*-Art heraus. Die früheste beschriebene Art war *Leptomitus lacteus* (ROTH, 1798) und bis zur Mitte des 19. Jahrhunderts waren nur *Saprolegnia ferax* und *Achlya proliferata* von Bedeutung. Um 1840 wurde aus Nordamerika

Phytophthora infestans, der Erreger der Knollenfäule, in Europa eingeführt. Dieser verbreitete sich rasch, bis er im Sommer 1846 fast die ganze Kartoffelernte Irlands zerstörte, was als der „Große Hunger“ bekannt wurde und zum Tod von fast einer Million Iren und zu der Emigration von weiteren eineinhalb Millionen unter anderem nach Amerika führte. Ein weiterer für die Menschheit bedeutsamer Oomycet ist der falsche Mehltau der Weinreben, *Plasmopara viticola*, der in engem Zusammenhang mit der Entwicklung des ersten chemischen Fungizids für Pflanzen steht. Die Grundlagen der heutigen Kenntnisse über die Oomycota und ihre Unterteilung in Saprolegnien und Peronosporen gehen zurück bis 1866. Dabei diente die Struktur des Thallus immer als Hauptkriterium zur Einteilung der Arten in diese beiden Gruppen. Später wurde der Wandaufbau und die protoplasmatische Organisation der Oospore für taxonomische Zwecke zu Rate gezogen (DICK 1990, WAGGONER und SPEER 1999).

Erste molekulare phylogenetische Untersuchungen an Oomycota wurden von WALKER und DOOLITTLE (1982) im Bereich der 5.8S kodierenden Region der rDNA von *Saprolegnia ferax* und *Pythium hydnosporum* durchgeführt.

Vielfach untersucht wurden die Pythiales. Dazugehörige einzelne Arten der Gattungen *Phytophthora* (FÖRSTER et al. 1990b, FÖRSTER und COFFEY 1993, TOOLEY et al. 1996) und *Pythium* (BELKHIRI und DICK 1988, MARTIN und KISTLER 1990, CHEN und HOY 1993) wurden mittels RFLPs (Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus) der nukleären DNA (nDNA) und der mitochondrialen DNA (mDNA) identifiziert. Sequenzanalysen der ITS-Region bestätigten bei *Phytophthora*-Arten ursprünglich auf morphologischen Kriterien basierende stammesgeschichtliche Verwandtschaftsgrade (LEE und TAYLOR 1992, CRAWFORD et al. 1996, COOKE und DUNCAN 1997) und ermöglichten bei *Pythium ultimum* Trow die Konstruktion spezies-spezifischer Primer (KAGEYAMA 1997). Außerdem wurde bei *Phytophthora megasperma* (VAN DER AUWERA et al. 1994) als erstem Vertreter der Oomycota die 28S rDNA sequenziert, worauf BRIARD et al. (1995) aufbauten und die Verwandtschaft von 23 Arten der Gattungen *Pythium* und *Phytophthora* untersuchten. *Phytophthora infestans* wurde eingehend erforscht (JUDELSON 1997, JUDELSON und FABRITIUS 2000). COOKE et al. (2000) bieten eine umfassende phylogenetische Analyse von *Phytophthora*-Spezies basierend auf Untersuchungen der ITS-Region.

Die Familie der **Saprolegniaceae** wurde erstmalig in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts klassifiziert (DE BARY und WORONIN 1881, DE BARY 1888), worauf COKER und MATHEWS (1937) aufbauten. In Folge wurden Untergattungen und Arten entwickelt. Die Identifikation basierte dabei auf morphologischen Beobachtungen (SCOTT 1961, DICK 1969, 1972, 1973).

DICK (1990) befürwortete schließlich ein neues taxonomisches System zur Unterteilung der Oomycota. Dieses basiert auf morphologischen und ultrastrukturellen Charakteristika wie der Oosporogenesis, Aufbau der Oosporenwand und protoplasmatischen Strukturen der Oospore. Er teilte die Peronosporomycetes/Oomycetes in die drei Unterklassen Saprolegniomycetidae, Rhipidiomycetidae und Peronosporomycetidae. Die Monophylie der Letzteren konnte auch von RIETHMÜLLER et al. (1999) bestätigt (bootstrap value 100%) werden, während die Unterklasse Saprolegniomycetidae nur schwach (bootstrap value 68%) unterstützt wird, und die Rhipidiomycetidae näher mit diesen als mit den Peronosporomycetidae verwandt zu sein scheinen.

Innerhalb der **Saprolegniomycetidae** gelang es, Saprolegnia mittels Restriktionsenzym-Analyse zu identifizieren (MOLINA et al. 1995). DAUGHERTY et al. (1998) untersuchten Übereinstimmungen der ITS-Sequenzen von Saprolegnia, Achlya, Thraustotheca und Dictyuchus und brachten diese in direkten evolutionären Zusammenhang mit deren verschiedenen Mechanismen der Freisetzung von Sporen. Dabei erkannten sie Saprolegnia als ursprünglichste Gattung der Oomyceten, von der sich Achlya und Thraustotheca in enger Verwandtschaft, Dictyuchus davon abweichend in einer separaten Abstammungslinie, entwickelten. Dies schien die Hypothese eines „evolutionären Pfades“ ausgehend von dem Mechanismus der Sporenfreisetzung der Saprolegniaceae als ursprünglichste Form (HÖHNK 1933) zu bestätigen. Dem widersprachen LECLERC et al. (2000) nach der Analyse der ITS- und LSU (large subunit, große Untereinheit der ribosomalen DNA) -Region der rDNA von 40 Arten zugehörig zu 10 Gattungen der Saprolegniaceae, stimmten aber der engen Verwandtschaft von Achlya und Thraustotheca zu. Dabei nutzten sie die LSU rDNA unter anderem von *Aphanomyces astaci* (GenBank Accession Nummer AF218197) für ihre phylogenetischen Studien und beschrieben die Gattung Aphanomyces mit ihrer achlyoiden Art der Sporenabgabe als evolutionär ursprünglichste Form.

RIETHMÜLLER et al. (1999) führten phylogenetische Studien an dem 5'-Ende der 28S DNA bei 46 Oomyceten-Arten durch. Sie verwendeten sowohl die Neighbour-Joining- als auch die

Maximum Parsimony-Analyse. Beide ergaben, dass alle **Aphanomyces**-Arten (Saprolegniales) in einem Cluster zusammen mit *Pachymetra chaunorhiza* (Sclerosporales) und *Plectospira myriandra* (Saprolegniales) gruppiert werden sollten (bootstrap value 97%). Entsprechend des Aufbaus ihrer Oogonienwand werden Vertreter der Gattung *Aphanomyces* drei verschiedenen Untergattungen zugeteilt, wobei *Aphanomyces stellatus* zu den *Asperomyces*, *Aphanomyces laevis* zu den *Aphanomyces* gehört (SCOTT 1961). Damit übereinstimmend waren diese beiden Arten bei RIETHMÜLLER et al. (1999) auf unterschiedlichen Aufzweigungen des phylogenetischen Baumes zu finden, doch weitere Sequenzanalysen dieser Gattung sind nötig, um eine Aussage über deren Phylogenie treffen zu können.

12. Überblick über die Polymerasekettenreaktion (PCR)

12.1 Das Prinzip der PCR

Die Polymerasekettenreaktion (**Polymerase Chain Reaction, PCR**) ist eine enzymatische Reaktion zur *in vitro* Amplifikation (Vervielfältigung) von spezifischen DNA-Fragmenten einer definierten Länge (Target, Zielsequenz) innerhalb komplexer DNA Proben. Die PCR wurde 1985 von MULLIS et al. entwickelt und ermöglicht die Detektion geringster Mengen selektiver DNA Sequenzen (SAIKI et al. 1985, MULLIS et al. 1986, MULLIS und FALOONA 1987). Die Standardmethode erfordert ein DNA Template (Matrize), das die selektiv zu amplifizierende Region enthält, sowie zwei Oligonukleotid-Primer (18-30 basenpaarlang, einsträngige DNA-Stücke), die diese Region flankieren und mit dem Template hybridisieren. Gewöhnlich benutzt man zur Vervielfältigung des spezifischen DNA-Fragmentes eine thermostabile DNA-Polymerase, die von dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* isoliert wird, die sogenannte *Taq* Polymerase (SAIKI et al. 1988). Alle PCR-Reaktionskomponenten werden miteinander vermischt und die nun folgende eigentliche Reaktion besteht aus drei temperaturabhängigen Schritten (Abbildung 10): (1) der **Denaturierung** der doppelsträngigen DNA bei **90-95°C**, die der Trennung der neugebildeten Stränge von der Matrize dient, (2) dem **Annealing** der Primer bei **35-65°C**, das zur Anlagerung der sequenzspezifischen Primer an den positiven bzw. negativen DNA-Strang führt (Primer-DNA-Hybridisierung) und (3) der **Extension** bei **72°C**, bei der die Primer als

Startersignal für die Taq Polymerase fungieren, die in Folge neue DNA synthetisiert. Jeder dieser Inkubationsschritte dauert in der Regel 1-2 Minuten. Die Sequenz dieser drei Reaktionsschritte entspricht einem PCR Zyklus. Im darauffolgenden Zyklus werden die neu gebildeten DNA Stränge von den Originalsträngen durch Denaturierung gelöst und jeder DNA-Strang dient als Matrize für den jeweils anderen Primer in dem anschließenden Annealing- und Extensions-Schritt. Der Kreislauf aus Denaturieren, Hybridisieren und Extension wird in der Regel 30-40mal wiederholt bis das gewünschte DNA-Fragment in mehreren hundert Millionen Exemplaren vorliegt. Theoretisch führen n PCR Zyklen zu einer 2^n -fachen Amplifikation der Zielsequenz (LINZ und DEGENHARDT 1990, THIELE 1991, EDEL 1998), doch wird bei einer hohen Zyklenzahl irgendwann ein Plateau erreicht (INNIS und GELFAND 1990). Alle zu einer PCR nötigen Reaktionskomponenten sind in dem PCR-Ansatz von Anfang bis Ende enthalten und die Amplifikation mit ihren unterschiedlichen Inkubationsbedingungen kann automatisiert in einem Thermocycler mit programmierter Heizung und Kühlung durchgeführt werden (BROWN 1996, EDEL 1998).

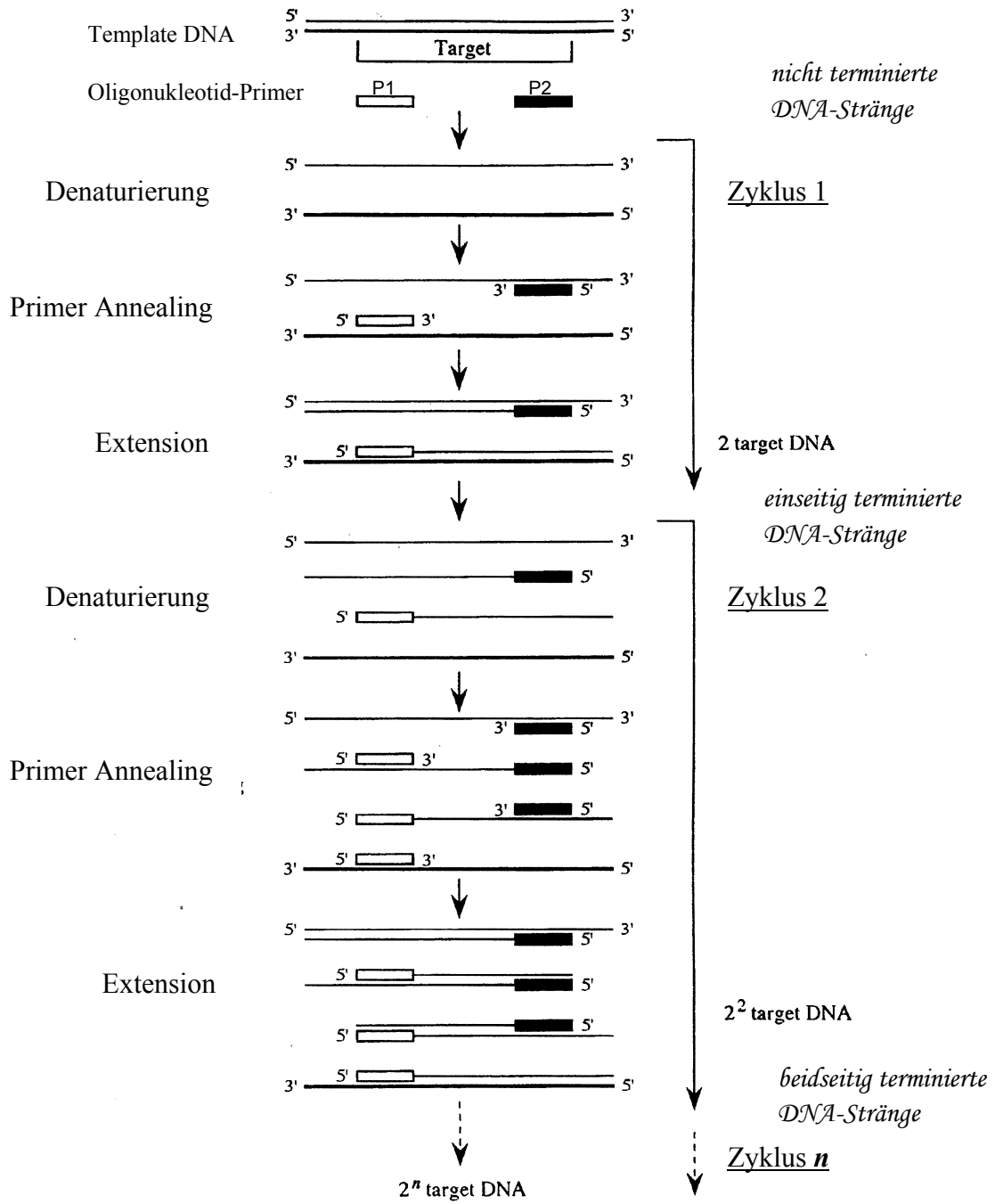


Abbildung 10: Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Das Volumen eines Reaktionsansatzes beträgt in der Regel 25 bis 100 µl. Darin enthalten sind die Template DNA, Oligonukleotid-Primer, DNA-(*Taq*)-Polymerase, Deoxyribonukleotid-Triphosphate (dNTPs = dATP + dGTP + dCTP + dTTP) und ein entsprechender Puffer mit MgCl₂. Ihre Standardbedingungen sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Standardbedingungen der einzelnen PCR-Komponenten für eine erfolgreiche Amplifikation (EDEL 1998)

Bestandteil:	Konzentration:
Template DNA	10-100 ng
10x PCR-Puffer	1/10 des Endvolumens
MgCl ₂	0,5-5 mM (meist 1,5 mM)
dNTPs	20-200 µM je (je von dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
Primer 1	0,1-0,5 µM
Primer 2	0,1-0,5 µM
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	0,5-2,5 Units
steriles destilliertes Wasser	auf das Endvolumen auffüllen
Endvolumen der Reaktion	25-100 µl

Diese Standardbedingungen müssen in der Regel noch für die einzelne PCR optimiert werden (INNIS und GELFAND 1990).

12.2 PCR-Optimierung

FINCKH und ROLFS (1998) beschreiben fünf Charakteristika einer PCR: (1) Spezifität, (2) Sensitivität, (3) Effizienz (Ausbeute), (4) Reproduzierbarkeit und (5) Genauigkeit. Um diese zu gewährleisten, muss das Ergebnis einer PCR, auf Qualität und Quantität bezogen, optimiert werden (EKMAN 1999).

Vor allem die **Primer** entscheiden über den Erfolg oder Misserfolg einer PCR. Nur wenn sie richtig gestaltet sind, kommt es zu einer Vervielfältigung des gewünschten DNA-Fragmentes.

Für die passende Auswahl müssen Informationen über die Sequenz, in deren Bereich sie komplementär angreifen sollen, bekannt sein. In der Regel verwendet man eine Länge von 18 bis 30 Basenpaaren (BROWN 1996, EDEL 1998) pro Oligonukleotidprimer. Diese Mindestlänge ergibt sich aus der Überlegung, dass die so festgelegte Sequenz nur einmal im gesamten Genom vorkommen, aber die Hybridisierungszeit nicht zu lange dauern soll. Basenfehlpaarungen am 5'-Ende fallen nicht so sehr ins Gewicht, treten diese aber am 3'-Ende auf, so kann es zu einem vollständigen Versagen der Amplifikation und einem falsch-negativen Ergebnis führen (LINZ und DEGENHARDT 1990). Außerdem sollte der GC-Anteil (Anteil von Guanin und Cytosin-Basen) 40-60 % betragen, und am 3'-Ende mindestens ein oder zwei G's oder C's lokalisiert sein, die eine durch drei Wasserstoffbrücken-Bindungen (statt nur zwei bei A und T) stabilere Bindung der Primer garantieren (ROUX 1995). Allgemeine Vorgehensweisen zur Konstruktion von Primern wurden von mehreren Autoren beschrieben (DIEFFENBACH et al. 1993, He et al. 1994). Ein weiterer wichtiger Faktor für das Gelingen einer PCR ist die richtige **Annealing-Temperatur**, die theoretisch wenige Grad Celsius unter der Schmelztemperatur der Primer liegt, aber in der Realität diese oft übersteigt (WU et al. 1991). Aber auch bei den anderen Komponenten kann eine Anpassung an die jeweilige PCR notwendig sein (WILLIAMS 1989, INNIS und GELFAND 1990, WU et al. 1991, EKMAN 1999). Abbildung 11 zeigt die Auswirkungen einiger wichtiger Parameter auf den Ausgang der PCR bezüglich Spezifität, Sensitivität und Effizienz (nach EKMAN 1999). Bei Problemen in der PCR sind Vorgehensweisen zu deren Bewältigung (Troubleshooting) beschrieben worden (WILLIAMS 1989, ROUX 1995, EKMAN 1999).

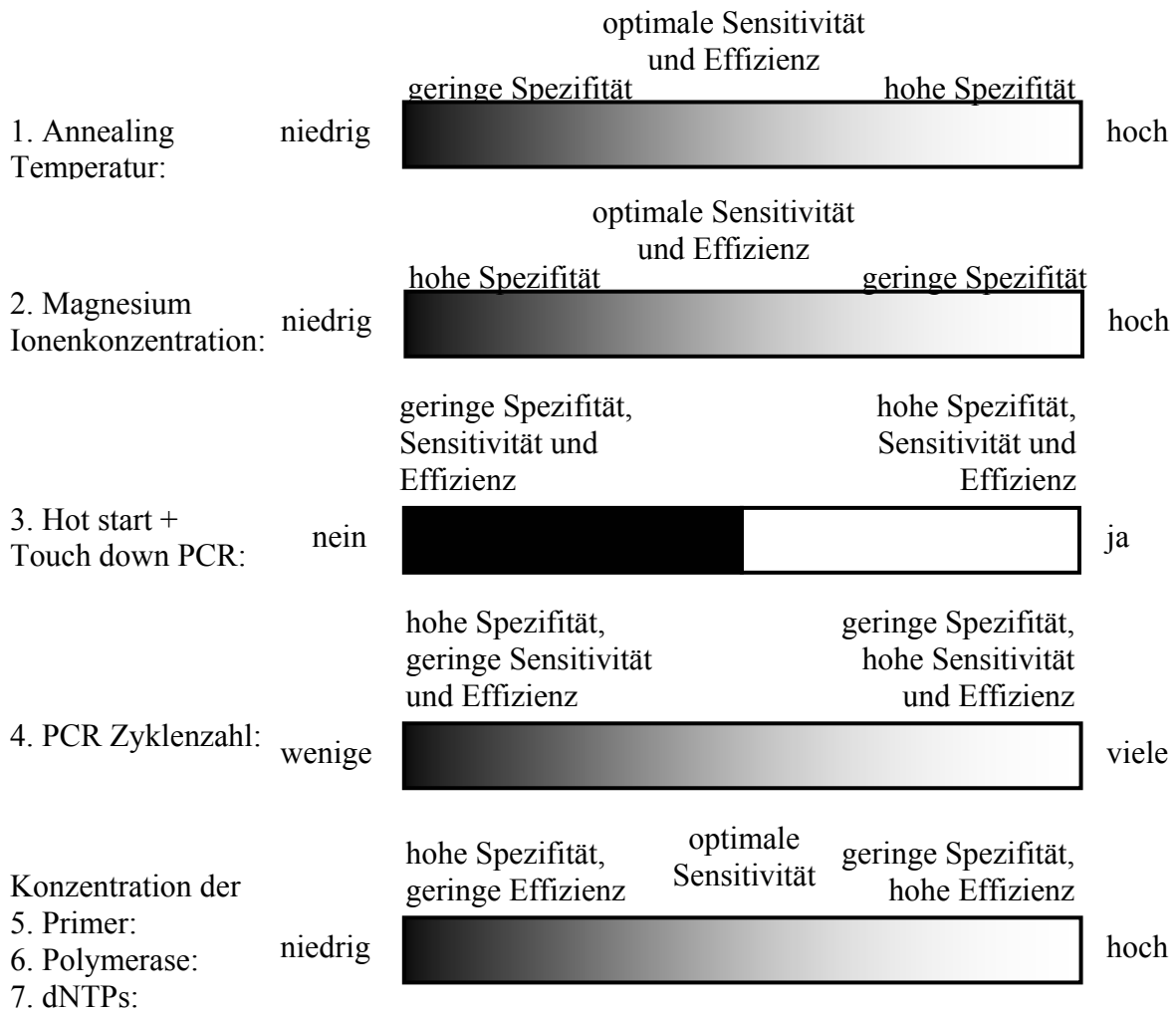


Abbildung 11: Auswirkungen einiger Parameter auf die Spezifität, Sensitivität und Effizienz einer PCR (nach EKMAN 1999)

12.3 Analyse der PCR-Produkte

Es existieren verschiedene Analysemethoden für PCR-Produkte (Agarosegelelektrophorese, unmittelbare Sequenzanalyse, Klonierung von PCR-Produkten), doch erfolgt in den meisten Fällen eine Visualisierung der Fragmente im Anschluss an die Polymerase-Kettenreaktion. Die PCR-Produkte werden entsprechend ihrer Größe in einem Agarose-Gel (oder Polyacrylamid-Gel) elektrophoretisch aufgetrennt und durch Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht (SAMBROOK et al. 1989, BROWN 1996, EDEL 1998).

Nur das Vorhandensein eines Amplifikats stellt aber noch keine sichere Diagnose dar. Hierzu muss das Ergebnis weiter verifiziert (Sequenzierung, Restriktionsenzymverdauung, Southern Blot) werden (ROLFS et al. 1992).

Bei kürzeren PCR-Fragmenten kann es trotz einem Signal in der richtigen Größe sein, dass es sich nicht um das erwartete Produkt handelt. Das liegt daran, dass diese kleinen Fragmente, statistisch gesehen, am ehesten zufällig entstehen. Um die Spezifität der PCR zu erhöhen, werden geschachtelte Primer (inner primer), die innerhalb des zuerst mit äußeren Primern (outer primer) amplifizierten Fragments liegen, eingesetzt. Diese als **Nested PCR** bezeichnete Methode liefert ein Teilfragment des zuvor synthetisierten DNA-Stücks. Die Ausbeute der nachzuweisenden Sequenz wird dabei erhöht und unspezifischer Hintergrund wird im zweiten Ansatz bis unter die Nachweisgrenze verdünnt (LINZ und DEGENHARDT 1990, ROUX 1995).

Die **Genauigkeit** der PCR und somit der DNA-Polymerase wurde vielfach durch Klonierung und Sequenzierung von Amplifikationsprodukten ermittelt. Da jeder Fehler in den nachfolgenden Amplifikationen vermehrt wird, ist die Fehlerhäufigkeit in den Endprodukten kumulativ. SAIKI et al. (1988) kamen auf eine Gesamtfehlerhäufigkeit von nur 0,25 % oder auf 1 falsch eingebautes Nukleotid in 400 neusynthetisierten Basen über den Zeitraum von 30 Zyklen.

13. Charakterisierung verschiedener Genotypen von *Aphanomyces astaci*

Im Gegensatz zu der „klassischen PCR“ wird die als **RAPD** (random amplified polymorphic DNA, zufällig amplifizierte polymorphe DNA; WILLIAMS et al. 1990), **AP-PCR** (arbitrarily primed PCR, willkürlich gestartete PCR; WELSH und McCLELLAND 1990) oder **DAF** (DNA amplification fingerprinting; CAETANO-ANOLLÉS et al. 1991) bezeichnete DNA-Analyse mit einem einzigen, kurzen Primer willkürlicher Sequenz (arbitrary primer) bei niedriger Annealing-Temperatur durchgeführt. Sie ermöglicht die Charakterisierung genetischer Variationen innerhalb eines Organismus (NEWTON und GRAHAM 1994, EDEL 1998) und gab auch bei *Aphanomyces astaci* Hinweise auf die unterschiedlichen Genotypen bei verschiedenen Krebspestausbürchen.

HUANG et al. (1994) untersuchten mit dieser Methode 15 verschiedene *Aphanomyces astaci*-Isolate und ordneten diese drei verschiedenen Gruppen zu, die nach der Krebsart, aus der das Erstisolat stammte, benannt wurden. Gruppe A enthielt neun Isolate, die vor 1970 in Schweden isoliert wurden und einem *Astacus*-Stamm zugeteilt werden. Gruppe B (fünf Isolate) wurde nach 1970 von *Pacifastacus leniusculus* (Signalkrebs) gewonnen (*Pacifastacus*-Stamm I), während das Isolat *Kv* keiner dieser Gruppen zugeordnet werden konnte und als Gruppe C (*Pacifastacus*-Stamm II) bezeichnet wurde.

DIÉGUEZ-URIBEONDO et al. (1995) gelang die Isolierung eines weiteren Stammes (strain), *Pc*, der sich in seiner Wachstumsrate und der Temperatur, bei der eine Sporenmotilität zu beobachten war, und der Enzystierung stark von bisher bekannten Stämmen unterschied. Er wurde aus dem Warmwasserkrebs *Procambarus clarkii* (Roter Amerikanischer Sumpfkrebs) gewonnen und nach Durchführung einer RAPD-PCR als neue genetische Gruppe D (*Procambarus*-Stamm) identifiziert.

LILLEY et al. (1997) ordneten die zwei aus einem Krebspestausbuch in England stammenden Isolate *FDL 457* und *FDL 458* der oben beschriebenen Gruppe B zu. Die in Finnland bei einem natürlichen Ausbruch isolierten Stämme mussten zwei verschiedenen Gruppen zugeordnet werden: *K121* verhielt sich in der RAPD-PCR wie Strain *Pl* (Gruppe B), *K136* wie *L1* (Gruppe A) (VENNERSTRÖM et al. 1998).

OIDTMANN et al. (1999b) führten bei zwei aus *Astacus astacus* (Edelkrebs) isolierten *Aphanomyces astaci*-Stämmen eine RAPD-Analyse durch und die als *M96/1* und *M96/2* bezeichneten Stämmen zeigten sich fast identisch mit Strain *Pl* (Gruppe B).

Die Ähnlichkeit der untersuchten Stämme mit den aus Signalkrebs stammenden Isolaten, legt den Verdacht nahe, dass der in Europa vorkommende Krebspesterreger von amerikanischen Krebsen über Schweden eingeführt wurde (HUANG et al. 1994, DIÉGUEZ-URIBEONDO et al. 1995, LILLEY et al. 1997, OIDTMANN et al. 1999b). Um so wichtiger ist es, den Import nicht-einheimischer Krebse zu kontrollieren, um das Risiko der Einfuhr neuer Genotypen unterschiedlicher Virulenz zu minimieren (VENNERSTRÖM et al. 1998). Tabelle 7 gibt eine Übersicht über die bisher mittels RAPD-PCR charakterisierten Genotypen von *Aphanomyces astaci* sowie dem Jahr, Ort und Wirt ihrer Erstisolierung (OIDTMANN et al. 1999b).

Tabelle 7: Übersicht über die Zuordnung der *Aphanomyces astaci*-Isolate zu den vier Gruppen von Genotypen (entnommen OIÐTMANN et al. 1999b)

Isolat:	Jahr:	Land:	Wirt:
<i>Astacus</i>-Stamm (Gruppe A)			
J1	1962	Schweden	Edelkrebs
L1	1962	Schweden	Edelkrebs
Uv	1970	Schweden	Edelkrebs
V1	1970	Schweden	Edelkrebs
Sv	1970	Schweden	Edelkrebs
Da	1973	Schweden	Edelkrebs
Ra	1973	Schweden	Edelkrebs
Vå	1973	Schweden	Edelkrebs
Al	1988	Türkei	Galizierkrebs
K136	1995	Finnland	Edelkrebs
<i>Pacifastacus</i>-Stamm I (Gruppe B)			
Pl	1970	USA	Signalkrebs
Si	1970	Schweden	Edelkrebs
Ti	1970	Schweden	Edelkrebs
SA	1971	Schweden	Signalkrebs
Yx	1973	Schweden	Edelkrebs
Hö	1974	Schweden	Edelkrebs
K121	1995	Schweden	Edelkrebs
FDL457	1990	Schweden	Dohlenkrebs
FDL458	1990	Schweden	Dohlenkrebs
M96/1	1996	Deutschland	Edelkrebs
M96/2	1996	Deutschland	Edelkrebs
	1997	Spanien	Dohlenkrebs
<i>Pacifastacus</i>-Stamm II (Gruppe C)			
Kv	1978	Schweden	Signalkrebs (aus Kanada)
<i>Procambarus</i>-Stamm (Gruppe D)			
Pc	1992	Spanien	Roter Amerik. Sumpfkrebs

III. Eigene Untersuchungen

A. Material

1. Versuchstiere

1.1 Flusskrebse zur Wahl einer geeigneten Extraktionsmethode

Zur Untersuchung gelangte die Abdominalkutikula von 70 Edelkrebsen (*Astacus astacus*) aus einem natürlichen Krebspestausbuch im November 1999. Davon waren 30 männlich und 40 weiblich. Ihre durchschnittliche Größe (Rostrum-Schwanz-Länge) betrug 6,9 cm (4,9-9,5 cm), ihr Durchschnittsgewicht 10,0 g (4,4-22,8 g). Die Tiere stammten aus einer Krebszucht und zeigten die typischen Symptome der Krebspest wie Gliedmaßenverluste, Rückenlage, Kratzbewegungen, verminderte Abwehr und viele Todesfälle. Die Kutikula der Flusskrebse wurde sofort nach deren Verenden nach einer nach CERENIUS et al. (1984b) modifizierten Methode (SCHMID 1998, OIDTMANN et al. 1999) entnommen, von Muskulatur freipräpariert und in 70 %igem Ethanol (Rotisol[®], Roth) fixiert. Das so bei -20°C aufbewahrte Material wurde nach vier bis acht Wochen Lagerung extrahiert.

1.2 Flusskrebse zur Bestimmung der Sensitivität der PCR im Infektionsversuch

Die insgesamt 107 gesunden, krebspest-freien Edelkrebse (*Astacus astacus*) entstammten einer Krebszucht. Es handelte sich um ausschließlich männliche, zweisömmrige (zwei Jahre alte) Tiere mit einer Körperlänge von durchschnittlich 9,7 cm (7,2-12,8 cm) und einem Gewicht von 32,8 g (14-72 g). Die Krebse wurden zweieinhalb Monate bis zum Versuchsbeginn in einer Kunststofftonne mit Versteckmöglichkeiten, Sauerstoffversorgung und Wasserdurchlauf bei ca. 19°C im Institut für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten der LMU München gehältert und beobachtet, um sicher zu sein, dass sie klinisch gesund sind und keine Krebspest in sich tragen. Während dieser Zeit wurden sie alle drei Tage mit Fischmuskulatur und Karottenstückchen gefüttert.

1.3 Spontan erkrankte und nicht infizierte Flusskrebse

Die nicht infizierten Flusskrebse, deren Muskulatur und Kutikula zur Spezifitätskontrolle der Primer und zur Sensitivitätsbestimmung in der Spiked PCR (definierte Menge infektiöses Material auf eine definierte Menge Wirtsgewebe) benutzt wurde, kamen ebenfalls aus einer Zucht und wurden bereits mehrere Monate (5-6 Monate) im Institut für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten der LMU München gehalten.

Die 19 Tiere, die als diagnostisches Untersuchungsmaterial im Zeitraum der Anfertigung dieser Dissertation mit der Bitte um Abklärung einer Krebspestinfektion eingeschickt worden sind, stammten aus unterschiedlichen Entnahmen in Deutschland, der Schweiz, Schweden und England. Ihre Herkunft ist als Vorbericht im Ergebnisteil beschrieben.

2. Zur Untersuchung gelangte Pilzstämme und andere Proben

Für die Untersuchungen zur Spezifität der PCR wurden DNA-Extrakte (Eluate) aus reinen Pilz- bzw. Bakterien-Kulturen verwendet. Tabelle 8 zeigt eine Übersicht über die verwendeten Pilz-Stämme und andere Proben. Das Isolat M96/1 diente als Referenzstamm und wurde bei allen PCRs als Positiv-Kontrolle eingesetzt.

Tabelle 8: Untersuchte Isolate, ihr Isolationsort, -jahr und -tierart (Herkunft), sowie ihr natürliches Vorkommen

	Spezies:	Identif.-Nr. / -Kürzel:	Herkunft:	natürliches Vorkommen:
Aphanomyces astaci				
<i>Astacus</i> -Stamm (Gruppe A)	<i>Aphanomyces astaci</i>	L1	Schweden (1962) Edelkrebs	Parasit bei Flusskrebsen
	<i>Aphanomyces astaci</i>	Sv	Schweden (1970) Edelkrebs	Parasit bei Flusskrebsen
	<i>Aphanomyces astaci</i>	Ra	Schweden (1973) Edelkrebs	Parasit bei Flusskrebsen

Material

	<i>Aphanomyces astaci</i>	VI	Schweden (1970) Edelkrebs	Parasit bei Flusskrebsen
	<i>Aphanomyces astaci</i>	Da	Schweden (1973) Edelkrebs	Parasit bei Flusskrebsen
Pacifastacus-Stamm I (Gruppe B)	<i>Aphanomyces astaci</i>	Ti	Schweden (1970) Edelkrebs	Parasit bei Flusskrebsen
	<i>Aphanomyces astaci</i>	Yx	Schweden (1973) Edelkrebs	Parasit bei Flusskrebsen
	<i>Aphanomyces astaci</i>	FDL 457	England (1990) Dohlenkrebs	Parasit bei Flusskrebsen
	<i>Aphanomyces astaci</i>	M96/1	Deutschland (1996) Edelkrebs	Parasit bei Flusskrebsen
	<i>Aphanomyces astaci</i>	M96/2	Deutschland (1996) Edelkrebs	Parasit bei Flusskrebsen
	<i>Aphanomyces astaci</i>	Si	Schweden (1970) Edelkrebs	Parasit bei Flusskrebsen
	<i>Aphanomyces astaci</i>	PI	USA (1970) Signalkrebs	Parasit bei Flusskrebsen
	<i>Aphanomyces astaci</i>	SA	Schweden (1971) Signalkrebs	Parasit bei Flusskrebsen
	<i>Aphanomyces astaci</i>	Hö	Schweden (1974) Edelkrebs	Parasit bei Flusskrebsen
Pacifastacus-Stamm II (Gruppe C)	<i>Aphanomyces astaci</i>	Kv	Schweden (1978) Signalkrebs	Parasit bei Flusskrebsen
Procambarus-Stamm (Gruppe D)	<i>Aphanomyces astaci</i>	Pc	Spanien (1992) Roter Amerik. Sumpfkrebs	Parasit bei Flusskrebsen

undefinierte Genotypen	<i>Aphanomyces astaci</i>	F	Schweden	Parasit bei Flusskrebse
	<i>Aphanomyces astaci</i>	01	Schweden	Parasit bei Flusskrebse
	<i>Aphanomyces astaci</i>	G1	Schweden	Parasit bei Flusskrebse
	<i>Aphanomyces astaci</i>	E	Deutschland (1999) Edelkrebs	Parasit bei Flusskrebse
andere Aphanomyces spp.				
	<i>Aphanomyces cladogamus</i>	CBS 108.29		pflanzenpathogen
	<i>Aphanomyces cochloides</i>	CBS 477.71		aus <i>Beta vulgaris</i>
	<i>Aphanomyces euteiches</i>	CBS 154.73		pflanzenpathogen
	<i>Aphanomyces helicoides</i>	CBS 210.82	frühere UdSSR	Saprophyt, Wundparasit aquatischer Tiere
	<i>Aphanomyces iridis</i>	CBS 524.87	Japan	aus der Blattscheide von <i>Iris hollandica</i>
	<i>Aphanomyces irregulare</i>	CBS 278.81	Niederlande (Teich)	Saprophyt, Wundparasit aquatischer Tiere
	<i>Aphanomyces laevis</i>	CBS 107.52		Saprophyt, Wundparasit aquatischer Tiere
	<i>Aphanomyces brassicae</i>	CBS 121.80		aus <i>Brassica sp.</i>
	<i>Aphanomyces stellatus</i> syn. <i>Achlya racemosa</i>	CBS 578.67		Saprophyt in Wasser und Erde vorkommend, Wundparasit
Saprolegnia spp.				
	<i>Saprolegnia diclina</i>		Schweden	Saprophyt in Wasser und Schlamm
	<i>Saprolegnia ferax</i>	ATCC 26116		
	<i>Saprolegnia furcata</i>			
	<i>Saprolegnia litoralis</i>		Schweden	Saprophyt in Wasser und Schlamm
	<i>Saprolegnia parasitica</i>	CBS 540.67	England von Wasser einer Fischzucht	Saprophyt, Parasit bei Fischen und Krebsen
	<i>Saprolegnia terrestris</i>	UK 2102		

	<i>Saprolegnia monilifera</i> syn. <i>Isoachlya turoloides</i>	CBS 558.67	England	Saprophyt in Wasser und Schlamm
andere Oomycota spp.				
	<i>Isoachlya eccentrica</i>			
	<i>Leptolegnia sp.</i>	CBS 177.86		Saprophyt, Wundparasit
	<i>Pythium flevoense</i> , weiblich	CBS 232.72	aus <i>Daphnia</i> <i>sp.</i> , Niederlande	Saprophyt in Wasser und Erde, pflanzenpathogen
nicht-Oomycota spp.				
	<i>Fusarium solani</i>		unbekannt	Parasit bei Krebsen, Pflanzen (Kartoffeln) und Säugetieren, in der Erde vorkommend
	<i>Trichosporon beigeli</i>	DSM 70675		Parasit bei Krebsen, Insekten und Säugetieren, Saprophyt in Erde, Schlamm und Wasser
	<i>Aspergillus sp.</i>		Deutschland (1998)	Saprophyt
	<i>Candida albicans</i>		Deutschland (1998)	Parasit im Orointestinaltrakt von Säugetieren
	<i>Mucor sp.</i>		Deutschland (1998)	Saprophyt
andere Parasiten				
	<i>Thelohania contejeani</i> (Mikrosporidia)		Deutschland (2000)	Parasit bei Flusskrebse
	<i>Psorospermium haeckeli</i>		Deutschland (2000)	Parasit bei Flusskrebse
Bakterien				
	<i>Aeromonas hydrophila</i> syn. <i>caviae</i>		Deutschland (2000)	gramnegatives Bakterium bei v.a. Fischen, Reptilien, Amphibien und Krebse (auch Säugetieren)
	<i>Citrobacter freundii</i>		Deutschland (2000)	gramnegatives Bakterium bei Mensch und Tier, in Wasser und auf Pflanzen

	<i>Hafnia alvei</i>		Deutschland (2000)	gramnegatives Bakterium bei Mensch und Tier, in Wasser und Erde
Flusskrebse				
	<i>Astacus astacus</i>		Deutschland (2000)	
	<i>Procambarus clarkii</i>		Deutschland (2000)	
	<i>Pacifastacus leniusculus</i>		Deutschland (2000)	

(**Identif.-Nr./-Kürzel:** Identifikationsnummer, bzw.-kürzel; **syn.:** synonym; **CBS:** Centraalbureau for schimmelcultures, Niederlande)

3. Molekularbiologische Reagenzien und Kits

3.1 DNA-Extraktion:

Chloroform:Isoamylalkohol 24:1 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, C0549)

DNeasy[®] Plant Maxi Kit (Qiagen, 68161)

DNeasy[®] Plant Mini Kit (Qiagen, 69103)

DNeasy[®] Tissue Kit (Qiagen, 69504)

Ethanol \geq 99,9% (Rotisol[®]) (Roth, 7917.1)

Isopropanol (2-Propanol) (Roth, 6752.1)

E.Z.N.A.[®] Invertebrate DNA Kit (Peqlab, 12-3473-01)

Nucleon Phytopure[®] for Plant DNA Extraction Kit (Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, RPN8511)

Proteinase K (Roth, 7528.1)

3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR):

dNTPs (Desoxynucleosidtriphosphate) (Roth, K039.1)

MgCl₂ (Magnesiumchlorid)(mit jeweiliger Taq mitgeliefert)

PCR Optimizer[™] Kit (Invitrogen, K1220-01)

10x PCR-Puffer (15 mM MgCl₂) (mit jeweiliger Taq mitgeliefert)

PCR-Reaktionsgefäße (Biozym, 711008)

Primer (MWG Biotech AG; siehe 6. Oligonukleotid-Primer)

Taq DNA Polymerase (Boehringer, Mannheim, 1146 173)

(Eppendorf, 0032007.724)

(Peqlab, 01-1040)

3.3 Gelelektrophorese:

Agarose (StandardLow-MR 100, NEEO Ultra Qualität) (Roth, 2267.4)

DNA-Größenmarker SLL 100 (100 bp) (Roth, L494.1)

DNA-Größenmarker EZ Load™ 20 bp Molecular Ruler (Bio-Rad Laboratories, 170-8351)

DNA Quantitation-Standard (500 bp) (Roth, L507.1)

50x TAE Elektrophorese-Puffer:

Trizma® Base Molecular Biology Reagent (Sigma-Aldrich, T6066)

EDTA Molecular Biology Reagent (Sigma-Aldrich, E5134)

Acetic Acid Glacial (Essigsäure) (Sigma-Aldrich, A6283)

Ethidiumbromid (10 mg/ml) (BioRad, 161-0433)

3.4 Aufreinigung:

QIAGEN Plasmid Midi Kit (Qiagen, 12143)

QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, 28104)

3.5 Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP):

Restriktionsenzyme: *Hinf*I (New England Biolabs, R0155S)

*Hph*I (New England Biolabs, R0158S)

3.6 Sequenzierung:

Automatische Sequenzierung (GENterprise, Gesellschaft für Genanalyse und Biotechnologie mbH)

4. Geräte

BioPhotometer (Eppendorf Gerätebau GmbH)

Elektrophorese-Kammern, verschiedene Größen (Sub-Cell GT) (Bio-Rad)

Mikrowelle (mtc, MW 7801G)

Photosystem, Bioprint DS Fotodokumentations-System zur Bildspeicherung

(Ltf-Labortechnik GmbH & Co. KG, 8176) mit Software (Bio-Capt, Version 1997)

Präzisionswaage, Sartorius Basic^{plus} (Sartorius AG, BP 410s-OCE)

Software zur DNA-Analyse (Lasergene for Windows, DNASTAR, Inc., Version 1997)

Thermocycler, Mastercycler gradient[®] (Eppendorf Gerätebau GmbH, 5331 000.010)

5. Rezepturen für selbsthergestellte Puffer, Lösungen und Anzuchtmedien

5.1 PG₁- (Pepton-Glukose-) Medium und –Agar

(UNESTAM 1965, UNESTAM 1969b)

1. Fleischpepton, tryptisch verdaut 3 g (Oxoid, L37)
2. D(+)-Glucose-Monohydrat 6 g (Merck, 1.08342)
3. Salz II A
4. Phosphat-Puffer

1. bis 4. in jeweils 100 ml Aqua dest. lösen und separat, sowie 600 ml Aqua dest., autoklavieren. Nach Abkühlen der Reagenzien werden alle Bestandteile unter sterilen Bedingungen zu einem Liter zusammengemischt.

Für den PG₁-Agar wird zu 1 Liter PG₁-Medium 15 g Agar bacteriological (Oxoid, L11) gegeben und autoklaviert (15 min./120°C)

Material

Salz II A:

0,83 mM MgCl ₂ •6H ₂ O	170 mg	(Merck, 5833)
0,98 mM CaCl ₂ •2H ₂ O	145 mg	(Merck, 2381)
0,07 mM FeCl ₃ •6H ₂ O	20 mg	(Merck, 103943)
4,96 mM KCl	370 mg	(Merck, 4936)
0,15 mM Na ₂ EDTA	55 mg	(Merck, 159294)

Phosphat-Puffer (pH 6.7):

6 mM NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	0,920 g	(Merck, 6346)
6 mM Na ₂ HPO ₄ •2H ₂ O	1,185 g	(Merck, 6580)

5.2 LB-Medium und –Agar

NaOH (2 N)	2 ml	(Merck, 109163)
Trypton/Pepton aus Casein	10 g	(Roth, 8952)
Hefeextrakt, granuliert	5 g	(Merck, 1.03753)
NaCl	5 g	(Merck, 1.06406)
Aqua bidest.	1 l	

mischen und autoklavieren. Für die Herstellung des Agars werden dem Medium noch 12 g Agarose zugesetzt. Die Zusätze werden erst nach Abkühlen des Mediums/Agars auf etwa 45°C zugegeben.

Zusätze:

Ampicillin (50 mg/ml)	1 ml	(Roth, K029)
IPTG (0,1 M)	0,2 mM	(Roth, 2316)
X-Gal (20 mg/ml):	40 g/ml	(Roth, 2315)

5.3 TAE-(Tris-Acetat-EDTA-) Puffer

TAE-Puffer 50x (Sigma-Aldrich):

Tris Base:	242 g
Essigsäure 100 % (Acetic Acid 100 %):	57,1 ml
EDTA:	37,2 g
Aqua dest. autoklaviert:	ad 1 l

TAE-Gebrauchslösung 1x:

TAE 50x:	20 ml
Aqua dest. steril:	980 ml

5.4 dNTP-Mix für die PCR

dNTP-Set 1 (Roth):

dATP-Na ₄ (100 mM):	25 µl
dCTP-Na ₄ (100 mM):	25 µl
dGTP-Na ₄ (100 mM):	25 µl
dTTP-Na ₄ (100 mM):	25 µl

mischen und 1:10 mit sterilem Aqua inj. verdünnen (10 mM; 2,5 mM je).

5.5 DNA-Molekulargewichtsmarker für die Elektrophorese

SLL 100 (Roth):

Dieser Molekulargewichtsstandard wurde zusammen mit den PCR-Produkten im Agarose Gel aufgetragen und folgendermaßen eingesetzt:

100 bp Ladder (100 µg/ml):	2 µl
6x Loading Buffer (mitgeliefert):	2,5 µl
steriles Aqua inj. :	ad 15 µl

Dabei enthält eine Bande des Markers ~20 ng DNA.

EZ Load™ 20 bp Molecular Ruler (Bio-Rad):

Dieser Marker wurde als Größenstandard mit den Produkten der Restriktionsenzym-Verdauung im Gel eingesetzt. Die Ladder und der Loading Buffer wurden schon fertig gemischt geliefert. Von dieser Mischung wurden 5 µl (500 ng) im Gel aufgetragen, wobei jede Bande ~9,6 ng DNA, die Referenzbande bei 200 bp die dreifache Menge enthält.

6. Oligonukleotid-Primer

Vergleichende Sequenzanalysen des die ITS-Region kodierenden Gens von *Aphanomyces astaci*, anderen Oomycota und Krebsen waren die Basis für die Entwicklung von Primern, die „gattungsspezifisch“ („NS“-Primer) für *Aphanomyces* spp. (vorliegende Arbeit), bzw. „spezies-spezifisch“ („BO“-Primer) für *Aphanomyces astaci* (OIDTMANN, unveröffentlicht) sein sollten. Tabelle 9 zeigt die Sequenzen dieser Primer, die von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg) bezogen wurden. Die Primer, die in der Spezifitätstestung als Positivkontrolle für Nicht-*Aphanomyces*-Arten eingesetzt wurden, sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 9: Darstellung der im Rahmen der vorliegenden Arbeit konstruierten („NS“, gattungsspezifisch) und getesteten („BO“, speziesspezifisch) Primer (F: “forward” Primer; R: “reverse” Primer)

Name des Primers:		DNA-Sequenz (5' → 3') der Primer:	Referenz:
NS 166	F	C(AG)T CAG AAA TGA TAG CTT GT	vorliegende Arbeit
NS 170	F	CAG AAA TGA TAG CTT GTA ATA	vorliegende Arbeit
NS 310	F	CTT TCG GGT TAG TCC TGG	vorliegende Arbeit
NS 318	F	GGT AGT CCT GGA AGT ATG TC	vorliegende Arbeit
NS 681	R	TTC AGC GGG TAG TCT TGT C	vorliegende Arbeit
NS 700	R	CCG CTT ATT GAA TAT GCT TAA A	vorliegende Arbeit
BO 525	F	AAG AAG GCT AAA TTG CGG TA	OIDTMANN, unveröffentlicht
BO 591	R	CTA TCC GAC TCC GCA TTC TG	OIDTMANN, unveröffentlicht

Tabelle 10: Darstellung der im Rahmen der Spezifitätsüberprüfung der in dieser Arbeit entwickelten PCR als „Positivkontrolle“ eingesetzten Primer

Name des Primers:	DNA-Sequenz (5' → 3') der Primer:	Referenz:
Primer zum Nachweis von anderen Oomycota und Pilzen :		
ITS 1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	WHITE et al. 1990
ITS 4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	WHITE et al. 1990
Primer zum Nachweis von Krebsgewebe :		
143 F	TGC CTT ATC AGC T(AGCT)T CGA TTG TAG	LO et al. 1996
145 R	TTC AG(AGCT) TTT GCA ACC ATA CTT CCC	LO et al. 1996
Primer zum Nachweis von Bakterien:		
CSPU 3	CCC GGA TCC GGT TAC GTT A(GC)C (AT)GC T(TG)(CG) (ACT)GG (TGA)CC	FRANCIS und STEWART 1997
CSPU 5	CCC GAA TTC GGT A(ATC)A GTA AAA TGG TT(TC) AAC (GT)C	FRANCIS und STEWART 1997
Primer zum Nachweis von Mikrosporidien:		
MIC 5-1	ATA ACA GGT CAG TGA TGC CCT	FELLER, 2002
MIC 3-4	ACC CTA ATA TCC ATC TGA GA	FELLER, 2002

B. Methoden

1. Gewinnung und Auszählung der Sporen

Zur Ermittlung der Sensitivität der PCR und zur Infektion der Versuchstiere wurden Zoosporen benötigt, die von dem *Aphanomyces astaci*-Referenzstamm M96/1 gewonnen wurden. Die Pilzreinkultur, die als Stockkultur in Form eines Schrägagarröhrchens aufbewahrt und auf einer PG1-Agarplatte subkultiviert wurde, wuchs nach sterilem Verbringen in PG1-Medium dreidimensional an und wurde nach der von SCHMID (1998) entwickelten Methode A mit Mycelfragmentierung schließlich in autoklaviertes Flusswasser (Gröbenbach, Gröbenzell) überführt. Nach gründlichem Auswaschen allen PG1-Mediums kam es durch den Nährstoffentzug zur Zoosporogenese. Zwei Tage wurde das Mycel in dem Wasser auf einem Rüttler bei 18°C inkubiert, danach durch ein doppelt gelegtes Gazestück filtriert. Das Filtrat wurde auf die Sporenausbeute mit einer Neubauer Zählkammer untersucht (Abbildung 12). Dabei wurden fünf Stichproben des Filtrats in den 18 Quadraten der Kammer ausgezählt und die **Sporendichte pro ml Filtrat** durch folgende Formel ermittelt:

$$\frac{\text{ausgezählte Sporen} \times 10 \times 1000}{18}$$

Dabei beträgt die Größe eines der ausgezählten Quadrate 1 mm (Kantenlänge) x 0,1 mm (Tiefe) = 0,1 mm³. Die Faktoren x 10 und x 1000 dienen dabei der Umrechnung von 0,1 mm³ auf 1 mm³ (= pro 1 µl) und von diesem auf 1 cm³ (= pro 1 ml).

Sofort nach Befüllen der Zählkammer wurde der Anteil an motilen Zoosporen prozentual geschätzt.

2. Infektion durch Zoosporenexposition

Es gelangten insgesamt 107 krebspestfreie, zweisömmrige, männliche Edelkrebse zur Untersuchung. Nach Anlieferung von 120 Edelkrebsen im Institut für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten der LMU München wurden diese zweieinhalb Monate bis zum Infektionsbeginn in einer 150 l fassenden Kunststofftonne mit Versteck-

möglichkeiten, Fütterung alle drei Tage, Sauerstoffversorgung und Wasserdurchlauf bei ca. 19°C gehältert. Zwei Krebse verstarben nach ihrer Häutung durch Kannibalismus ihrer Artgenossen. Ansonsten wurden in dieser Zeit keine weiteren Verluste beobachtet. Somit konnte die Krebspestfreiheit bestätigt werden. Vier Tage vor der Zoosporenexposition wurden 105 der Tiere in 7 Flatdecks (42 x 25 x 15 cm) mit je 10 l Wasser, Kieselgurluftausströmer, aber ohne Verstecke und Wasserdurchlauf à 15 Edelkrebse umgesetzt. Zwei Tage vor der Infektion fand die letzte Fütterung statt, am Tag vor der Infektion der letzte Wasserwechsel. Für die Infektionsversuche wurden dem Aquarienwasser *Aphanomyces astaci*-Zoosporen des Referenzstammes M96/1 in unterschiedlichen Dosen zugesetzt. Die Produktion und Auszählung der Sporen fand wie oben (III.1) beschrieben statt. Zur Befüllung der Aquarien wurde Leitungswasser der Stadt München verwendet (Gesamthärte 18,1 dH°; pH 7,5; Ca²⁺ 94,5 mg/l; Mg²⁺ 21,2 mg/l; Ca:Mg = 4,5:1). Die je Flatdeck einzufüllende Wassermenge wurde ad 10 Liter berechnet, wobei das sporenhaltige Wasser mit den Konzentrationen 10 Sporen/ml, 100 Sporen/ml und 1000 Sporen/ml zuletzt vorsichtig zugesetzt wurde, um eine Abkapselung der Sekundärsporen durch Agitation zu vermeiden. Es wurden je zwei Aquarien à 15 Edelkrebse mit der gleichen Sporenkonzentration präpariert, ein Flatdeck mit 15 Krebsen diente als Kontrollgruppe und wurde nicht mit Sporen versetzt. In der ersten Stunde der Zoosporenexposition wurde der Luftausströmer entfernt, um eine schon erwähnte Enzystierung der Zoosporen zu unterbinden, die die Infektion der Tiere beeinträchtigen könnte. Während der Versuchszeit fand keine Fütterung der Tiere statt, der Luftausströmer wurde auf mittlere Abgabestärke eingestellt und alle sieben Tage wurde ein Teilwasserwechsel von 4 l durchgeführt. Die Wassertemperatur betrug während der Versuche 19°C (± 1°C). Mehrmals täglich fand eine Kontrolle der Tiere hinsichtlich des Auftretens von Symptomen und Todesfällen statt. Verendete Tiere wurden sofort entfernt. Alle zwei Tage wurde pro Infektionsdosis ein vitaler Edelkrebs entnommen und euthanasiert (III.1). Die toten Tiere wurden am selben Tag seziiert (SCHMID 1998, OIDTMANN et al. 1999), lichtmikroskopisch untersucht (III.1.) und ca. 50 mg (entsprach etwa 2-3 Segmenten) von Muskulatur befreite, weiche Abdominalkutikula zur DNA-Extraktion (DNeasy[®] Tissue Kit, Qiagen) verwendet. Das Eluat wurde, wie unter III.4.3. beschrieben, in die einfachen PCRs sowie in die Nested PCR mit den Primern NS 166/NS 681 und BO 525/BO 640 und in die Semi-Nested PCR mit den Primern NS 166/NS 681 und NS 170/NS 681 eingesetzt. Während der ersten drei Tage des Versuchs verstarb ein Edelkrebs der Gruppe 10 Sporen/ml über Nacht aufgrund Kannibalismus und einer der Gruppe 1000 Sporen/ml nach seiner

Häutung. Bei Ersterem fehlten Teile des Schwanzes; beide Tiere waren autolytisch und konnten nur noch teilweise untersucht werden. Sie wurden sofort durch extra gekennzeichnete Edelkrebse ersetzt. So standen für die Auswertung der Zoosporenexposition von 10 und 1000 Sporen/ml jeweils 31 Tiere, von 100 Sporen/ml 30 Krebse zur Verfügung.

3. Lichtmikroskopische Untersuchungen der Abdominalkutikula

Noch lebende, infizierte Edelkrebse wurden mit Chloroform in einem dicht verschlossenen Gefäß euthanasiert. Bis zum Tod vergingen 1-5 Minuten. Um sicher zu gehen, wurde den Tieren vor der Sektion der Kopf mit einem Scherenschnitt entfernt, wodurch der sichere Tod durch Durchtrennung der strickleiterförmigen Ganglienkeite eintrat. Die Abdominalkutikula der getöteten und der verendeten Krebse wurde nach der modifizierten Sektionsmethode nach SCHMID (1998) freipräpariert und nach der Entfernung der harten Kutikulastege lichtmikroskopisch auf das Vorhandensein von Pilzhyphen, Melanisierungen und sonstigen Besonderheiten untersucht. Es wurden die größeren fünf Segmente verwendet, die von kranial nach kaudal als Segment 1 bis 5 bezeichnet wurden (Abbildung 13). Die Befallsintensität der einzelnen Abschnitte wurde nach der Methode von KLÄRDING (2001) beurteilt, die den Flächenanteil der Hyphen anhand von Referenzabbildungen ermittelte. Dabei entspricht ein Befall mit vereinzelt Hyphen (< 2 %) in einem Segment der Befallsintensität 1(+), 2-6 % Flächenanteil der Hyphen der Befallsintensität 2 (++) , 6-10 % der Befallsintensität 3 (+++) und ein dichtes, sich überlagerndes Mycel, das über 10 % der Gesamtfläche ausmacht, der Befallsintensität 4 (++++). Die so untersuchten Kutikulasegmente wurden entweder nach Lagerung in 70 % Ethanol bei -20°C (III.C.1.1, bei der Wahl der Extraktionsmethode) oder direkt frisch (III.C.2, bei den Infektionsversuchen) zur DNA-Isolation eingesetzt.

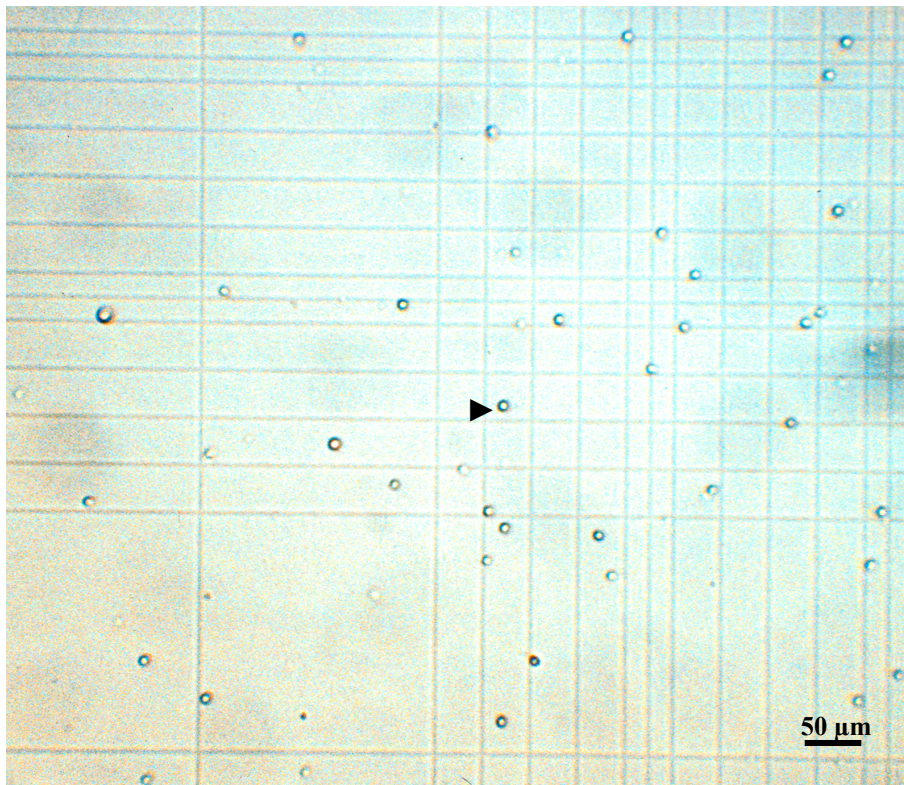


Abbildung 12: Auszählung von Zoosporen(►) in der Neubauer Zählkammer

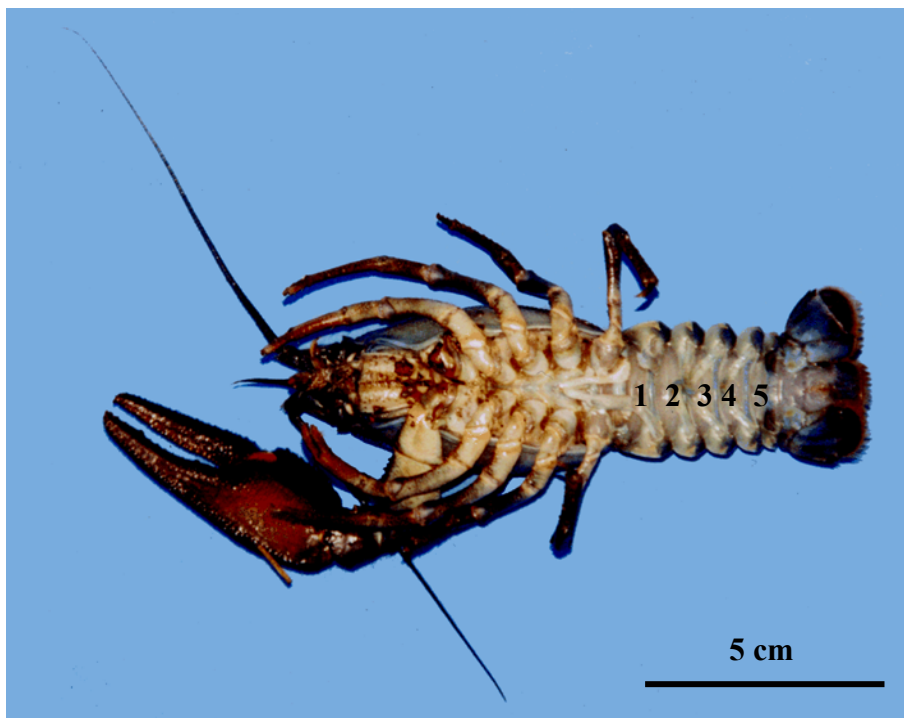


Abbildung 13: Krebspestinfizierter, männlicher Edelkrebs von ventral, Verlust der linken Schere; **1 bis 5:** untersuchte Segmente der Abdominalkutikula

4. Molekularbiologische Untersuchungen

4.1 DNA-Isolation

Zur molekularbiologischen Diagnose der Krebspest muss zunächst die DNA aus dem Probenmaterial isoliert werden. Da zum einen DNAsen ubiquitär vorkommen (im Labor auf Arbeitsflächen, Geräten, der Haut) und zum anderen Kontaminationen mit Erreger-DNA aus früheren Extraktionen und PCRs das Ergebnis einer Extraktion beeinflussen können, muss bei der DNA-Isolierung auf äußerste Gewissenhaftigkeit und sterile Bedingungen geachtet werden. Deshalb wurde, wo möglich, mit Einmalartikeln gearbeitet, Einmalhandschuhe während der Extraktion mehrfach gewechselt, Einmalpipettenspitzen mit Filter verwendet und alle Reagenzien dicht verschlossen und örtlich getrennt von der Erreger-DNA aufbewahrt. Nach der Extraktion wurde der Arbeitsplatz und die Mörser desinfiziert und mit Wasserstoffperoxid gereinigt, Letztere autoklaviert und die Pipetten in regelmäßigen Abständen mit UV-Licht bestrahlt. Die DNA-Extraktion, PCR und Agarose-Gelelektrophorese fanden jeweils in unterschiedlichen Räumen statt, die mit eigenen Geräten (Pipetten, Handschuhe, Gefäßständer etc.) ausgestattet waren.

4.1.1. DNA-Extraktion aus dem Mycel von Reinkulturen

Die Spezifität der PCR wurde anhand DNA getestet, die aus DNA-Extraktionen von dem Mycel reiner Pilzkulturen stammt, um sicherzustellen, dass die Reaktion ausschließlich mit der Ziel-DNA erfolgen kann. Eingesetzt wurden unterschiedliche Stämme von *Aphanomyces astaci* sowie andere Oomycota und Pilze, die saprophytär als Wundparasiten bei aquatischen Tieren oder im Wasser vorkommen und in Tabelle 9 aufgelistet sind.

PG1-Medium (UNESTAM 1965, UNESTAM 1969b) wurde direkt mit Mycelstanzen der Reinkultur beimpft und drei Tage bei 21°C auf einem Rüttler inkubiert. Das entstandene dreidimensionale Mycel, das mehr Ausbeute erbrachte als auf Agarplatten angewachsenes, wurde, nach sorgfältigem Abgießen des Nährmediums und Entfernen der anhaftenden Agarstanzen, abgewogen, in flüssigem Stickstoff zermörsert und nach Anleitung des Herstellers in dem kommerziellen DNeasy[®] Plant Kit (Qiagen) weiter aufbereitet. Dieses basiert auf einer mechanischen und chemischen Lyse des Gewebes und Entfernung

unerwünschter Bestandteile durch Zentrifugationsschritte. Die DNA wird dabei spezifisch an eine Silikagel-Membran gebunden, durch die Kontaminanten und Enzyminhibitoren ausgewaschen werden können. Die DNA wurde abschließend mit 100 µl (DNeasy® Plant Mini Kit) bzw. 750 µl (DNeasy® Plant Maxi Kit) AE-Puffer in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß eluiert und bei -20°C gelagert.

4.1.2 DNA-Extraktion aus *Aphanomyces astaci*-Sporen

Um die Sensitivität der PCR zu testen, wurden definierte Mengen an Zoosporen eingesetzt. Wie oben bereits beschriebenes, in PG1-Medium angezüchtetes Mycel des *Aphanomyces astaci*-Isolates M96/1 wurde durch Nährstoffentzug nach der nach CERENIUS et al. (1984a) modifizierten Methode A mit Mycelfragmentierung (SCHMID 1998) zur Zoosporenproduktion angeregt. Die Sporenkonzentration wurde durch die Auszählung von fünf Stichproben der Sporensuspension in der Neubauer Zählkammer ermittelt. Durch Verdünnungen wurde die gewünschte höchste Konzentration hergestellt, diese zur Kontrolle nochmals ausgezählt und eine 1:10 Verdünnungsreihe vorbereitet. Die Verdünnungen bestanden aus jeweils einem ml Sporensuspension mit 10, 100 oder 1000 Zoosporen und wurden im Dreifachansatz durchgeführt. Zwei davon wurden in den beiden Kits eingesetzt, eine diente zur erneuten Kontrollauszählung. Nach Zentrifugation bei 10000 x g für 10 Minuten wurde der Überstand verworfen und das Sporenpellet in 20 µl Aqua injectabile resuspendiert. Diese Suspension wurde zum Vergleich in zwei unterschiedliche Extraktionskits, dem Nucleon Phytopure® for Plant DNA Extraction Kit und dem DNeasy® Tissue Kit, eingesetzt. Das Elutionsvolumen betrug in beiden Fällen 100 µl, von denen 10 µl in die PCR eingesetzt wurden.

4.1.3 DNA-Extraktion von *Aphanomyces astaci* aus Krebsgewebe

Bisher ist noch kein Protokoll zur Isolierung von Pilz-DNA aus infiziertem Invertebraten-Gewebe beschrieben worden. Um eine geeignete Vorgehensweise zu finden, wurden drei Extraktionsmethoden verglichen. Als Gewebe wurde die von Muskulatur befreite Abdominalkutikula von Edelkrebse eingesetzt. Diese ist zu diesem Zweck besonders

geeignet, da sie zu den häufig befallenen Stellen gehört (KLÄRDING 2001), sie zellarm ist und somit wenig Wirts-DNA im Vergleich zur Erreger-DNA enthält, und eine Kontrolle der Infektion durch lichtmikroskopische Beurteilung der Befallsstärke möglich macht. Die zur Untersuchung gelangte Kutikula stammte von Edelkrebsen (*Astacus astacus*) aus einem natürlichen Krebspestausbuch im November 1999 (Tagebuch-Nr. 2093/99) und wurde nach Sektion der Tiere in 70 %igem Ethanol (Rotisol[®]) fixiert und bei -20°C vier bis acht Wochen aufbewahrt. Parallel wurden Extraktionen mit frischem Material durchgeführt. Es wurde ausschließlich Kutikula mit einem hohen Befallsgrad (Befallsintensität 3 und 4, KLÄRDING 2001) eingesetzt. Zur Kontrolle wurden die beiden Extraktionsmethoden mit den Fertigkits zweifach mit dem gleichen Ansatz getestet. Bei allen Isolationsmethoden wurde die mit einem sterilen Skalpell von Muskulatur befreite Abdominalkutikula nach lichtmikroskopischer Untersuchung abgewogen und in einem Mörser unter Zugabe von flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver verrieben, das in dem jeweiligen Extraktionspuffer resuspendiert wurde. Parallel zur Aufbereitung der infizierten Kutikula wurde eine Negativprobe ohne Krebsgewebe mitgeführt, um eine Verunreinigung der Reagenzien ausschließen zu können.

Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion

Bei Anwendung der nach PÄÄBO (1990) modifizierte Methode wurden 200 mg Krebs-Kutikula in flüssigem Stickstoff zermörsert. Das so gewonnene Pulver wurde in 4 ml Extraktionspuffer (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 2 mM EDTA, 10 mg/ml DTT, 0,5 mg/ml Proteinase K, 0,1 % SDS) aufgelöst und bei 37°C auf einem Rüttler (niedrige Stufe) über Nacht inkubiert. Nach zweimaliger Zugabe des gleichen Volumens mit 1 M Tris HCl (pH 8,0) gesättigtem Phenols und Mischen der Lösung, wurde die wässrige Phase von der phenolhaltigen Phase durch Zentrifugation getrennt. Die wässrige Phase wurde dann mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1 V/V) extrahiert und nach Zentrifugation der wässrige Überstand abgenommen. Mit 0,1 Vol Natrium Acetat (pH 5,2) wurde die DNA präzipitiert und 2 Vol gekühltes 100 % Ethanol (Rotisol[®]) über Nacht dazugegeben. Nach zweimaligem Waschen wurde der über dem Pellet befindliche Alkohol entfernt und das Pellet getrocknet. Dieses wurde schließlich in 100 µl sterilem Aqua inj. oder TE-Puffer resuspendiert. Diese Methode wurde anfänglich an natürlich infizierten Krebsen getestet, fand aber im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit keine Anwendung.

DNeasy® Tissue Kit (Qiagen)

Das Kit wurde entsprechend des Protokolls für die Isolation genomischer DNA aus Insekten eingesetzt. Insgesamt 150 mg (12 Segmente) hochgradig infizierte weiche Abdominalkutikula wurden in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zermörsert und die dreifache Menge ATL-Puffer dazugegeben. Nach gründlicher Mischung auf einem Vortex® wurde die Lösung gleichmäßig in drei 1,5 ml Eppendorfgefäße aufgeteilt und Proteinase K in drei verschiedenen Konzentrationen dem Extraktionspuffer zugesetzt: 2 (vom Hersteller empfohlen), 4 und 8 mg/ml. Es folgte eine dreistündige Inkubation bei 56°C im Wasserbad, nach der das eingesetzte Pulver fast vollständig lysiert war. Unter Verwendung einer speziellen Säule und Zugabe verschiedener Puffer fand eine selektive Bindung der DNA an eine Silikagel-Membran statt. Durch Zentrifugationsschritte wurden Enzyminhibitoren (Proteine, zweiwertige Kationen) und Kontaminanten ausgewaschen. Die Elution der DNA erfolgte in 100 µl AE-Puffer. Von diesen wurde 1 µl in der spezifischen PCR mit den Primern BO 525 und BO 640 eingesetzt.

E.Z.N.A.® Invertebrate DNA Kit (Peqlab)

Die Aufbereitung der Abdominalkutikula erfolgte wie bei dem DNeasy® Tissue Kit. Kurz vor Zugabe der unterschiedlichen Konzentrationen an Proteinase K fand, wie oben beschrieben, eine Aufteilung in drei verschiedene Gefäße mit den kateigenen Puffern statt. Wieder wurde in 100 µl eluiert und 1 µl davon in der PCR eingesetzt. Um eine höhere Ausbeute durch eine verlängerte Inkubationszeit zu überprüfen, wurde parallel ein Ansatz mit 2, 4, 8 und 10 mg/ml Proteinase K durchgeführt, der 24 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert wurde. Das Kit basiert wie das von Qiagen auf einer Silikagel-Adsorption. Kontaminationen werden durch ein entwickeltes Puffersystem und eine Extraktion mit CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid) und Chloroform über Zentrifugationsschritte entfernt. Dabei werden die DNA-Moleküle an eine in einer HiBind®-Zentrifugensäule enthaltene Silikamembran gebunden. Abschließend wird die DNA in einem Niedrigsalzpuffer eluiert.

Im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde zur Isolation von *Aphanomyces astaci*-DNA sowie der DNA von gesundem Krebsgewebe und Pathogenen, die keine Pilze sind, das DNeasy® Tissue Kit eingesetzt. Nach Optimierung der PCR wurde statt dem oben beschriebenen 1 µl DNA-Eluat 10 µl in die PCR eingesetzt.

4.2 Auswahl der Primer

Verschiedene DNA-Sequenzen, die aus der *NCBI Genbank* bezogen wurden, und unveröffentlichte Sequenzen der ITS-Region von Oomycota wurden mit einer speziellen Software zur DNA-Analyse (Lasergene for Windows, DNASTAR, Inc., Version 1997) aligned und nach manueller Überprüfung der Daten zur Auswahl geeigneter Oligonukleotidprimer herangezogen (Anhang, Abbildung 61). Die *Aphanomyces astaci*-spezifischen Primer BO 525 („forward primer“, „upstream primer“) und BO 640 („reverse primer“, „downstream primer“) waren schon zuvor festgelegt worden (OIDTMANN, unveröffentlicht). Für die Entwicklung einer Nested PCR („geschachtelte PCR“) wurde eine Auswahl von sechs Primern, vier „forward“ und zwei „reverse“ Primer, im Rahmen dieser Arbeit konstruiert (Anhang, Abbildung 61). Eine Auswahl dieser sollten als äußere Primer für die zuvor erwähnten spezies-spezifischen dienen und ein alternatives Vorgehen in der Diagnostik bieten. Ihre Nomenklatur ergab sich aus der Position ihres 3`-Endes innerhalb der ITS-Region des Referenzstammes M96/1. Die vier vorwärts lesenden Primer (NS 166, NS 170, NS 310, NS 318) wurden mit den zwei rückwärts lesenden Primern (NS 681, NS 700) untereinander kombiniert, optimiert und ihre Spezifität überprüft. Zur Optimierung der Primer und PCR-Bedingungen wurden unterschiedliche Zyklenzahlen, Annealing-Temperaturen, Konzentrationen an MgCl₂, dNTPS und *Taq*, sowie der Zusatz des Kosolvens DMSO verglichen und das beste Ergebnis mit der höchsten Effizienz ermittelt. Um die richtige Zusammensetzung des PCR-Puffers zu finden, wurde das PCR Optimizer Kit™ Kit (Invitrogen) eingesetzt, dessen verschiedene Puffer unterschiedliche Magnesium-Konzentrationen mit variierenden pH-Werten kombinieren.

Die Sequenzierungen wurden bei der Firma *GENterprise* (Mainz) durchgeführt. Dabei wurden die Primer ITS 1/ITS 4 (WHITE et al. 1990) eingesetzt, um die vollständige Sequenz der ITS-Region zu erhalten.

4.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die hier entwickelte PCR erfolgt als sogenannte „Nested PCR“ (verschachtelte PCR) mit „äußeren“ Primern, NS 166 und NS 681, und in einem zweiten Durchgang mit „inneren“ Primern, BO 525 und 640. Die zweite Möglichkeit, eine Semi-Nested PCR (ein Primer findet sowohl bei der äußeren als auch bei der inneren PCR Einsatz), setzte das Produkt der Primer NS 166/ NS 681 in die innere PCR mit der Primerkombination NS 170/NS 681 ein. Die Bezeichnung der neu entwickelten Primer erfolgte durch Lage ihres 3'-Endes in der ITS-Region des *Aphanomyces astaci*-Referenzstammes M96/1 (siehe auch Anhang Abbildung 61). Die PCRs wurden unter standardisierten Bedingungen in einem Thermocycler (Mastercycler gradient[®], Eppendorf Gerätebau GmbH) durchgeführt. Dabei fanden die PCRs einzeln, mit Einsatz von je 10 µl DNA-Lösung des Referenzstammes M96/1, als auch in der hintereinandergeschalteten (Semi-)Nested PCR Anwendung, bei der in der ersten PCR (Primerpaar NS 166 und NS 681) 10 µl genomische DNA und in der zweiten (Primerpaar BO 525/BO 640 bzw. NS 170/NS 681) 1 µl des PCR-Produktes der vorangegangenen PCR eingesetzt wurde. Tabelle 11 zeigt die jeweiligen PCR-Protokolle und Reaktionsbedingungen. In dem 10x Reaktionspuffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,8; 500 mM KCl) sind bereits 15 mM MgCl₂ enthalten. Alle Zutaten bis auf die DNA wurden in einem gesonderten Raum zusammengemischt („Mastermix“) und auf Eis gestellt. Die DNA-Zugabe erfolgte örtlich getrennt. Für die Nested PCR wurde 1 µl des PCR-Produktes mit den Primern NS 166/ NS 681 eingesetzt, dafür wurde das Wasservolumen auf 37,45 µl (ad 50 µl) erhöht. Die Reaktionsbedingungen für die übrigen Parameter blieben gleich.

Tabelle 11: Darstellung der in die jeweilige PCR eingesetzten Mengen und Endkonzentrationen der Komponenten und des zeitlichen Ablaufes der temperaturabhängigen Reaktionsschritte für die Primerkombinationen NS 166 und NS 681, NS 170 und NS 681, sowie BO 525 und BO 640 unter Angabe der erwarteten Produktlänge

PCR mit....	Primer NS 166/NS 681 bzw. Primer NS 170/NS 681		Primer BO 525/BO 640	
	Volumen/ Reaktion:	Endkonzentration:	Volumen/ Reaktion:	Endkonzentration:
Template DNA	10 µl	ca. 1 – 100 ng	10 µl	ca. 1-100 ng
10x PCR-Puffer	5 µl	1x	5 µl	1x
MgCl ₂ (25 mM)	1 µl	2,0 mM	–	1,5 mM
dNTPs (10 mM)	5 µl	250 µM je	3,75 µl	187,5 µM je
Primer 1 (50 µM)	0,8 µl	0,8 µM	1,25 µl	1,25 µM
Primer 2 (50 µM)	0,8 µl	0,8 µM	1,25 µl	1,25 µM
<i>Taq</i> –Polymerase (5U/µl)	0,3 µl	1,5 U	0,3 µl	1,5 U
Aqua inj.	27,1 µl		28,45 µl	
Endvolumen	50 µl		50 µl	
initiale Denaturierung	96°C, 5 min.		96°C, 5 min.	
Anzahl der Zyklen	45		45	
Denaturierung	96°C, 1 min.		96°C, 1 min.	
Primer-Annealing	55°C, 1 min. bzw. 53°C, 1 min.		54°C, 1 min.	
Extension	72°C, 1 min. 30 sec.		72°C, 1 min. 30 sec.	
finale Extension	72°C, 5 min.		72°C, 5 min.	
erwartete Produktlänge	553 bp bzw. 550 bp		115 bp	

Bei der Prüfung der Spezifität der entwickelten PCR wurde auch DNA von Spezies (andere Pilze, Bakterien, Parasiten, Wirtsgewebe) eingesetzt, mit der kein positives Ergebnis in der PCR erwartet wurde. Bei dieser und bei DNA, bei der unerwarteterweise ein Signal ausblieb (*Aphanomyces brassicae*), wurde das ausreichende Vorhandensein von Template-DNA durch Einsatz von Primern überprüft, die sicher ein positives Ergebnis mit der eingesetzten DNA erbringen müssen (Tabelle 12). So wurden die Primer ITS 1 und ITS 4 zum Nachweis von Pilz-DNA und von *Psorospermium haeckeli* eingesetzt. Die erwartete Produktlänge bei den Pilzen liegt bei ca. 700-900 bp, die des Letzteren bei etwa 1420 bp. Die Primer 143F und 145R setzen in einer hochkonservierten Region der 18S rRNA-Sequenz bei Dekapoden an und amplifizieren ein etwa 820 bp großes Fragment, die Bakterien-Primer CSPU3 und CSPU5 ein ca. 200 bp großes Fragment. Die Primerkombination MIC5-1/MIC3-4 wurde zum

Nachweis des Microsporidiums *Thelohania contejeani*, das zur gleichen Zeit im Labor zur Diagnose aufbereitet wurde, herangezogen.

Tabelle 12: Beschreibung der zur Positivkontrolle in der Spezifitätsüberprüfung eingesetzten PCR-Bedingungen

PCR mit Primer....	ITS1/ ITS4	143F/ 145R	CSPU3/ CSPU5	MIC5-1/ MIC3-4
Referenz:	WHITE et al. 1990	LO et al. 1996a, 1996b, 1999	FRANCIS und STEWART 1997	FELLER 2002
Nachweis von....	Oomycota und anderen Pilzen	Krebsgewebe	Bakterien (gram-negativ)	Mikrosporidien (<i>T. contejeani</i>)
Bestandteil:	Volumen/ Reaktion:	Volumen/ Reaktion:	Volumen/ Reaktion:	Volumen/ Reaktion:
Template DNA	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
10x PCR-Puffer	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
dNTPs (10 mM)	3,75	5 µl	5 µl	4 µl
Primer 1 (50 µM)	1,25 µl	2,0 µl	2,0 µl	1,0 µl
Primer 2 (50 µM)	1,25 µl	2,0 µl	2,0 µl	1,0 µl
<i>Taq</i> –Polymerase (5 U/µl)	0,3 µl	0,3 µl	0,3 µl	0,3 µl
Aqua inj.	28,45 µl	25,7 µl	25,7 µl	28,7 µl
Endvolumen	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
initiale Denaturierung	96°C, 5 min.	94°C, 3 min.	95°C, 5 min.	96°C, 2 min.
Anzahl der Zyklen	45	40	25	45
Denaturierung	96°C, 1 min.	94°C, 1 min.	95°C, 15 sec.	92°C, 1 min.
Primer-Annealing	54°C, 1 min.	55°C, 1 min.	50°C, 30 sec.	50°C, 1 min.
Extension	72°C, 1 min. 30 sec.	72°C, 2 min.	72°C, 30 sec.	72°C, 1 min.
finale Extension	72°C, 5 min.	72°C, 5 min.	72°C, 4 min.	72°C, 5 min.
erwartete Produktlänge	700-800 bp	828 bp	ca. 200 bp	215 bp

Bei den PCRs wurde grundsätzlich eine Negativ-Kontrolle mitgeführt, die alle Zutaten außer der DNA enthält, um eventuelle Kontaminationen zu entdecken, die zu falsch-positiven Ergebnissen führen können.

4.4 Sensitivitätsbestimmung

Zur Bestimmung der unteren Nachweisgrenze der entwickelten PCR für *Aphanomyces astaci* wurde Plasmid-DNA, zelluläre DNA aus Pilzmycel, zelluläre DNA aus Pilzsporen, genomische DNA aus wirtseigenem Gewebe versetzt mit einer definierten Menge an *Aphanomyces astaci*-Sporen („Spiked PCR“) und krebspestinfizierte Kutikula eingesetzt.

Letztere wurde aus den Infektionsversuchen gewonnen, die schon oben (III.B.2. *Infektion durch Zoosporenexposition*) beschrieben worden sind. Die Sensitivität wurde für jeweils die Primerpaare NS 166/NS 681, NS 170/NS 681 und BO 525/BO 640 einzeln sowie für die hintereinandergeschaltete Semi-Nested, bzw. Nested PCR ermittelt.

Bestimmung der analytischen Sensitivität der PCR mit Plasmid-DNA

Die für diese Untersuchung benötigte Plasmid-DNA stammte aus einer von OIDTMANN (unveröffentlicht) durchgeführten Klonierung und wurde zwischenzeitlich bei -80°C aufbewahrt. Die Klone der in einem Plasmid eingebauten ITS-Region des *Aphanomyces astaci*-Stammes M96/1 wurden langsam auf Eis aufgetaut und $20\ \mu\text{l}$ der plasmidhaltigen Bakteriensuspension („gelbe Phase“) in $100\ \text{ml}$ LB-Amp.-Medium überführt. Nach einer Inkubation bei 18°C auf einem Rüttler über Nacht wurden je $50\ \mu\text{l}$ davon auf LB-Agar-Platten (mit Ampicillin, IPTG und X-Gal-Zusatz) ausgestrichen und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine einzelne weiße, plasmidhaltige Kolonie gepickt und in $4\ \text{ml}$ LB-Medium gelöst. Es erfolgte eine weitere Inkubation bei 37°C über Nacht und ein erneutes Ausstreichen von $50\ \mu\text{l}$ auf LB-Agarplatten (mit Ampicillin, IPTG und X-Gal-Zusatz). Als auf diesen alle Kolonien weiß anwuchsen („Blau-Weiß-Selektion“), wurden $3\ \text{ml}$ der ausschließlich plasmidhaltigen Bakteriensuspension in ein steriles Röhrchen überführt und bei $3000\ \text{U}/\text{min}$ (4°C) für $15\ \text{min}$ zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Bakterienpellet in $0,3\ \text{ml}$ P1-Puffer des „Plasmid Mini Purification Kit“ (Qiagen) resuspendiert. Die weitere Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte nach Anweisungen des Herstellers. Das Prinzip der Aufreinigung basiert auf einer Alkalischen Lyse, gefolgt von mehreren Zentrifugationsschritten mit einer spezifischen Bindung der Plasmid-DNA an eine durch einen Anionen-Austausch-Puffer äquilibrierte Qiagen-Säule. Nach zweimaligem Waschen der Säule wurde die Plasmid-DNA in $0,8\ \text{ml}$ QF-Puffer (salzhaltig) eluiert, durch Zugabe von Isopropanol und Zentrifugation gefällt und konzentriert, und schließlich mit eisgekühltem, $70\ \%$ igem Ethanol gewaschen. Das Isopropanol diente der Präzipitation von Salzen, das Ethanol der Entfernung der gefällten Salze und dem Ersatz des weniger flüchtigen Isopropanols. Nach vollständigem Entfernen des Alkohols nach Trocknen des Pellets, wurde dieses in $10\ \mu\text{l}$ Aqua inj. resuspendiert.

Das von OIDTMANN (unveröffentlicht) in INVαF' *E. coli*-Stämmen (Plasmid-Vektor pCR[®]2.1) klonierte *Aphanomyces astaci* M96/1-Fragment hat eine Größe von $754\ \text{bp}$.

Die DNA-Konzentration wurde durch Messung in einem UV Spektrophotometer ermittelt. Ausgehend von einer Stammlösung von 100 µg/ml wurde eine 1:10-Verdünnungsreihe angefertigt, deren Werte durch mehrmalige Messungen im Photometer kontrolliert wurden. Es wurden jeweils 10 µl in die PCR eingesetzt.

Bestimmung der analytischen Sensitivität der PCR mit zellulärer DNA aus Pilzmycel

Wie bereits unter III.B.4.1.1 beschrieben, wurde DNA aus einer Pilzreinkultur von M96/1 gewonnen. Unter photometrischen Messungen wurde eine Stammlösung von 100 µg/ml hergestellt, die in Zehnerschritten verdünnt wurde. Die einzelnen Verdünnungsstufen wurden durch DNA-Messungen kontrolliert und eventuell an die gewünschte Konzentration angepasst. Es wurden jeweils 10 µl in die PCR eingesetzt.

Bestimmung der analytischen Sensitivität der PCR mit aus Zoosporen isolierter DNA

Die Gewinnung von Zoosporen erfolgte wie unter III.B.1 erläutert ist. Aus der Sporensuspension wurde jeweils die vierfache Menge von 10, 100 und 1000 Sporen entnommen. Die drei Gefäße wurden bei 10000 U/min. (10 min.) zentrifugiert, der Überstand abgossen und das Sporenpellet in 80 µl Aqua inj. resuspendiert. Jeweils 20 µl der Suspensionen wurden in zwei unterschiedliche kommerzielle DNA-Isolationskits eingesetzt. Von den restlichen 40 µl wurde die Sporenkonzentration durch zweimaliges Auszählen in der Neubauerzählkammer kontrolliert. Da die Menge von 1 Spore nicht mehr auszählbar war, musste eine Sporensuspension von 10 Sporen/ml 1:10 verdünnt werden. Die Suspension von theoretisch 1 Spore wurde wie die anderen Konzentrationen aufbereitet und jeweils 20 µl in den beiden Kits zur DNA-Extraktion verwendet. Zum Vergleich wurden die in je 20 µl Aqua inj. gelösten 1, 10, 100 und 1000 Sporen direkt in das Nucleon Phytopure[®] for Plant DNA Extraction Kit (Amersham) und in das DNeasy[®] Tissue Kit (Qiagen) eingesetzt, bei beiden die DNA in 100 µl eluiert und davon 10 µl in die PCR eingesetzt.

Bestimmung der analytischen Sensitivität im Rahmen einer Spiked PCR

Für die sogenannten „gespikten“ Proben wurden wie oben beschrieben Sporen gewonnen und davon jeweils definierte Mengen mit 30 mg nicht infizierter Krebsmuskulatur zur DNA-Extraktion im DNeasy[®] Tissue Kit (Qiagen) eingesetzt.

4.5 Spezifitätsbestimmung

Zur Überprüfung der Spezifität wurde, vor Einsatz in die PCR, die DNA der in Tabelle 9 aufgeführten Pilzisolat mit dem DNeasy[®] Plant Kit (Qiagen), die der übrigen Proben (Parasiten, Bakterien, Krebse) mit dem DNeasy[®] Tissue Kit (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers isoliert.

4.6 Agarose-Gelelektrophorese

Aufgrund ihrer negativen Ladung wandert die DNA in einem elektrischen Feld in Richtung des positiven Pols. Je kleiner das Fragment ist, desto schneller kann es sich durch die Poren eines Agarosegels bewegen, so dass eine Auftrennung der DNA-Moleküle nach ihrer Größe erfolgt. Nach der Größe der erwarteten PCR-Produkte wird dementsprechend die Konzentration der Gele gewählt. Durch das bereits dem Gel zugegebene Ethidiumbromid, das sich zwischen die Basen des DNA-Doppelstranges einlagert, wird der Abstand der beiden Stränge zueinander verändert, was durch UV-Fluoreszenz sichtbar gemacht werden kann. Mindestens 25 ng DNA sind nötig, um eine Bande mit Ethidiumbromid detektieren zu können (BROWN 1996). Um die Größe des PCR-Produktes abschätzen zu können, wird ein Größenstandard im Gel mitlaufen gelassen.

Die Analyse der entstandenen PCR-Amplifikate erfolgte in einem 1,3 %igen Agarose-Gel, die Visualisierung von Fragmenten unter 100 bp nach dem Restriktionsenzym-Verdau in einem 2,5 %igen Gel (Verdau des PCR-Produktes mit den Primern BO 525/BO 640), von Fragmenten über 100 bp in einem 2 %igen Gel. Zur Herstellung wurde die entsprechende Menge Agarose (1,3 g; 2,0 g; 2,5 g) in 100 ml 1x TAE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und nach kurzem Abkühlen 0,5 µg/ml (5 µl einer 10 mg/ml Ethidiumbromid-Lösung in 100 ml Gel) Ethidiumbromid dazugegeben. Nach dem Gießen und Erstarren des Gels, wurden die Kämme gezogen und jeweils 5 µl der PCR-Ansätze zusammen mit je 1 µl 6x Laufpuffer in der ebenfalls mit 1x TAE-Puffer befüllten Elektrophoresekammer aufgetragen. Als Größenstandard dienten 2 µl (100 ng/µl) einer 100 bp-DNA-Leiter (SLL 100, Roth), die alle 100 bp eine Markierung von ca. 20 ng DNA ergab.

Zur Visualisierung des Restriktionsenzymverdau wurden 5 µl des Größenstandards EZ Load™ 20 bp Molecular Ruler (Bio-Rad) eingesetzt der alle 20 bp eine Bande aufwies.

Eine Spannung von 5 V/cm Gellänge wurde für 30–60 Minuten angelegt. Danach wurde das Gel in eine UV-Kammer gelegt, die entstandenen Banden mit UV-Durchlicht (312 nm) sichtbar gemacht und mit einer digitalen Fotoeinrichtung abfotografiert.

4.7 Aufreinigung der PCR-Produkte

Sowohl für die automatische Sequenzierung (GENterprise) als auch für den Verdau mit Restriktionsenzymen, mussten die PCR-Produkte aufgereinigt werden. Hierzu wurde das QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen) eingesetzt, das DNA-Fragmente unter 40 bp und andere störende Komponenten (störende Nukleotide, Primer, Salze, etc.) aus dem PCR-Ansatz entfernt. Durch spezifische Bindung an eine Silikagel-Membran wurden die gewünschten PCR-Produkte vor dem Auswaschen geschützt und die so aufgereinigte DNA schließlich in 30 µl EB-Puffer (10 mM TrisCl, pH 8,5) eluiert. Da nach der PCR nur jeweils ein PCR-Produkt vorhanden war, war keine Aufreinigung aus dem Gel ausgeschnittener Banden oder direkt aus dem PCR-Produkt erforderlich.

Die zu sequenzierenden Proben wurden jeweils aus zwei getrennten PCRs eingeschickt (GENterprise) und in beide Richtungen, jeweils mit dem Primer ITS 1 und mit dem Primer ITS 4, ausgewertet.

Von 30 µl aufgereinigtem PCR-Produkt wurden jeweils 8 µl in einer Verdauung mit Restriktionsenzymen eingesetzt.

4.8 Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP)

Um die entstandenen PCR-Produkte zu bestätigen, wurde eine Restriktionsenzym-Analyse der PCR angeschlossen. Restriktionsenzyme sind in der Lage, doppelsträngige DNA an bestimmten Erkennungssequenzen, die für jedes Enzym unterschiedlich sind, zu spalten (Hydrolyse der Phosphat-Desoxyribose der DNA). Die Auswahl eines geeigneten

Restriktionsenzym erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms MAPDRAW (Lasergene Software for Windows), das alle Schnittstellen der Sequenz sowie Anzahl und Größe der entstehenden Fragmente anzeigt. Der Ansatz für die Verdauung enthielt folgende Komponenten:

PCR-Produkt: 8 μ l

Puffer (10x): 1 μ l

Enzym: 1 μ l

Zur enzymatischen Hydrolyse des PCR-Produktes der Semi-Nested PCR wurde die Endonuklease *Hinf I*, zur Verdauung des Produktes der Nested PCR das Enzym *Hph I* eingesetzt.

Der 10 μ l-Ansatz wurde bei 37°C für 90 Minuten im Thermocycler inkubiert. Danach wurden 5 μ l des unverdauten PCR-Produktes zur Kontrolle und 10 μ l Restriktionsprodukte in einem 2,5 %igen (bzw. 2 %igen) Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und das Ergebnis dokumentiert (III.B.4.6).

4.9 Validierung der entwickelten Methoden

Das in dieser Arbeit entwickelte Verfahren wurde in der Diagnostik bei Krebsen eingesetzt, bei denen der Verdacht auf Krebspest bestand und die zur Untersuchung in das Institut für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten der LMU München eingeschickt wurden. Die Krebse wurden wie oben beschrieben seziiert, lichtmikroskopisch auf Hyphenbefall untersucht (III.B.3.), ihre Kutikula im DNeasy[®] Tissue Kit (Qiagen) zur DNA-Isolation verwendet (III.B.4.1.3) und das Eluat in der PCR eingesetzt (III.B.4.3). Die Verifikation der PCR-Bande in der erwarteten Größe erfolgt durch Restriktionsenzym-Verdauung (III.B.4.8).

C. Ergebnisse

1. Entwicklung eines molekularbiologischen Nachweisverfahrens für die Krebspest

1.1 Wahl einer DNA-Isolationsmethode

Für die schnelle und zuverlässige Isolierung der genomischen DNA aus infizierter Kutikula vom Edelkrebs wurden verschiedene Extraktionsmethoden auf ihre Eignung und quantitative Ausbeute untersucht. Dabei wurden je 1 µl ihrer Eluate in die einfache PCR mit den Primern BO 525/BO 640, deren Bedingungen zu diesem Zeitpunkt noch nicht optimiert worden waren, eingesetzt. Ganz zu Beginn wurde die nach PÄÄBO (1990) modifizierte Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion angewendet, die schwach positive Signale in dem erwarteten Größenbereich erbrachte. Im weiteren Verlauf wurde diese Methode aber nicht weiterverfolgt, sondern kommerzielle Fertigungskits eingesetzt. Getestet wurden das DNeasy[®] Tissue Kit von Qiagen (Abbildung 14) und das E.Z.N.A.[®] Invertebrate DNA Kit von Peqlab (Abbildung 15 und 16). Beide erwiesen sich als geeignet zur Isolierung von erregerspezifischer DNA aus wirtseigener Kutikula. Die Extraktionen wurden unter Einsatz verschiedener Proteinase K-Konzentrationen durchgeführt: 2 mg/ml (vom Hersteller empfohlen), 4 mg/ml und 8 mg/ml. Die Eluate wurden in verschiedenen Verdünnungsstufen in die PCR eingesetzt, von der jeweils 5 µl im Agarose-Gel aufgetragen wurden.

Bei Anwendung beider Kits konnten Banden bei allen drei Proteinase K-Konzentrationen beobachtet werden. Diese waren deutlich bei dem Einsatz des Originaleluats (keine Verdünnung) und der Verdünnung 1:10. Bei 8 mg/ml Proteinase K wurde ein Signal bis zu der 1:1000-Verdünnung (E.Z.N.A.[®] Invertebrate DNA Kit, Peqlab) sichtbar. Eine Erhöhung der Proteinase K-Konzentration brachte bei Verwendung des E.Z.N.A.[®] Invertebrate DNA Kits einen Vorteil, allerdings nur marginal. Je stärker das Eluat vor Einsatz in die PCR verdünnt wurde, desto schwächer wurden die Signale (Abbildungen 14 und 15, gemeinsame Legende). Obwohl die vorliegenden Ergebnisse dafür sprechen würden, das E.Z.N.A.[®] Invertebrate DNA Kit als Standardmethode einzusetzen, wurde das DNeasy[®] Tissue Kit für zukünftige Anwendungen gewählt, da bei diesem im Gegensatz zu Ersterem auf die Verwendung des gesundheitsgefährdenden Chloroform zur Polysaccharidentfernung verzichtet werden kann.

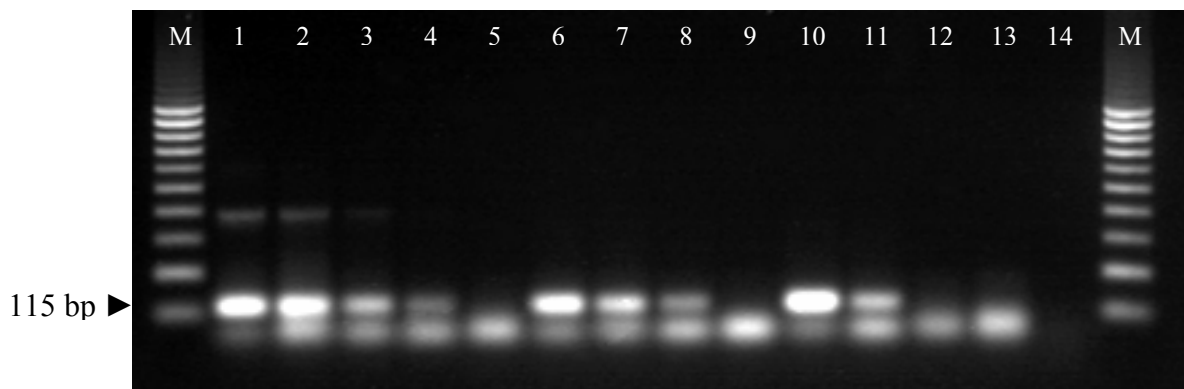


Abbildung 14: Einfluss der in der Proteinase K-Verdauung (3 Stunden bei 56°C) des DNeasy[®] Tissue Kits (Qiagen) eingesetzten Menge an Enzym auf die DNA-Ausbeute (Legende siehe Kasten)

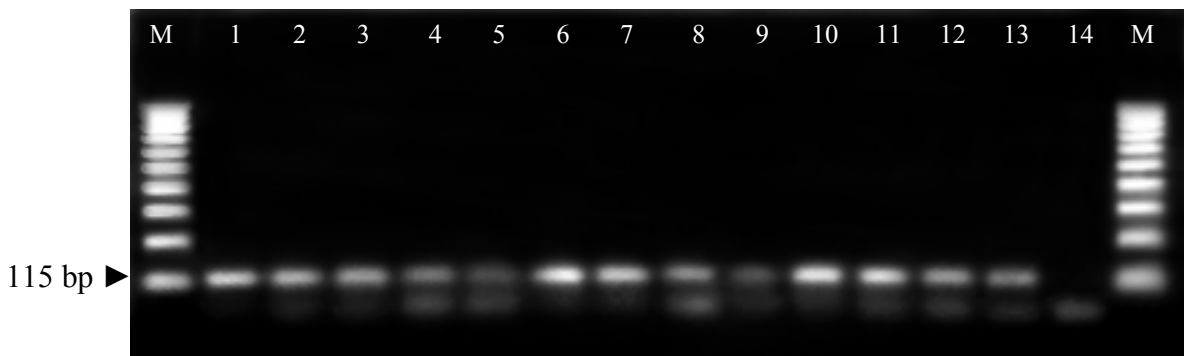


Abbildung 15: Einfluss der in der Proteinase K-Verdauung (3 Stunden bei 56°C) des E.Z.N.A.[®] Invertebrate DNA Kits (Peqlab) eingesetzten Menge an Enzym auf die DNA-Ausbeute (Legende siehe Kasten)

M	100 bp-Molekulargewichtsmarker	
1	Positiv-Kontrolle	8 Proteinase K 4 mg/ml, Eluat 1:100
2	Proteinase K 2 mg/ml, Eluat 1:1	9 Proteinase K 4 mg/ml, Eluat 1:1000
3	Proteinase K 2 mg/ml, Eluat 1:10	10 Proteinase K 8 mg/ml, Eluat 1:1
4	Proteinase K 2 mg/ml, Eluat 1:100	11 Proteinase K 8 mg/ml, Eluat 1:10
5	Proteinase K 2 mg/ml, Eluat 1:1000	12 Proteinase K 8 mg/ml, Eluat 1:100
6	Proteinase K 4 mg/ml, Eluat 1:1	13 Proteinase K 8 mg/ml, Eluat 1:1000
7	Proteinase K 4 mg/ml, Eluat 1:10	14 Negativ-Kontrolle

Ergebnisse

Eine verlängerte Inkubationszeit von drei Stunden auf 24 Stunden mit unterschiedlichen Proteinase K-Konzentrationen unter Anwendung des E.Z.N.A.[®] Invertebrate DNA Kits (Peqlab) veränderte nichts an der Ausbeute, doch es konnte das verstärkte Auftreten einer Nebenbande bei < 400 bp beobachtet werden (Abbildung 16). Zur Abschätzung der DNA-Menge im PCR-Produkt wurde der Größenmarker zum optischen Vergleich herangezogen, dessen Banden bei einer auf das Gel aufgetragenen Menge von 2 µl à 20 ng DNA enthalten. Der Einsatz des Eluats ohne Verdünnung und der 1:10-Verdünnung in der PCR ergaben in allen Fällen Signale über 20 ng DNA/5µl PCR-Produkt.

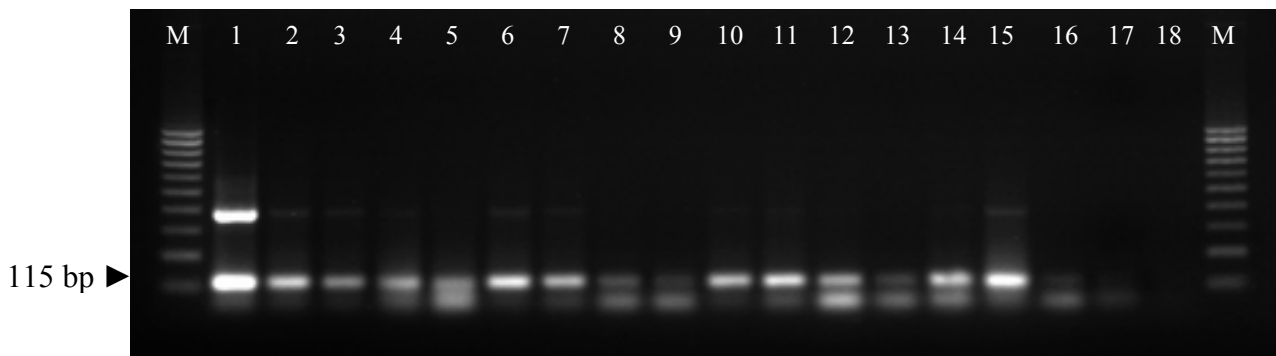


Abbildung 16: DNA-Ausbeute nach der PCR bei unterschiedlichen Proteinase K-Konzentrationen und einer verlängerten Inkubationszeit (24 Stunden bei 37°C)

M	100 bp-Molekulargewichtsmarker		
1	Positiv-Kontrolle	10	Proteinase K 8 mg/ml, Eluat 1:1
2	Proteinase K 2 mg/ml, Eluat 1:1	11	Proteinase K 8 mg/ml, Eluat 1:10
3	Proteinase K 2 mg/ml, Eluat 1:10	12	Proteinase K 8 mg/ml, Eluat 1:100
4	Proteinase K 2 mg/ml, Eluat 1:100	13	Proteinase K 8 mg/ml, Eluat 1:1000
5	Proteinase K 2 mg/ml, Eluat 1:1000	14	Proteinase K 10 mg/ml, Eluat 1:1
6	Proteinase K 4 mg/ml, Eluat 1:1	15	Proteinase K 10 mg/ml, Eluat 1:10
7	Proteinase K 4 mg/ml, Eluat 1:10	16	Proteinase K 10 mg/ml, Eluat 1:100
8	Proteinase K 4 mg/ml, Eluat 1:100	17	Proteinase K 10 mg/ml, Eluat 1:1000
9	Proteinase K 4 mg/ml, Eluat 1:1000	18	Negativ-Kontrolle

1.2 Wahl der Primer

Zur Sequenzierung wurden PCR-Produkte verwendet, die mit den Primern ITS 1 und ITS 4 amplifiziert wurden (WHITE et al. 1990). Mit ihnen erhält man die gesamte ITS-Region (ITS 1, 5.8S, ITS 2) von den meisten Pilzen. Die erwartete Produktlänge bei den Oomycota beträgt etwa 750 bp.

Die Primer BO 525/BO 640 (OIDTMANN, unveröffentlicht) liegen in der ITS 2-Region von *Aphanomyces astaci* und dienen seinem spezifischen und sensitiven Nachweis. Dieser Bereich des rRNA-Gens ist nicht kodierend und hypervariabel, so dass ausreichend Sequenzunterschiede zu nah verwandten Arten bestehen. Das PCR-Produkt ergibt ein Signal bei 114 bp (M96/1), bei den meisten Stämmen von *Aphanomyces astaci* bei 115 bp.

Die Primer NS 166, NS 170, NS 310, NS 318, NS 681 und NS 700 wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit konstruiert, optimiert, getestet und zum Nachweis von Arten der Gattung *Aphanomyces*, damit auch *Aphanomyces astaci*, eingesetzt. Das Vorgehen bei der Konstruktion der Primer wird ausführlich in der Diskussion (IV.1.2) erläutert.

Einen Überblick über die Eigenschaften aller verwendeten Primer gibt Tabelle 13, eine schematische Darstellung der Lage der neu konstruierten Primer zueinander Abbildung 17.

Tabelle 13: Bezeichnung und Beschreibung der Eigenschaften der verwendeten Primer (F: „forward“, R: „reverse“ Primer)

Name des Primers:	Länge in Nukleotiden:	Lage auf der genomischen rDNA:	Richtung der Replikation:	Schmelztemperatur T_m in °C:	GC-Gehalt in %:
ITS 1	19	18S (SSU)	F	61,0	63,2
ITS 4	20	18S (SSU)	R	55,3	45
NS 166	20	ITS 1	F	52,2	37,5
NS 170	21	ITS 1	F	50,1	28,6
NS 310	19	5.8S	F	56,7	52,6
NS 318	20	5.8S	F	57,3	50
NS 681	19	ITS 2	R	56,7	52,6
NS 700	22	ITS 2	R	52,8	31,8
BO 525	20	ITS 2	F	53,2	40
BO 640	20	ITS 2	R	59,4	55

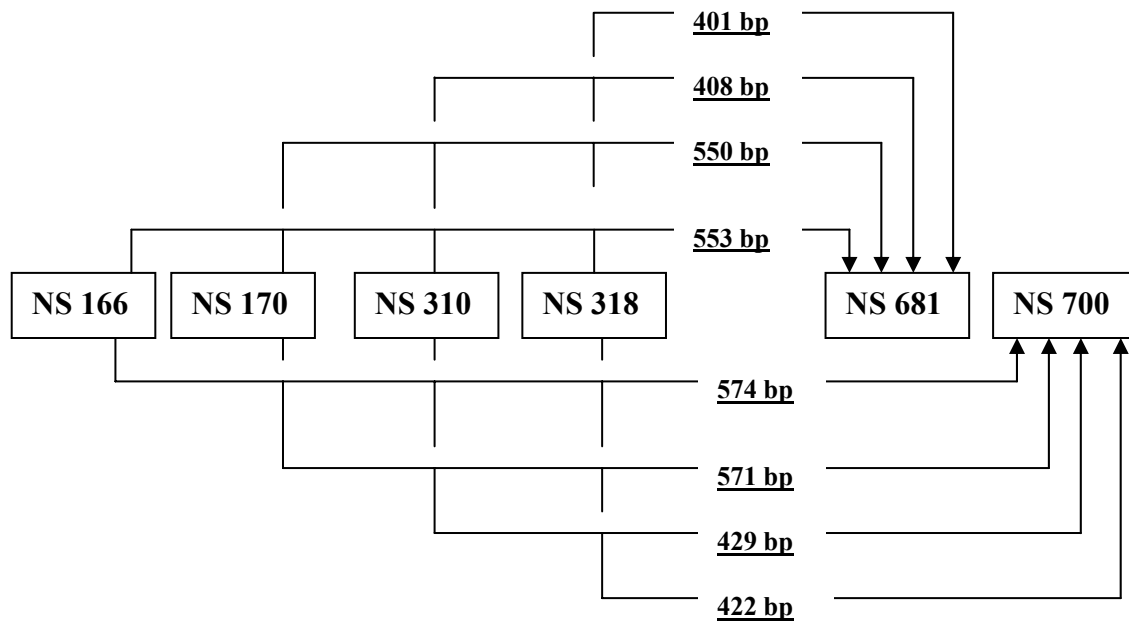


Abbildung 17: Schematische Darstellung der Anordnung der konstruierten Primer zueinander unter Angabe der Produktlänge, die sie mit dem Referenzstamm M96/1 ergeben

Die Lage der Primer innerhalb des Genoms ist im Anhang (Abbildung 61) abgebildet.

1.3 Optimierung der PCR-Protokolle

Durch experimentelle Variation verschiedener, für die PCR wesentlicher, Parameter wurden die optimalen Reaktionsbedingungen für die einzelnen, oben beschriebenen, neu konstruierten Primerpaare ermittelt.

Für die Primerkombination BO 525/BO 640 bestand bereits ein PCR-Protokoll (OIDTMANN, unveröffentlicht), das im Rahmen der vorliegenden Arbeit optimiert wurde. Insbesondere durch die Erhöhung der eingesetzten DNA-Menge von anfangs 1 μ l auf 10 μ l konnte die Sensitivität deutlich gesteigert werden (III.C.1.4), während eine noch größere Menge eingesetzter DNA die Bande nicht verstärkte, sondern zu einem unspezifischen Hintergrund führte. Die Menge der *Taq*-Polymerase konnte ohne quantitative Einbußen in der PCR von 0,5 μ l auf 0,3 μ l reduziert werden und der 20 μ l-Ansatz wurde auf einen von 50 μ l

geändert. Alle weiteren Reaktionsbedingungen wurden wie empfohlen übernommen. Das optimierte Protokoll ist im Methodik-Teil (III.B.4.3), Tabelle 12, zu finden.

Im Folgenden wird das Vorgehen zur Optimierung der Primerkombinationen NS 166/NS 681, NS 166/NS 700, NS 170/NS 681, NS 170/NS 700, NS 310/NS 681, NS 310/NS 700, NS 318/NS 681 und NS 318/NS 700 beschrieben. Dabei wurde die Stärke der Banden und damit die Amplifikat-Ausbeute als Kriterium für die Effizienz der PCR herangezogen. Die experimentell ermittelten Optima sind in Tabelle 14 dargestellt.

Nachdem bei einem ersten Temperaturvergleich der PCRs bei 45°C, 50°C und 55°C bei allen Primerkombinationen (NS 166, NS 170, NS 310, NS 318 mit jeweils NS 681 und NS 700) bei mindestens einer Temperatur ein Signal erzeugt werden konnte, wurde diese vorläufig bei der Magnesium-Optimierung herangezogen. Eine Feinanpassung der Annealingtemperatur wurde erst danach vorgenommen.

1.3.1 Optimierung der MgCl₂-Konzentration

Die Magnesium-Optimierung wurde unter Verwendung der verschieden zusammengesetzten Puffer eines PCR-Optimierungskits (PCR Optimizer™ Kit, Invitrogen) mit 1,5 mM, 2,0 mM, 2,5 mM und 3,5 mM MgCl₂ bei 35 und 50 Zyklen durchgeführt.

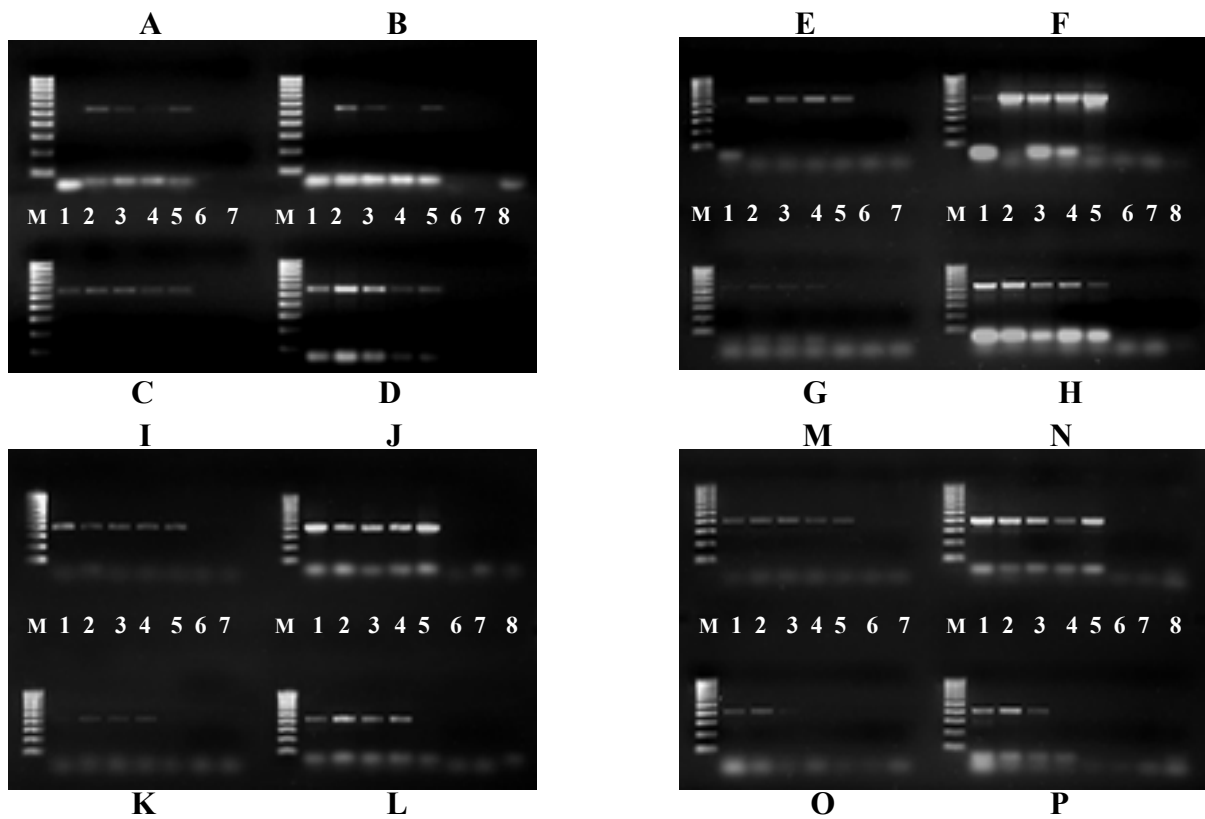


Abbildung 18: Gelelektrophoretische (1,3 % Agarose) Darstellung der Banden bei unterschiedlichen MgCl₂-Konzentration für die einzelnen Primerkombinationen nach 35 und 50 Zyklen

<u>35 Zyklen:</u>		<u>50 Zyklen:</u>	
A	NS 166/NS 681	B	NS 166/NS 681
C	NS 166/NS 700	D	NS 166/NS 700
E	NS 170/NS 681	F	NS 170/NS 681
G	NS 170/NS 700	H	NS 170/NS 700
I	NS 310/NS 681	J	NS 310/NS 681
K	NS 310/NS 700	L	NS 310/NS 700
M	NS 318/NS 681	N	NS 318/NS 681
O	NS 318/NS 700	P	NS 318/NS 700
M 100 bp-Molekulargewichtsmarker			
<u>bei pH 8,5:</u>		<u>bei 2 mM Mg²⁺:</u>	
1	1,5 mM Mg ²⁺	5	pH 9
2	2,0 mM Mg ²⁺	6	pH 9,5
3	2,5 mM Mg ²⁺	7	pH 10
4	3,5 mM Mg ²⁺	8	Negativ-Kontrolle

1.3.2 Optimierung der Annealing-Temperatur

Die vorläufigen Temperaturen, bei denen die Magnesium-Optimierung durchgeführt wurde, lagen bei den Kombinationen mit NS 681 zwischen 50°C und 56°C, bei den Kombinationen mit NS 700 zwischen 42°C und 44°C. Um eine möglichst genaue Annäherung an die optimale Annealingtemperatur des jeweiligen Primerpaares zu erreichen, wurden zunächst in diesem Bereich zeitgleich drei verschiedene Temperaturschritte im Abstand von etwa 4-5°C getestet (Abbildung 19). Danach wurde die optimale Hybridisierungstemperatur weiter eingegrenzt durch etwa 2,5°C-Abstände (Abbildung 20). Die Dezimalstellen bei den Temperaturangaben erklären sich durch die Verwendung eines Gradientencyclers (Mastercycler gradient[®], Eppendorf), der um einen manuell eingegebenen Mittelwert die angrenzenden Temperaturwerte automatisch berechnet und es ermöglicht, gleichzeitig PCRs mit unterschiedlichen Annealingtemperaturen durchzuführen.

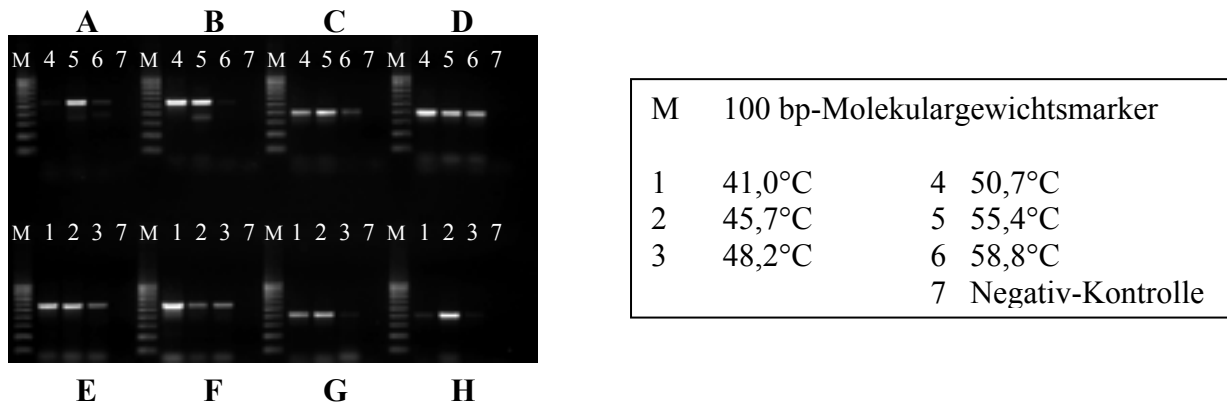


Abbildung 19: Groboptimierung der Annealingtemperaturen für die Primerpaare (A) NS 166/NS 681, (B) NS 170/NS 681, (C) NS 310/NS 681, (D) NS 318/NS 681, (E) NS 166/NS 700, (F) NS 170/NS 700, (G) NS 310/NS 700 und (H) NS 318/NS 700 nach 50 Zyklen

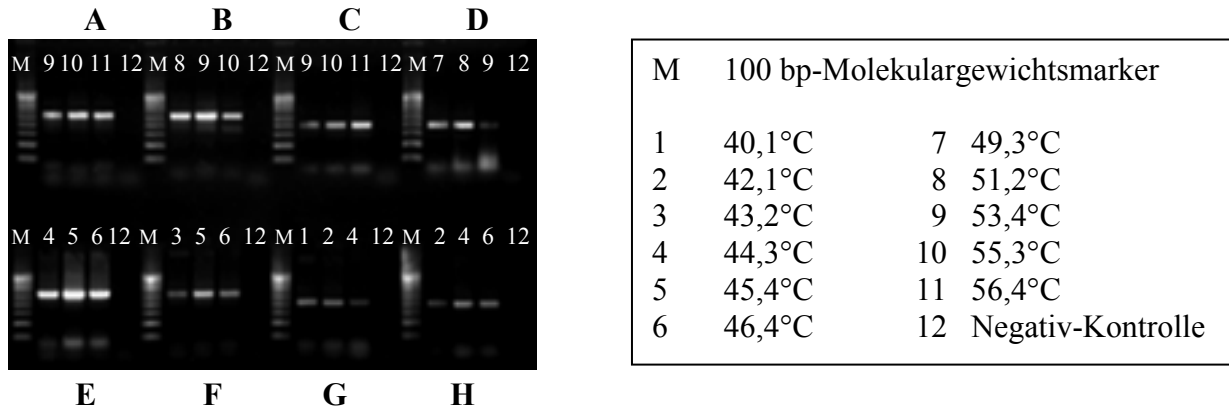


Abbildung 20: Feinoptimierung der Annealingtemperaturen für die Primepaare (A) NS 166/NS 681, (B) NS 170/NS 681, (C) NS 310/NS 681, (D) NS 318/NS 681, (E) NS 166/NS 700, (F) NS 170/NS 700, (G) NS 310/NS 700 und (H) NS 318/NS 700 nach 50 Zyklen

1.3.3 Einfluss von Kosolvens-Zugabe

Da der Zusatz eines Kosolvens eventuell die Spezifität der PCR erhöhen kann, wurde eine DMSO (Dimethylsulfoxid)-Konzentration von 2,5 % und 10 % im Vergleich zum Ansatz ohne Zugabe ausgetestet. Mit ansteigender DMSO-Konzentration wurde das PCR-Ergebnis deutlich schlechter, weshalb dieses Reagens nicht weiter verwendet wurde (Abbildung 21).

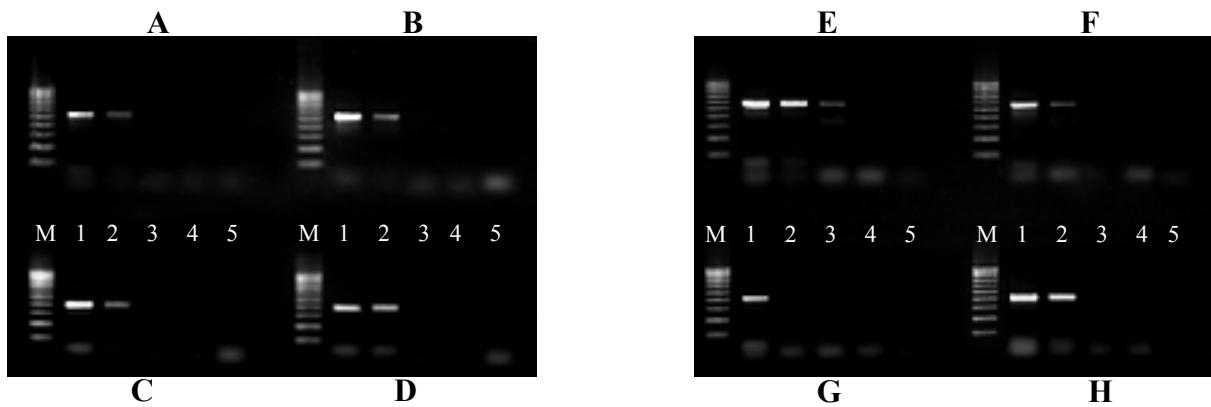


Abbildung 21: Einfluss von DMSO auf die Qualität der PCR

A	NS 166/NS 681	E	NS 166/NS 700
B	NS 170/NS 681	F	NS 170/NS 700
C	NS 310/NS 681	G	NS 310/NS 700
D	NS 318/NS 681	H	NS 318/NS 700
M	100 bp-Molekulargewichtsmarker		
1	0 % DMSO	3	5 % DMSO
2	2 % DMSO	4	10 % DMSO
		5	Negativ-Kontrolle

1.3.4 Optimierung der dNTP- und *Taq*-Konzentration

Stellvertretend für alle anderen Primerkombinationen wurden die Konzentrationen der *Taq*-Polymerase (1; 1,5; 2 U pro 50 μ l) und der dNTPs (0,1; 0,25; 0,4 mM) bei dem Primerpaar NS 170/NS 681 variiert. Es konnten keine deutlichen Unterschiede bei den jeweils drei Konzentrationen festgestellt werden und es wurde für die weitere Anwendung der in der Mitte liegende Wert gewählt (1,5 U *Taq* und 0,25 mM dNTPs je für einen 50 μ l PCR-Ansatz).

1.3.5 Optimierung der Zyklenzahl

Bereits bei der oben beschriebenen Magnesium-Optimierung wurden zwei Zyklenzahlen miteinander verglichen (Abbildung 18). Dabei wurden aus demselben PCR-Ansatz eine erste Probe nach 35 Zyklen, die zweite nach Ablauf der 50 Zyklen entnommen und gelelektrophoretisch analysiert. Deutlich stärkere Banden konnten nach der höheren Anzahl

an Zyklen beobachtet werden, ohne dass ein „schmieriger“ Hintergrund aufgrund unspezifischer Nebenprodukte auftrat. Ausgehend davon wurde eine erneute Annäherung an die optimale Zyklenzahl mit den Primern NS 166/NS 681 durchgeführt (Abbildung 22). Wieder wurden die Proben nach den entsprechenden Zyklen aus demselben Ansatz entnommen, um den Einfluss anderer Parameter auf das Ergebnis auszuschließen. Zwischen 45 und 50 Zyklen bestand kaum ein Unterschied, für die später entwickelte Nested PCR (III.C.1.6) wird der niedrigere Wert, 45 Zyklen, empfohlen, um ein „Overcycling“ zu vermeiden.

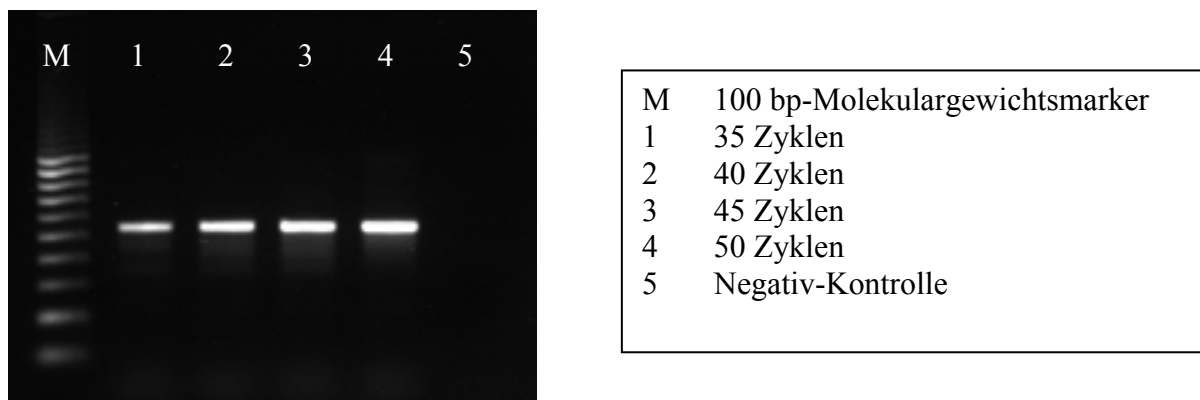


Abbildung 22: Einfluss der Zyklenzahl auf das PCR-Ergebnis

Bei allen Primerpaaren sind folgende Werte als Optimum festgelegt worden und beziehen sich auf einen 50 µl PCR-Ansatz: 1,5 U *Taq*; 0,25 mM dNTPs; 0 % DMSO, 45 Zyklen.

Die für die einzelnen Primerkombinationen variierenden Parameter sind in Tabelle 14 zusammengefasst. Dabei wurden die durch den Gradientencycler entstandenen Dezimalstellen der Temperaturen auf ganze Zahlen gerundet und bei zwei gleich starken Banden der dazwischenliegende Wert gewählt. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden die optimierten Protokolle eingesetzt.

Tabelle 14: Zusammenfassende Darstellung der im Versuch ermittelten Magnesium- und Temperaturoptima für die verschiedenen Primerkombinationen

Bezeichnung der Primerkombination	Annealingtemperatur (°C)	MgCl ₂ -Konzentration (mM)
NS 166/ NS 681	55	2
NS 170/ NS 681	53	2
NS 310 / NS 681	56	1,5
NS 318/ NS 681	51	1,5
NS 166/ NS 700	45	2
NS 170/ NS 700	45	2
NS 310 / NS 700	41	2
NS 318/ NS 700	42	2

1.4 Wahl des PCR-Protokolls zur Detektion von *Aphanomyces astaci* in der Kutikula

Im Anschluss an die Optimierung der Reaktionsbedingungen für die PCR wurden die Primerkombinationen auf ihre Spezifität gegenüber Wirts-DNA, *Aphanomyces astaci* und den nah verwandten Arten *Aphanomyces brassicae*, *Aphanomyces cladogamus*, *Aphanomyces cochloides*, *Aphanomyces euteiches*, *Aphanomyces helicoides*, *Aphanomyces laevis* und *Aphanomyces stellatus* (syn. *Achlya racemosa*) überprüft. Kein Primerpaar amplifizierte die DNA von Krebsmuskulatur (*Astacus astacus*), *Aphanomyces stellatus* und *Aphanomyces brassicae*, alle anderen Proben erbrachten ein Signal im erwarteten Größenbereich. Die Primerkombinationen, bei denen ein Teil aus den Primern NS 310 oder NS 318 bestand, erwiesen sich im Gebrauch als unzuverlässig und wurden nicht weiter eingesetzt. Am reproduzierbarsten zeigten sich die Primerkombinationen NS 166/NS 681 und NS 170/NS 681. Ihre Sensitivität wurde in einer sog. „Spiked PCR“, bei der definierte Sporenmengen mit 30 mg Krebsmuskulatur zur DNA-Extraktion (DNeasy[®] Tissue Kit, Qiagen) eingesetzt wurden, verglichen (Abbildung 23). Die untere Nachweisgrenze von NS 166/NS 681 lag bei 10 Sporen/mg Gewebe, die von NS 170/NS 681 bei 100 Sporen/mg Gewebe (siehe auch III.C.1.7).

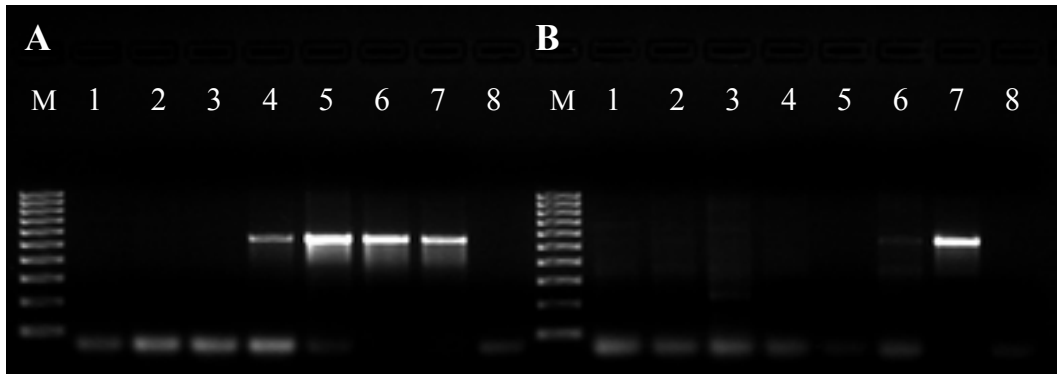


Abbildung 23: Sensitivitätsvergleich der Primerkombinationen NS 166/NS 681 und NS 170/NS 681 in der jeweils einfachen Spiked PCR

A		NS 166/NS 681		B		NS 170/NS 681	
M		100 bp-Molekulargewichtsmarker					
1	3	Sporen/30 mg					
2	9	Sporen/30 mg					
3	30	Sporen/30 mg			(1 Spore/mg)		
4	300	Sporen/30 mg			(10 Sporen/mg)		
5	900	Sporen/30 mg			(30 Sporen/mg)		
6	3000	Sporen/30 mg			(100 Sporen/mg)		
7	9000	Sporen/30 mg			(300 Sporen/mg)		
8		Negativ-Kontrolle					

Da das Ziel verfolgt wurde, einerseits eine möglichst sensitive und für *Aphanomyces astaci*-spezifische PCR zu etablieren, und andererseits durch die Vielzahl der neu konstruierten Primer die Möglichkeit bestand, eine weitere PCR zu entwickeln, die auch andere, nah verwandte Arten erkennt, wurden im Folgenden diese zwei Strategien weiterverfolgt. Ihre unterschiedlichen Ansatzpunkte, Vor- und Nachteile werden in der Diskussion näher besprochen. Beide PCRs sollten möglichst sensitiv den Krebspesterreger unter Vorhandensein von Wirtsgewebe nachweisen können, wozu die Entwicklung einer Nested PCR als geeignet erschien. Da bei den neu konstruierten Primern die Auswahl bereits zuvor auf NS 166 und NS 170 als „upstream“ Primer mit jeweils NS 681 als „downstream“ Primer reduziert wurde, stand diese verschachtelte PCR bereits fest. Der Primer NS 681 kommt sowohl bei der äußeren als auch bei der inneren PCR zum Einsatz, womit es sich hier um eine sog. „Semi-Nested PCR“ handelt. In diesem besonderen Fall unterscheiden sich aber auch die Primer NS

166 und NS 170 um nur drei Nukleotide und ihr 3`-Ende ist nur vier Basenpaare gegeneinander versetzt (Abbildung 61, Anhang).

Nachdem die Reaktionsbedingungen, einschließlich der Zyklenzahl, für die einzelnen der zuvor als am Besten funktionierend ausgewählten Primerpaare NS 166/NS 681, NS 170/NS 681 und BO 525/BO 640 ermittelt worden waren (III.C.1.3), musste nun die Zyklenzahl bei Kombination von jeweils zwei hintereinandergeschalteten PCRs optimiert werden. Gleichzeitig sollte das Primerpaar herausgefunden werden, das sich am besten zur äußeren PCR mit BO 525/BO 640 als innere PCR eignet. Die drei möglichen Nested PCRs wurden anhand klinischer Proben mit folgenden Zyklenzahl-Kombinationen durchgeführt: 40x40, 40x60, 60x40 und 60x60, um möglichst hohe und möglichst niedrige Zyklenzahlen auszutesten und Unterschiede in der Eignung zu erkennen. Als Material diente gering („+“)-, mittel („++“)- und hochgradig („+++“) infizierte Kutikula (Abbildung 24).

Bei den einfachen PCRs mit den zwei möglichen äußeren Primerpaarungen (NS 166/NS 681, NS 170/NS 681) einzeln war bei allen drei eingesetzten Befallsstärken weder nach 40 noch nach 60 Zyklen ein Signal zu erkennen.

Nach der Semi-Nested PCR mit den Primerkombinationen NS 166/NS 681 und NS 170/NS 681 (Abbildung 24, A) konnte bei Einsatz der DNA aus hochgradig befallener Kutikula eine starke Bande bei einer ersten PCR mit 40 Zyklen beobachtet werden, unabhängig von der Zyklenzahl der zweiten PCR (40 bzw. 60 Zyklen). Wurde die äußere PCR mit 60 Zyklen durchgeführt, so trat eine schwache Bande nur bei schwach infizierter Kutikula auf. Dieses Ergebnis spricht für die Wahl einer niedrigeren Zyklenzahl in der äußeren PCR und es wurden 45 Zyklen für beide PCRs festgelegt.

Bei der Nested PCR mit NS 170/NS 681 und BO 525/BO 640 (Abbildung 24, C) war zwischen den ausprobierten Zyklenkombinationen kaum ein Unterschied zu erkennen, außer dass bei 40x40 Zyklen eine schwache Bande bei geringgradigem Befall auftrat. Ansonsten wurde ausschließlich die hochgradig befallene Kutikula bei allen vier Kombinationen gleichermaßen nachgewiesen.

Die verschachtelte PCR mit NS 166/NS 681 als äußerem Primerpaar und BO 525/BO 640 als innerem (Abbildung 24, B) erbrachte das deutlich beste Resultat. Alle drei Befallsstärken ergaben starke Signale, so dass diese Kombination gegenüber der mit NS 170/NS 681 favorisiert und im weiteren Verlauf zur Detektion von *Aphanomyces astaci* in der Kutikula eingesetzt wurde.

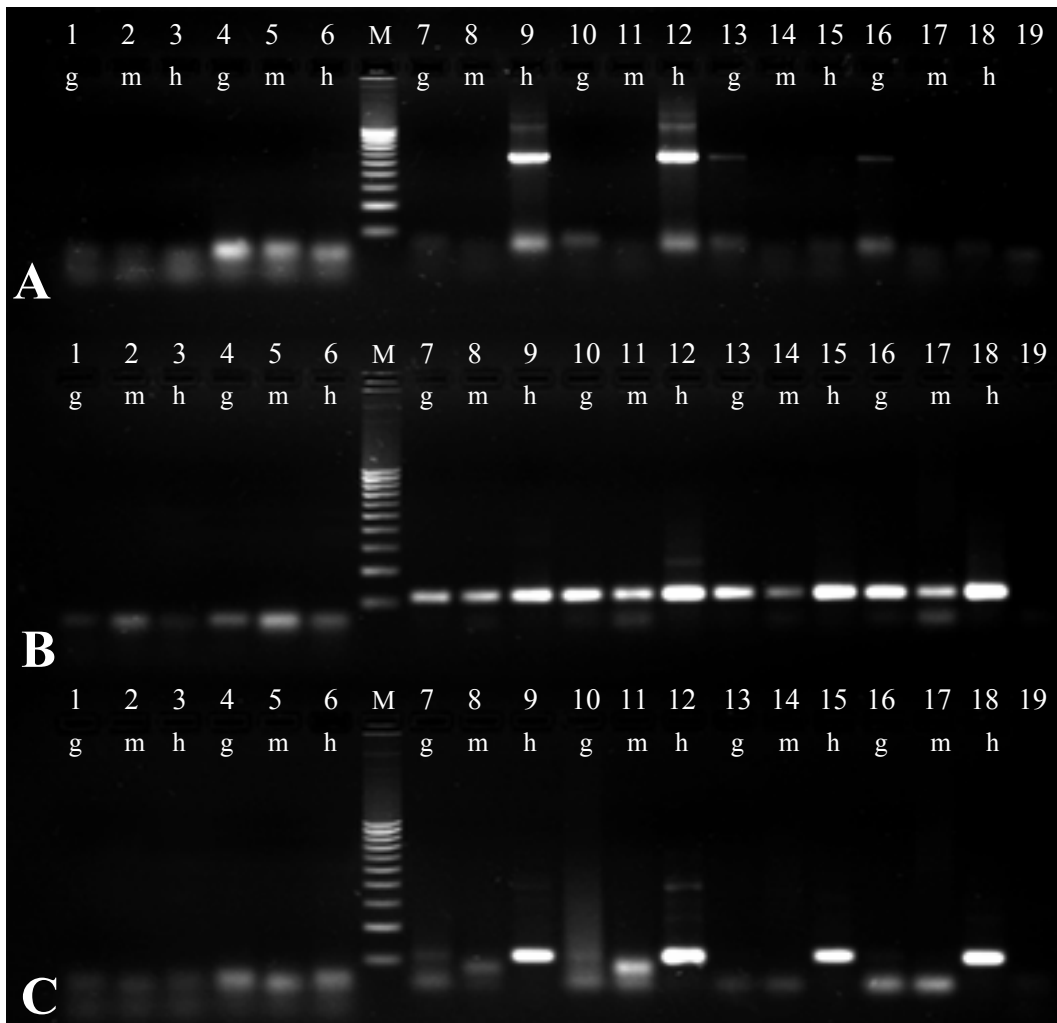


Abbildung 24: Optimierung der Zyklenzahl für die Nested PCRs mit den Primerkombination (A) NS 166/NS 681 und NS 170/NS 681, (B) NS 166/NS 681 und BO 525/BO 640 und (C) NS 170/NS 681 und BO 525/BO 640

M	100 bp-Molekulargewichtsmarker		
g	geringgradig infizierte Kutikula		
m	mittelgradig infizierte Kutikula		
h	hochgradig infizierte Kutikula		
<u>einfache PCRs (äußeres Primerpaar):</u>		<u>Nested PCRs (1.PCR/2.PCR):</u>	
1, 2, 3	40 Zyklen	7, 8, 9	40/40 Zyklen
4, 5, 6	60 Zyklen	10, 11, 12	40/60 Zyklen
		13, 14, 15	60/40 Zyklen
19	Negativ-Kontrolle	16, 17, 18	60/60 Zyklen

1.5 Bestimmung der Spezifität der entwickelten PCRs

Bei den zwei entwickelten, verschachtelten PCRs (NS166/NS 681 und NS 170/NS 681; NS 166/NS 681 und BO 525/BO 640) wurde die Spezifität gegenüber der DNA von *Aphanomyces astaci* und anderen nahe und weiter entfernt verwandten Pilzen, Bakterien, Parasiten und Krebsen getestet. Eine Auflistung der eingesetzten Arten ist im Materialteil (Tabelle 8) zu finden. Verwendet wurden Pilzreinkulturen, um sicherzustellen, dass nur die zu prüfende DNA Einfluss auf das PCR-Ergebnis hatte. Das Produkt der inneren Primer NS 170/NS 681 sollte der Krebspesterreger und andere, mit diesem nah verwandte, Arten der Gattung *Aphanomyces* sein. BO 525/BO 640 sollte ausschließlich *Aphanomyces astaci* amplifizieren.

Die überprüften Bakterien (*Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei*) und Parasiten (*Psorospermium haeckeli*, *Thelohania contejeani*) kommen alle bei Flusskrebsen vor, ebenso *Fusarium solani* und *Trichosporon beigelii*. *Aspergillus sp.*, *Candida albicans* und *Mucor sp.* wurden als Vertreter der mit *Aphanomyces* entfernt verwandten Pilze getestet; mit ihnen wird ebenfalls im Labor gearbeitet, und es sollte ausgeschlossen werden, dass eine Kontamination mit diesen zu einem falsch positiven Krebspestnachweis führen kann. Die eingesetzten Oomycota stellen die am nächsten verwandten Arten von *Aphanomyces astaci* dar. Bereits bei der Konstruktion der Primer wurde darauf geachtet, dass insbesondere deren 3'-Ende bei dem Vergleich der Sequenz von *Aphanomyces astaci* mit bekannten Sequenzen von Oomycota in variablen Regionen liegt. Desweiteren wurde sichergestellt, dass die Primer nicht zu Sequenzen von Wirts-DNA homolog sind, da diese bei der Extraktion aus infizierter Kutikula immer vorhanden sein wird. Verwendet wurde die zellreiche Muskulatur von drei unterschiedlichen Krebsarten: *Astacus astacus* als Vertreter der hochempfindlichen Spezies, *Pacifastacus leniusculus* und *Procambarus clarkii* als Vertreter der oft unerkannten Überträger der Infektion. Ebenfalls negativ getestet wurde die nicht infizierte Kutikula von Edelkrebsen, die zusammen mit den PCR-Produkten der Infektionsversuche auf ein Gel aufgetragen wurde (Abbildungen 48-50) und dort als „gesunder Krebs“ bezeichnet wird.

Sowohl bei der Semi-Nested als auch bei der Nested PCR trat kein Signal auf bei Wirtsgewebe, den Bakterien, *Psorospermium haeckeli*, den eingesetzten Saprolegnia-Arten, *Isoachlya turoloides*, *Isoachlya eccentrica*, *Leptolegnia sp.*, *Pythium flevoense*, *Fusarium*

solani, *Trichosporon beigelii*, *Aspergillus sp.*, *Candida albicans*, *Mucor sp.*, *Aphanomyces stellatus* (syn. *Achlya racemosa*) und *Aphanomyces brassicae*. Bei diesen Arten wurden zur Bestätigung des Vorhandenseins einer ausreichenden Menge an DNA im Eluat PCRs mit Primern durchgeführt, die sicher ein Signal mit der entsprechenden DNA erzeugen müssten (III.B.4.3, Tabelle 12). Abbildung 25 zeigt diese Positiv-Kontrollen.

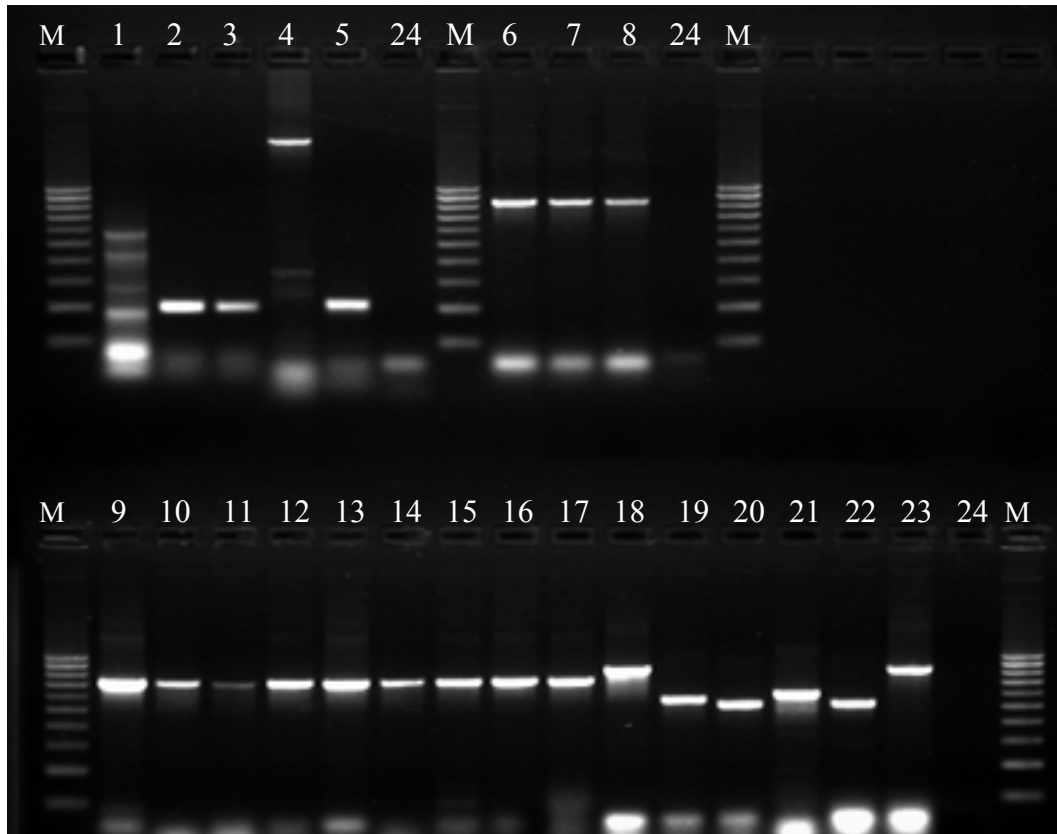


Abbildung 25: Darstellung der Positiv-Kontrollen der in den entwickelten PCRs negativen Proben im 1,3 % Agarose-Gel unter Angabe der verwendeten Primer

M	100 bp-Molekulargewichtsmarker			
1	<i>Aeromonas hydrophila</i>	(CSPU 3/CSPU 5)	13	<i>Saprolegnia parasitica</i> (ITS 1/ITS 4)
2	<i>Citrobacter freundii</i>	(CSPU 3/CSPU 5)	14	<i>Saprolegnia terrestris</i> (ITS 1/ITS 4)
3	<i>Hafnia alvei</i>	(CSPU 3/CSPU 5)	15	<i>Isoachlya turoloides</i> (ITS 1/ITS 4)
4	<i>Psorospermium haeckeli</i>	(ITS 1/ITS 4)	16	<i>Isoachlya eccentrica</i> (ITS 1/ITS 4)
5	<i>Thelohania contejeani</i>	(MIC5-1/MIC3-4)	17	<i>Leptolegnia sp.</i> (ITS 1/ITS 4)
6	<i>Astacus astacus</i>	(143F/145R)	18	<i>Pythium flevoense</i> (ITS 1/ITS 4)
7	<i>Procambarus clarkii</i>	(143F/145R)	19	<i>Fusarium solani</i> (ITS 1/ITS 4)
8	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	(143F/145R)	20	<i>Trichosporon beigelii</i> (ITS 1/ITS 4)
9	<i>Saprolegnia diclina</i>	(ITS 1/ITS 4)	21	<i>Aspergillus sp.</i> (ITS 1/ITS 4)
10	<i>Saprolegnia ferax</i>	(ITS 1/ITS 4)	22	<i>Candida albicans</i> (ITS 1/ITS 4)
11	<i>Saprolegnia furcata</i>	(ITS 1/ITS 4)	23	<i>Mucor sp.</i> (ITS 1/ITS 4)
12	<i>Saprolegnia litoralis</i>	(ITS 1/ITS 4)	24	Negativ-Kontrolle

Die **Semi-Nested PCR** mit NS 170/NS 681 als innerem Primerpaar ergab eine Bande bei allen getesteten *Aphanomyces astaci*-Stämmen, sowie bei *Aphanomyces cladogamus*, *Aphanomyces cochloides*, *Aphanomyces euteiches*, *Aphanomyces helicoides*, *Aphanomyces iridis*, *Aphanomyces irregulare* und *Aphanomyces laevis*. Kein Signal trat, wie erwartet, bei *Aphanomyces stellatus* (syn. *Achlya racemosa*) und unerwarteterweise bei *Aphanomyces brassicae* auf. Beide reagierten aber deutlich positiv in der Kontrolle mit den Primern ITS 1 und ITS 4 (Abbildung 26), *Aphanomyces brassicae* allerdings mit einer für Oomycota ungewöhnlichen Produktgröße von etwa 600 bp. Die Sequenz des zwischen ITS 1 und ITS 4 liegenden Bereichs von *Aphanomyces stellatus* war zuvor bekannt und wurde bereits zur Konstruktion der Primer herangezogen (Anhang, Abbildung 61). Die ITS-Region von *Aphanomyces brassicae* wurde im Rahmen dieser Arbeit sequenziert und gegen die Sequenz des Referenzstammes M96/1 aligned (Anhang, Abbildung 63). Dabei zeigte sich *Aphanomyces brassicae* nur wenig homolog zu *Aphanomyces astaci*, was ebenfalls auf den Sequenzbereich der Angriffstellen der Primer zutrif.

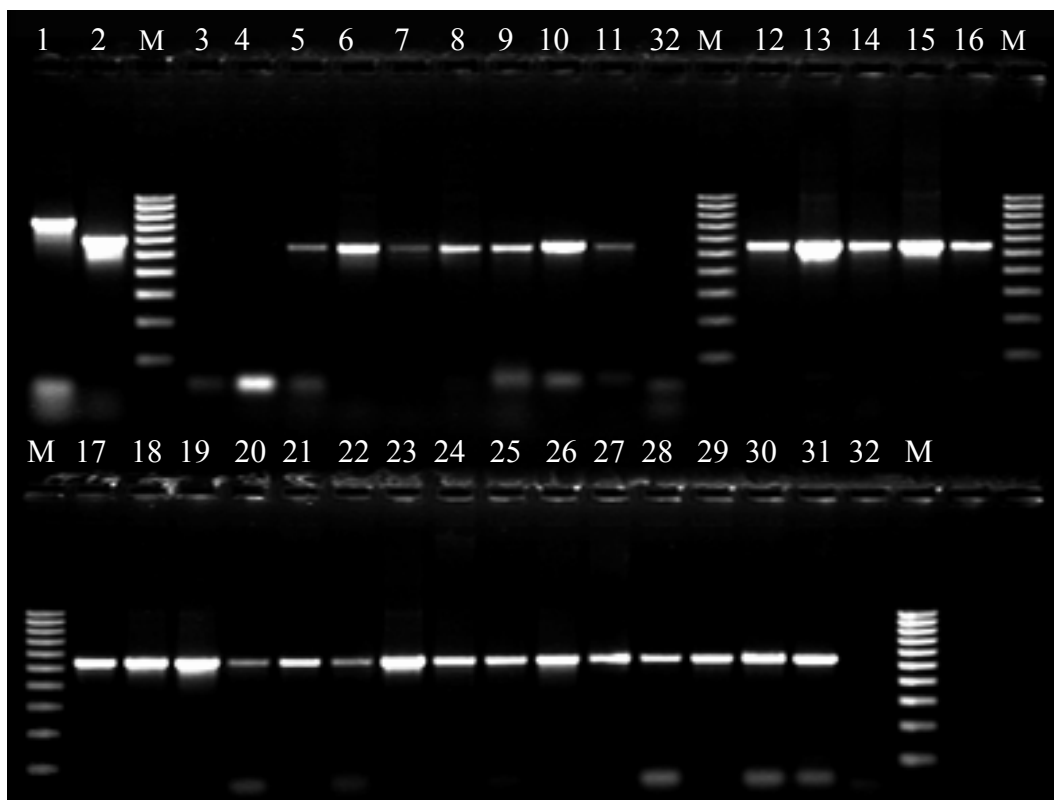


Abbildung 26: PCR-Produkte im erwarteten Größenbereich (550 bp) nach der Semi-Nested PCR mit NS 170/ NS 681 als innerem Primerpaar (Legende siehe Kasten nächste Seite)

M	100 bp-Molekulargewichtsmarker		
Positiv-Kontrolle mit ITS 1/ITS 4:			
1	<i>Aphanomyces stellatus</i> (syn. <i>Achlya racemosa</i>)		
2	<i>Aphanomyces brassicae</i>		
<u>Aphanomyces-Arten:</u>		<u><i>Aphanomyces astaci</i>-Stämme:</u>	
3	<i>Aphanomyces stellatus</i>	12	L1 22 Pl
4	<i>Aphanomyces brassicae</i>	13	Sv 23 SA
5	<i>Aphanomyces cladogamus</i>	14	Ra 24 Si
6	<i>Aphanomyces cochloides</i>	15	VL 25 Hö
7	<i>Aphanomyces euteiches</i>	16	Da 26 Kv
8	<i>Aphanomyces helicoides</i>	17	Ti 27 Pc
9	<i>Aphanomyces iridis</i>	18	Yx 28 F
10	<i>Aphanomyces irregulare</i>	19	FDL 457 29 01
11	<i>Aphanomyces laevis</i>	20	M96/1 30 G1
		21	M96/2 31 E
32	Negativ-Kontrolle		

Die **Nested PCR** mit den Primerkombinationen NS 166/NS 681 und BO 525/BO 640 amplifizierte ausschließlich die DNA von *Aphanomyces astaci*, und zwar von allen eingesetzten Stämmen. Weder bei den nah verwandten Arten der Gattung *Aphanomyces* noch bei anderen Proben konnte ein Signal beobachtet werden (Abbildung 27). Um eventuelle Unterschiede in der Sequenz der ITS-Region bei den verschiedenen Genotypen festzuhalten, wurden zusätzlich zu den bereits bekannten Sequenzen der ITS-Region von L1 (Gruppe A), M96/1 und FDL 457 (Gruppe B) die Region zwischen den Primern ITS 1 und ITS 4 der *Aphanomyces astaci*-Isolate VL und Da (Gruppe A), Kv (Gruppe C), Pc (Gruppe D) und zusätzlich von dem in München isolierten und genotypisch nicht mittels RAPD charakterisierten Stamm E sequenziert (III.C.1.7). Die Produktgrößen mit dem Primerpaar BO 525/BO 640 liegen bei 114 bp für M96/1 und Li, bei 115 bp für FDL 457, Kv, Pc und E und bei 116 bp für VL und Da.

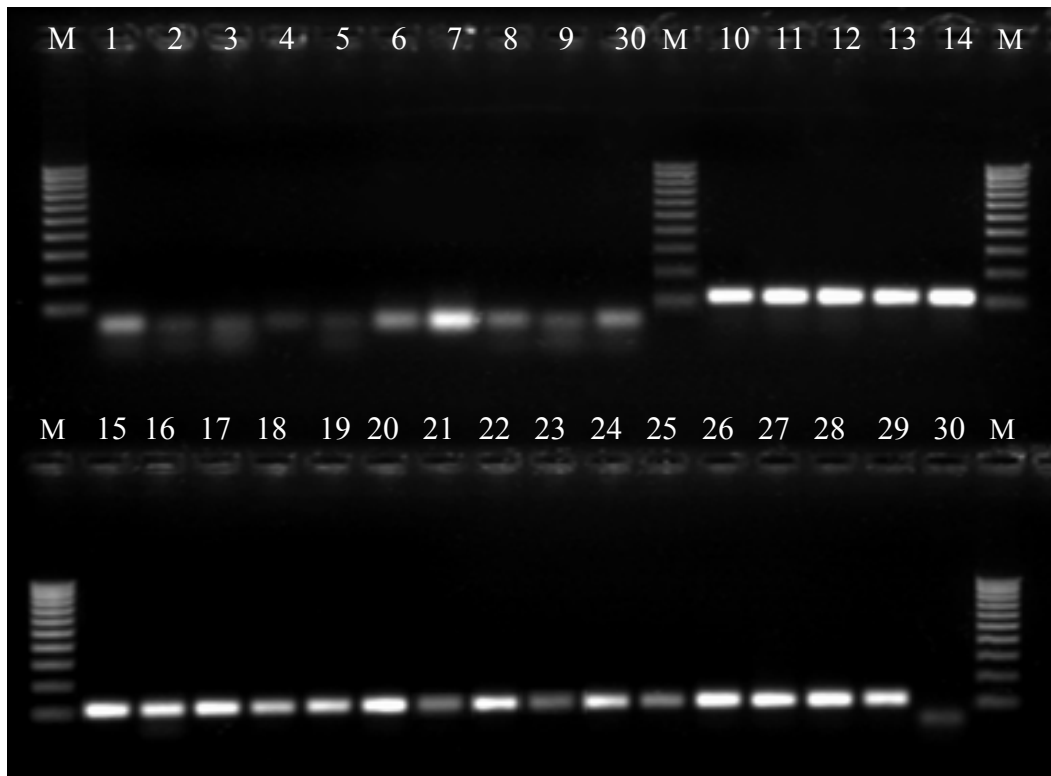


Abbildung 27: PCR-Produkte im erwarteten Größenbereich (114 bzw. 115 bp) nach der Nested PCR mit BO 525/BO 640 als innerem Primerpaar

M	100 bp-Molekulargewichtsmarker			
<u>Aphanomyces-Arten:</u>				
1	<i>Aphanomyces stellatus</i>			
2	<i>Aphanomyces brassicae</i>			
3	<i>Aphanomyces cladogamus</i>			
4	<i>Aphanomyces cochloides</i>			
5	<i>Aphanomyces euteiches</i>			
6	<i>Aphanomyces helicoides</i>			
7	<i>Aphanomyces iridis</i>			
8	<i>Aphanomyces irregulare</i>			
9	<i>Aphanomyces laevis</i>			
<u><i>Aphanomyces astaci</i>-Stämme:</u>				
10	L1	20	PI	
11	Sv	21	SA	
12	Ra	22	Si	
13	VL	23	Hö	
14	Da	24	Kv	
15	Ti	25	Pc	
16	Yx	26	F	
17	FDL 457	27	01	
18	M96/1	28	G1	
19	M96/2	29	E	
30	Negativ-Kontrolle			

1.6 Verifikation der PCR mit RFLP (Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus)

Den in III.C.1.4 beschriebenen PCRs schloss sich nach Auftreten einer Bande eine RFLP-Analyse an. Dabei werden die entstandenen PCR-Produkte mittels einer Endonuklease hydrolytisch verdaut.

Bei der **Nested PCR** mit BO 525/BO 640 konnte bereits aufgrund des Auftretens eines PCR-Produktes mit einer Größe von etwa 115 bp eine Diagnose gestellt werden, da dieses Primerpaar in den Versuchen ausschließlich DNA von *Aphanomyces astaci* amplifizierte (Abbildung 27). Bei dieser PCR dient die folgende enzymatische Hydrolyse einzig der Verifikation der PCR-Produkte. Die Schwierigkeit, für das kleine Fragment eine geeignete Schnittstelle zu finden, wurde durch Einsatz des Restriktionsenzym *Hph I* gelöst. Mit Hilfe des Programms MAPDRAW (Software zur DNA-Analyse, „Lasergene for Windows“, DNASTAR, Inc., Version 1997) wurden mögliche Schnittstellen ermittelt und dieses Enzym ausgewählt. *Hph I* spaltet das 114 bp große Fragment von M96/1 in ein 54 bp und ein 60 bp großes Stück, das der anderen *Aphanomyces astaci*-Stämme entsprechend. Nach Auftrennung in einem 2,5 % Agarose-Gel können diese beiden Fragmente nicht unterschieden werden, sondern erscheinen als eine Bande bei etwa 60 bp. Zur besseren Veranschaulichung wurde hier ein Größenmarker aufgetragen, der alle 20 bp ein Signal setzt (Abbildung 28). Vor der Verdauung wurden die PCR-Produkte aufgereinigt (QIAquick[®] PCR Purification Kit, Qiagen), um sicherzustellen, dass es sich bei auftretenden Banden unter 100 bp um das erwartete RFLP-Muster und nicht um Nebenprodukte der PCR oder Primer-Dimere handelt.

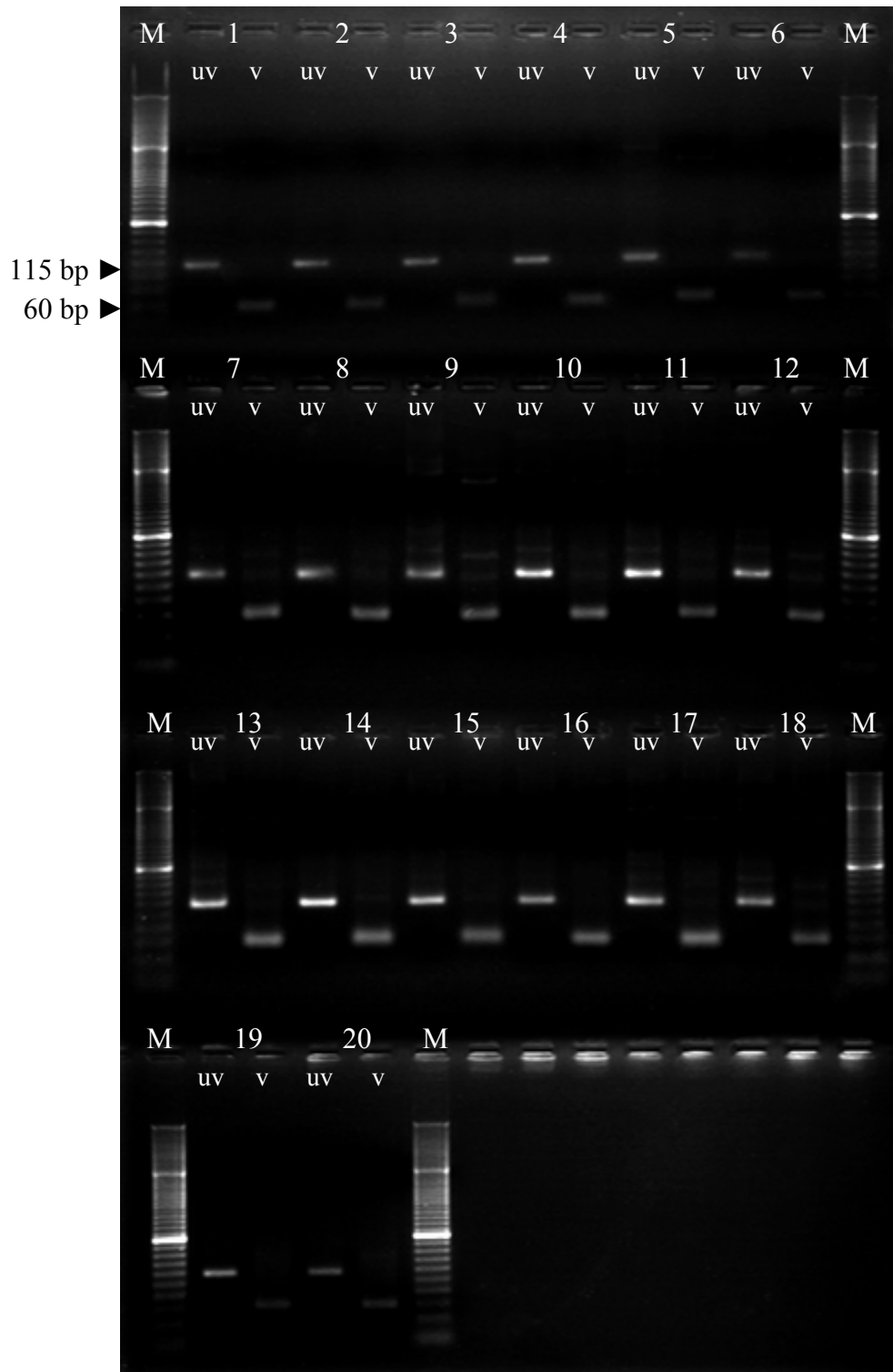


Abbildung 28: *Hph I*-Verdauung von zuvor aufgereinigten 114 (M96/1) bzw. 115 bp- großen PCR-Produkten von *Aphanomyces astaci*-Stämmen (Legende siehe Kasten nächste Seite)

M	20 bp-Molekulargewichtsmarker						
uv	unverdautes PCR-Produkt						
v	mit <i>Hph I</i> verdautes PCR-Produkt						
<u><i>Aphanomyces astaci</i>-Stämme:</u>							
1	L1	6	Ti	11	Pl	16	Pc
2	Sv	7	Yx	12	SA	17	F
3	Ra	8	FDL 457	13	Si	18	01
4	VL	9	M96/1	14	Hö	19	G1
5	Da	10	M96/2	15	Kv	20	E

Die RFLP-Analyse der PCR-Produkte nach der **Semi-Nested PCR** mit NS 170/NS 681 als innerem Primerpaar sollte nicht nur der Bestätigung des PCR-Ergebnisses, sondern auch der Speziesdiagnose dienen. Von den Pilzarten, die mit der Semi-Nested PCR Produkte ergaben, war die Sequenz von *Aphanomyces astaci*, *Aphanomyces helicoides* und *Aphanomyces laevis* bekannt. Mögliche Restriktionsenzyme wurden auf der Grundlage dieser Sequenzinformationen per Computer, wie bereits oben beschrieben, vorgeschlagen und die drei Enzyme *Hinf I*, *Mnl I*, *Mly I* in die engere Auswahl gezogen, da deren RFLP-Muster sich theoretisch bei *Aphanomyces astaci*, *Aphanomyces helicoides* und *Aphanomyces laevis* am meisten unterschieden. Ihre Anwendbarkeit wurde daraufhin experimentell ermittelt. Es war relativ schwierig, für das etwa 550 bp-große PCR-Produkt ein geeignetes Enzym zu finden, das bei unterschiedlichen *Aphanomyces*-Arten abweichende RFLP-Muster erzeugt, da die Sequenzen im Bereich vieler Schnittstellen hoch konserviert waren. Die drei ausgewählten Endonukleasen brachten verhältnismäßig kleine Bruchstücke hervor, die im Agarosegel nicht immer zu sehen waren oder durch Konfluenz mit Fragmenten ähnlicher Größe nicht mehr differenziert werden konnten und gleich erscheinende Muster ergaben. Durch die *Mnl I*-Hydrolyse konnte nur *Aphanomyces laevis* von den anderen *Aphanomyces*-Arten sicher unterschieden werden, durch das Restriktionsenzym *Mly I* konnte überhaupt keine interspezifische Diagnose gestellt werden. Die Sequenzanalyse per Computer ergab, dass *Hinf I* das 550 bp-große PCR-Produkt von *Aphanomyces astaci* (M96/1) theoretisch in folgende Fragmente schneidet: 99 bp, 113 bp, 149 bp und 189 bp. Praktisch entstand dabei ein Muster, das bei allen *Aphanomyces astaci*-Stämmen auftrat und sich deutlich von dem anderer Arten unterschied. *Aphanomyces euteiches*, *Aphanomyces iridis*, *Aphanomyces laevis*, *Aphanomyces cladogamus* und *Aphanomyces cochloides* zeigten untereinander eine identisch erscheinende Auftrennung der verdauten Produkte im Gel, während *Aphanomyces irregulare*

Ergebnisse

und *Aphanomyces helicoides* aufgrund von Banden in davon abweichender Höhe von den anderen getesteten Pilzarten differenziert werden konnten. Abbildung 29 zeigt die RFLP-Muster nach der Verdauung mit *Hinf I* der *Aphanomyces*-Spezies, die in der verschachtelten PCR mit dem Primerpaar NS 170/NS 681 ein Produkt ergeben haben, Tabelle 15 die bei den Semi-Nested PCR-positiven *Aphanomyces*-Arten entstandenen RFLP-Fragmentgrößen.

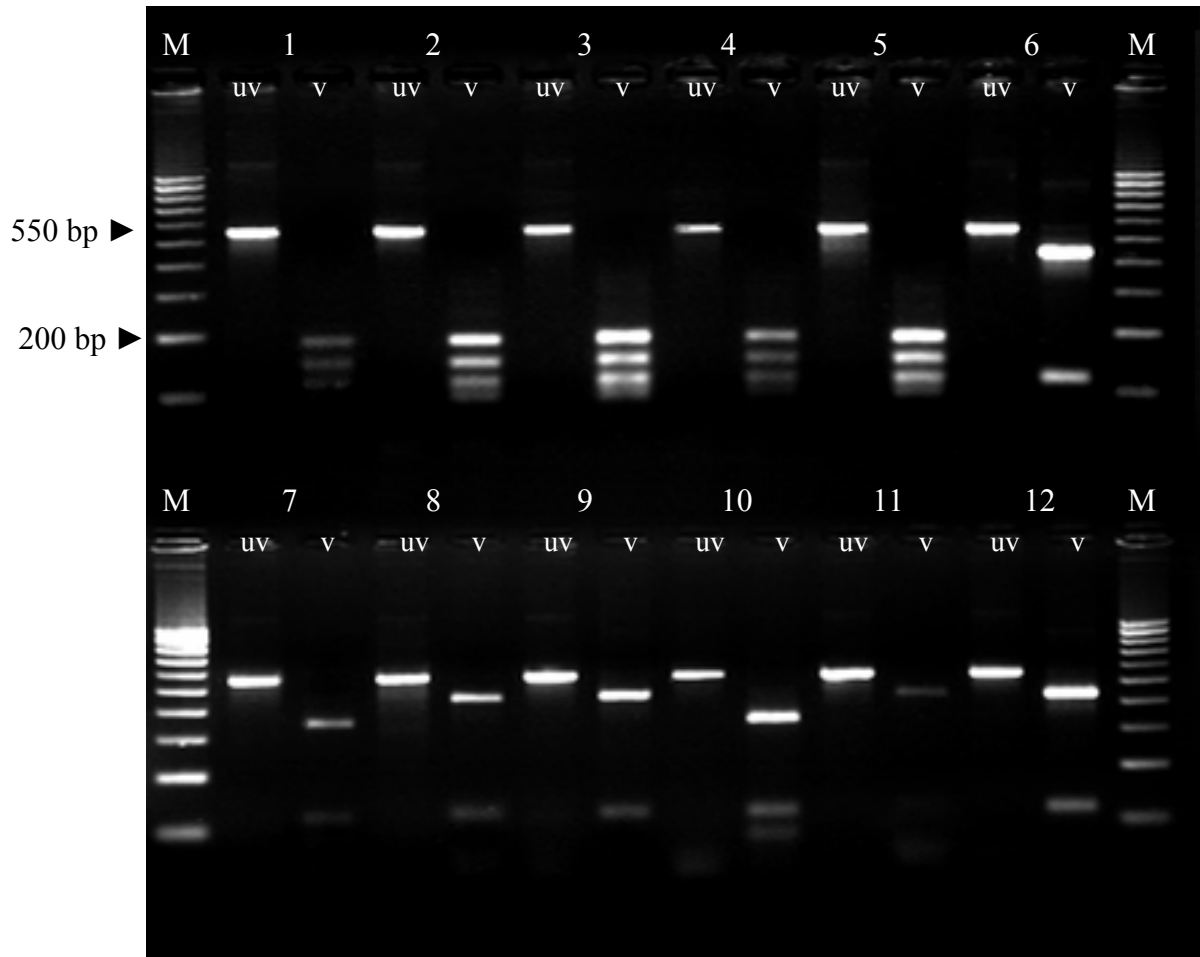


Abbildung 29: *Hinf I*-Verdauung der zuvor aufgereinigten ca. 550 bp-großen PCR-Produkte der verschiedenen *Aphanomyces*-Spezies

M	100 bp-Molekulargewichtsmarker	
uv	unverdautes PCR-Produkt	
v	mit <i>Hinf I</i> verdautes PCR-Produkt	<u>andere <i>Aphanomyces</i>-Stämme:</u>
	<u><i>Aphanomyces astaci</i>-Stämme:</u>	
1	Pc	6 <i>Aphanomyces euteiches</i>
2	L1	7 <i>Aphanomyces irregulare</i>
3	E	8 <i>Aphanomyces iridis</i>
4	Kv	9 <i>Aphanomyces laevis</i>
5	M96/1	10 <i>Aphanomyces helicoides</i>
		11 <i>Aphanomyces cladogamus</i>
		12 <i>Aphanomyces cochloides</i>

Tabelle 15: Übersicht über die Größe der Fragmente nach der Restriktionsenzym-Verdauung der etwa 550 bp-großen PCR-Produkte mit *Hinf I*
 Die Sequenzen und damit die Amplifikat-Größen von *Aphanomyces astaci* (550 bp), *Aphanomyces laevis* (556 bp) und *Aphanomyces helicoides* (546 bp) waren bereits bekannt, so dass die genauen Fragmentgrößen ermittelt werden konnten, die der anderen Spezies wurde anhand der Auftrennung im Gel (Abbildung 29) geschätzt.

Aphanomyces-Spezies:	Größe der entstandenen Fragmente nach <i>Hinf I</i> -Verdauung (bp)
<i>Aphanomyces astaci</i> (M96/1)	189, 149, 113, 99
<i>Aphanomyces euteiches</i>	ca. 440, 110 (geschätzte Größe)
<i>Aphanomyces irregulare</i>	ca. 340, 110, < 100? (geschätzte Größe)
<i>Aphanomyces iridis</i>	ca. 440, 110 (geschätzte Größe)
<i>Aphanomyces laevis</i>	443, 113
<i>Aphanomyces helicoides</i>	347, 113, 86
<i>Aphanomyces cladogamus</i>	ca. 440, < 100, < 50 (geschätzte Größe)
<i>Aphanomyces cochloides</i>	ca. 440, 110 (geschätzte Größe)

1.7 Sequenzierung

Anhand des zur Primerkonstruktion durchgeführten Alignments (Anhang, Abbildung 61) wurde der Verwandtschaftsgrad der verwendeten Oomycota-Spezies anhand von Sequenzvergleichen der ITS-Regionen ermittelt. Tabelle 16 gibt die Übereinstimmung der Basenpaare in Prozent Identität an. Die Werte werden um so niedriger, je weiter entfernt verwandt die Arten untereinander sind. Die drei *Aphanomyces astaci*-Stämme M96/1, FDL457 und Li zeigen die größte Homologie mit über 96 % Identität.

Tabelle 16: Prozent Identität der im Alignment (Anhang, Abbildung 61) verglichenen ITS-Sequenzen der Oomycota

1	100,0																			
2	96,9	100,0																		
3	98,3	96,8	100,0																	
4	65,3	61,0	65,3	100,0																
5	65,3	61,0	65,3	99,9	100,0															
6	65,3	63,6	64,3	55,9	55,9	100,0														
7	60,4	61,8	63,4	51,7	51,7	76,5	100,0													
8	62,9	64,6	62,0	59,1	59,1	70,5	64,7	100,0												
9	66,1	64,4	61,7	57,5	57,5	71,3	64,0	85,7	100,0											
10	57,4	56,4	57,2	52,2	52,2	63,6	59,1	58,6	55,5	100,0										
11	57,8	55,9	57,5	48,7	48,7	65,8	59,5	60,3	55,4	92,6	100,0									
12	58,6	57,0	58,2	51,7	51,7	65,4	60,5	59,6	50,9	94,5	96,7	100,0								
13	56,0	55,1	55,8	50,9	50,9	61,9	57,0	50,3	53,5	95,2	91,0	92,9	100,0							
14	40,4	40,8	40,0	39,6	39,6	39,3	39,9	40,4	38,0	38,9	38,5	40,0	39,2	100,0						
15	38,1	38,7	37,3	36,4	36,4	39,3	40,3	38,2	41,0	39,2	39,4	40,3	39,0	73,8	100,0					
16	42,1	42,3	42,2	38,4	38,4	39,3	41,0	39,5	42,0	38,9	39,0	39,1	39,9	77,7	66,9	100,0				
17	38,3	37,3	40,4	38,7	38,7	39,1	39,9	39,5	38,0	39,5	39,8	40,5	36,6	73,5	72,3	68,1	100,0			
18	42,2	43,3	41,8	40,2	40,2	42,4	40,9	40,1	41,5	40,0	38,5	41,1	39,6	39,6	47,1	46,9	46,2	100,0		
19	42,5	42,2	42,5	43,1	43,1	40,5	39,0	42,4	40,5	38,2	38,5	40,1	38,0	44,5	43,1	45,0	42,9	76,5	100,0	
20	42,8	43,3	42,5	40,8	40,8	41,7	39,3	42,5	40,2	39,1	37,8	39,5	38,0	48,3	45,8	49,6	45,8	53,1	53,1	100,0

1 = *Aphanomyces astaci* M96/1

2 = *Aphanomyces astaci* FDL457

3 = *Aphanomyces astaci* Li

4 = *Aphanomyces laevis*

5 = *Aphanomyces helicoides*

6 = *Aphanomyces stellatus*

7 = *Saprolegnia parasitica*

8 = *Saprolegnia litoralis*

9 = *Leptolegnia* sp.

10 = *Achlya bisex.* AF218151

11 = *Achlya dubia* AF218155

12 = *Achlya klebsi.* AF218156

13 = *Achlya prolif.* AF218154

14 = *Peronospora sparsa* AF266783

15 = *Pytophthora drechs.* AF266798

16 = *Phytophthora infes.* AF266779

17 = *Phytophthora* sp. AF087474

18 = *Pythium grami.* AF271229

19 = *Pythium porph.* AB043506

20 = *Pythium undul.* AF271230

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die ITS-Regionen der *Aphanomyces astaci*-Stämme VL, Da, Kv, Pc und E sequenziert, um einen ausreichenden Vergleich der Basenabfolgen von Stämmen zu haben, die mittels RAPD (II.13) unterschiedlichen Genotypen zugeordnet werden. Die Stämme VL, Kv, Pc und E waren innerhalb des sequenzierten ITS-Bereiches 100 % homolog. Der Stamm Da zeigte an Position 641, ausgehend von Position 1 als Beginn der ITS 1-Region, ein zusätzliches Adenin. Im Vergleich zu den neu sequenzierten Stämmen weist M96/1 an Position 52 eine Insertion eines Adenins, FDL 457 an Position 92 eine Thymin- und an Position 585 und 678 jeweils eine Adenin-Insertion auf; Li besitzt an Position 388 ein zusätzliches Thymin. Abbildung 62 (Anhang) zeigt das Alignment aller aktuell bekannten Sequenzen der ITS-Region von *Aphanomyces astaci*-Stämmen, einschließlich der neu sequenzierten Daten von VL, Da, Kv, Pc und E. In der Tabelle 17 sind die daraus resultierenden Prozent Identität untereinander angegeben.

Tabelle 17: Prozent Identität der ITS-Region aller bisher sequenzierten *Aphanomyces astaci*-Stämme (Alignment: Anhang, Abbildung 62)

	Li							
Li	100,0	VL						
VL	99,0	100,0	Da					
Da	98,6	99,7	100,0	FDL457				
FDL457	97,3	98,4	97,8	100,0	M96/1			
M96/1	98,1	99,2	98,7	97,5	100,0	Kv		
Kv	99,0	100,0	99,7	98,4	99,2	100,0	Pc	
Pc	99,0	100,0	99,7	98,4	99,2	100,0	100,0	E
E	99,0	100,0	99,7	98,4	99,2	100,0	100,0	100,0

Außerdem wurde die ITS-Sequenz von *Aphanomyces brassicae* ermittelt, die deutlich von denen anderer *Aphanomyces*-Arten abwich. Das Amplifikat der ITS-Region betrug bei *Aphanomyces brassicae* nur etwa 600 bp, im Gegensatz zu den bei den meisten Oomycota vorkommenden ca. 750 bp. Im Anhang (Abbildung 63) ist das Alignment der ITS-Region von *Aphanomyces brassicae* gegen den Referenzstamm *Aphanomyces astaci* M96/1 dargestellt.

1.8 Bestimmung der Sensitivität der PCRs

Unter Einsatz der optimierten und zum Nachweis von *Aphanomyces astaci* geeigneten PCR-Protokolle wurde die untere Nachweisgrenze sowohl der Semi-Nested als auch der Nested PCR bestimmt. Die unterschiedlichen Ansätze zur Überprüfung der Sensitivität und die Ergebnisse sind im Folgenden erläutert.

Bestimmung der analytischen Sensitivität der PCR mit Plasmid-DNA

Das klonierte Amplifikat der ITS-Region von M96/1 hat eine Länge von 747 bp (Insert) und ist in ein 3900 bp langes Plasmid (pCR[®] 2.1 Vektor) eingebaut. Anhand logarithmischer Verdünnungsreihen der im Spektrophotometer gemessenen Plasmid-DNA konnte eine untere Nachweisgrenze von 10 fg absolut (DNA-Konzentration in Suspension: 1 pg/ml bei Einsatz von 10 µl in die PCR) eingesetztem Material für die Semi-Nested PCR (Abbildung 30) und 10 ag absolut (1 fg/ml) für die Nested PCR mit den spezifischen Primern BO 525/BO 640 (Abbildung 31) festgestellt werden.

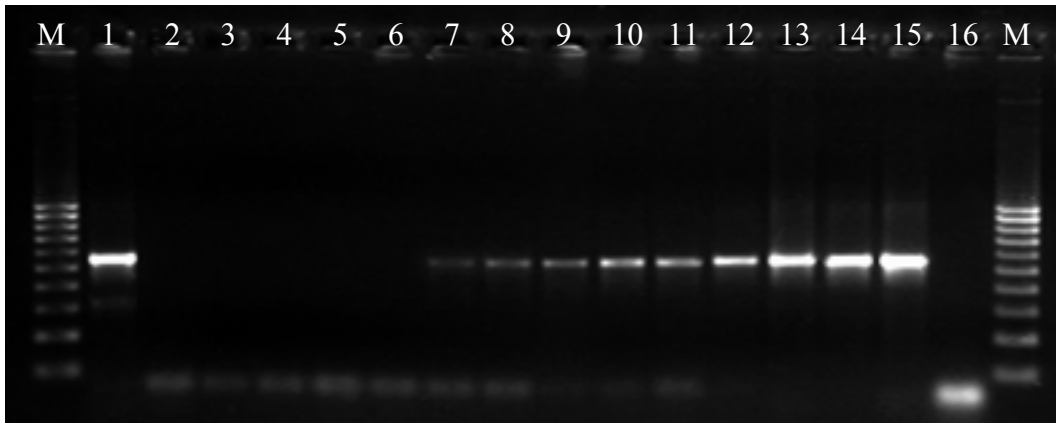


Abbildung 30: Analytische Sensitivität der Semi-Nested PCR (NS 166/NS 681 und NS 170/NS 681) bei Plasmid-DNA (Legende siehe Kasten)

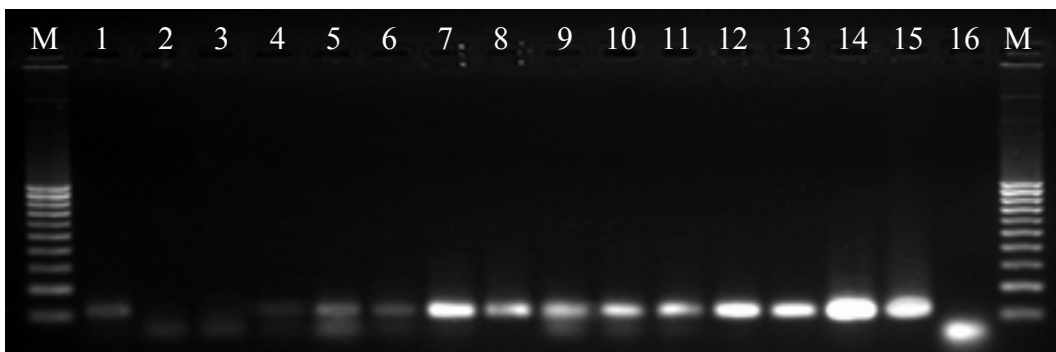


Abbildung 31: Analytische Sensitivität der Nested PCR (NS 166/NS 681 und BO 525/BO 640) bei Plasmid-DNA (Legende siehe Kasten)

M	100 bp-Molekulargewichtsmarker		
1	Positiv-Kontrolle	9	1 pg
2	0,1 ag	10	10 pg
3	1 ag	11	100 pg
4	10 ag	12	1 ng
5	100 ag	13	10 ng
6	1 fg	14	100 ng
7	10 fg	15	1 µg
8	100 fg	16	Negativ-Kontrolle

Bestimmung der analytischen Sensitivität der PCR mit zellulärer DNA aus Pilzmycel

Die analytische Sensitivität bei Einsatz zellulärer DNA aus reiner Pilzkultur (M96/1) lag für beide verschachtelten Primerkombinationen NS 166/NS 681 mit NS 170/NS 681 und NS 166/NS 681 mit BO 525/BO 640 bei 1 ag (Abbildungen 32 und 33, gemeinsame Legende).

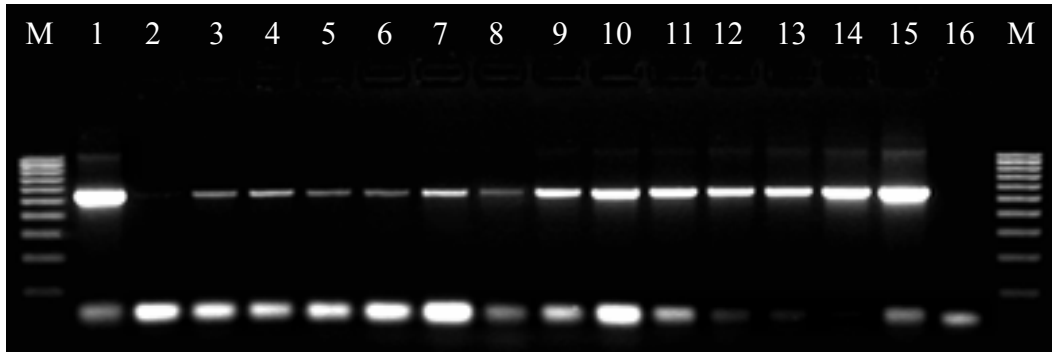


Abbildung 32: Analytische Sensitivität der Semi-Nested PCR (NS 166/NS 681 und NS 170/NS 681) bei zellulärer DNA (Legende siehe Kasten)



Abbildung 33: Analytische Sensitivität der Nested PCR (NS 166/NS 681 und BO 525/BO 640) bei zellulärer DNA (Legende siehe Kasten)

M	100 bp-Molekulargewichtsmarker		
1	Positiv-Kontrolle	9	1 pg
2	0,1 ag	10	10 pg
3	1 ag	11	100 pg
4	10 ag	12	1 ng
5	100 ag	13	10 ng
6	1 fg	14	100 ng
7	10 fg	15	1 µg
8	100 fg	16	Negativ-Kontrolle

Bestimmung der analytischen Sensitivität der PCR mit aus Zoosporen isolierter DNA

Im Rahmen der Untersuchungen wurden 10, 100 und 1000 Sporen mittels Neubauer Zählkammer ausgezählt. 1 Spore wurde durch Verdünnung einer Suspension mit 10 Sporen und Entnahme der entsprechenden Menge nach ausreichender Mischung der Lösung gewonnen. Alle vier in Aqua dest. gelösten Sporenmengen wurden zur DNA-Extraktion mit zwei verschiedenen Kits eingesetzt. Das Nucleon Phytopure[®] for Plant DNA Extraction Kit (Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH) wird zur Isolation von DNA aus pflanzlichem Gewebe empfohlen und wurde bereits erfolgreich bei der DNA-Gewinnung aus, in PG₁-Medium angewachsenem, Pilzmycel angewendet. Es sollte zum Vergleich der Ausbeute durch das DNeasy[®] Tissue Kit (Qiagen) dienen, das im Rahmen dieser Arbeit zur DNA-Isolation aus Krebsgewebe eingesetzt wurde.

Mit der DNA aus der Extraktion mit dem Kit von Qiagen konnte auch dann noch ein PCR-Signal beobachtet werden, als die DNA aus dem Nucleon Phytopure[®] for Plant DNA Extraction Kit bereits ein negatives Ergebnis erbrachte. Deutlich wurde dies vor allem bei der weniger sensitiven Semi-Nested PCR, bei der die untere Nachweisgrenze zwischen 100 und 1000 Sporen für das Nucleon Phytopure[®] Kit und zwischen 1 und 10 Sporen für das Kit von Qiagen lag (Abbildung 34 A).

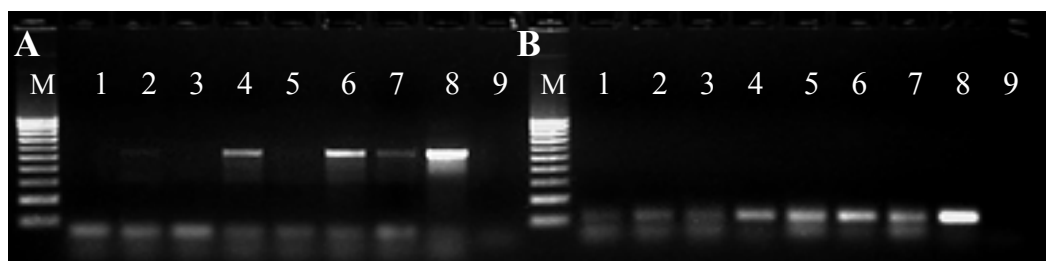


Abbildung 34: Sensitivität der (A) Semi-Nested PCR (NS 166/NS 681 und NS 170/NS 681) und der (B) Nested PCR (NS 166/NS 681 und BO 525/BO 640) gegenüber aus Zoosporen isolierter DNA unter Verwendung zweier verschiedener Extraktionskits

ungerade Zahlen:	Nucleon Phytopure [®] for Plant DNA Extraction Kit	
gerade Zahlen:	Quiagen DNeasy [®] Tissue Kit	
1,2	1 Spore	
3,4	10 Sporen	
5,6	100 Sporen	M 100 bp-Molekulargewichtsmarker
7,8	1000 Sporen	
9	Negativ-Kontrolle	

Bestimmung der Sensitivität im Rahmen einer Spiked PCR

Unter sog. „gespikten“ Proben versteht man solche, bei denen eine definierte Menge an gesundem Wirtsmaterial mit einer definierten Menge infektiöser Einheiten versetzt wird. Im vorliegenden Fall wurden zu jeweils 30 mg nicht infizierter Muskulatur von *Astacus astacus* 0, 30, 90, 300, 900, 3000 und 9000 Zoosporen zugegeben und die DNA isoliert (DNeasy® Tissue Kit Qiagen). Die Positivkontrolle bestand aus 1000 Sporen ohne Muskulatur. Desweiteren wurde eine Probe bestehend aus ausschließlich gesunder Muskulatur und eine Negativ-Kontrolle der Extraktion eingesetzt. Zum Erhalt der Letzteren wird wie bei einer normalen DNA-Extraktion vorgegangen, jedoch ohne Einsatz von Gewebe. So stellt man sicher, dass ein positives PCR-Ergebnis nicht auf kontaminierte Puffer des Extraktionskits zurückzuführen ist.

Die Nachweisgrenze der Semi-Nested PCR lag bei 10 Sporen/mg Muskulatur (Abbildung 23, III.C.1.4), die der Nested PCR bei 1 Spore/mg (Abbildung 35). Zu einem späteren Zeitpunkt wurden zusätzlich 3 und 10 Sporen mit 30 mg Muskulatur (< 1 Spore/mg) in der Spiked PCR eingesetzt, wobei sich die Nachweisgrenze von 1 Spore/mg bestätigte (Abbildung 36).

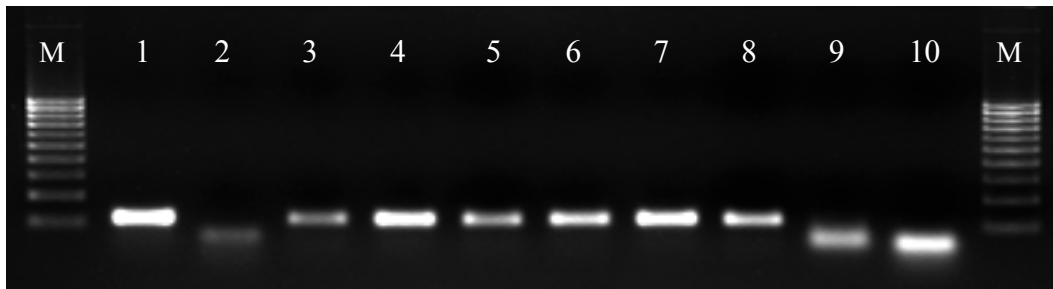


Abbildung 35: Untere Nachweisgrenze der Nested PCR mit BO 525/BO 640 als innerem Primerpaar in der Spiked PCR

M	100 bp-Molekulargewichtsmarker	
1	Positiv-Kontrolle	6 30 Sporen/mg
2	0 Sporen/mg	7 100 Sporen/mg
3	1 Spore/mg	8 300 Sporen/mg
4	3 Sporen/mg	9 Negativ-Kontrolle der Extraktion
5	10 Sporen/mg	10 Negativ-Kontrolle der PCR

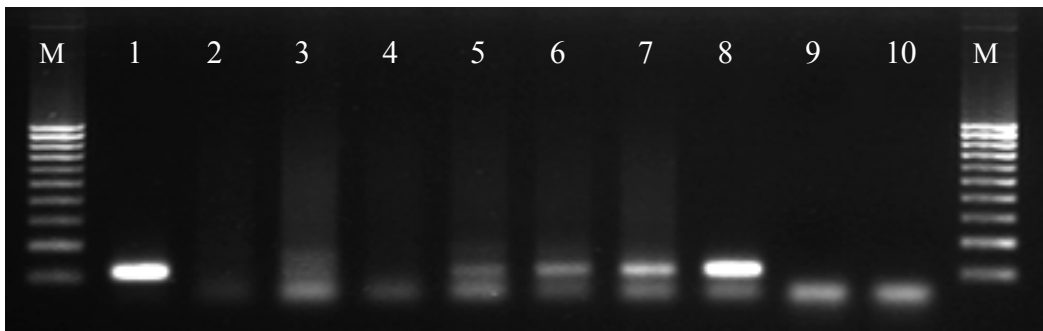


Abbildung 36: Untere Nachweisgrenze der Nested PCR mit BO 525/BO 640 als innerem Primerpaar in der Spiked PCR

M	100 bp-Molekulargewichtsmarker		
1	Positiv-Kontrolle	6	3 Sporen/mg
2	0 Sporen/mg	7	10 Sporen/mg
3	3 Sporen/30 mg	8	30 Sporen/mg
4	10 Sporen/30 mg	9	Negativ-Kontrolle der Extraktion
5	1 Spore/mg	10	Negativ-Kontrolle der PCR

Bestimmung der Sensitivität der PCR im Infektionsversuch

Es wurden Infektionsversuche mit drei verschiedenen Sporendosen (10, 100, 1000 Sporen/ml Wasser) durchgeführt, um herauszufinden, ab welchem Tag post infectionem *Aphanomyces astaci* in den befallenen Edelkrebsen mit den entwickelten Methoden nachgewiesen werden kann. Dabei konnte in allen drei Fällen *Aphanomyces astaci* mit beiden verschachtelten PCRs ab dem ersten Tag der Probenentnahme (entspricht Tag 2 post expositionem) nachgewiesen werden (III.C.2, Abbildungen 50 bis 52).

Mit der Nested PCR (Primerkombinationen NS 166/NS 681 und BO 525/BO 640) konnte ab dem ersten Tag der Probenentnahme bis zum Ende der Infektion bei allen Sporendosen die Infektion nachgewiesen werden, ohne dass ein einziger Edelkrebs kein Signal zeigte (Abbildungen 50 bis 52, B).

Bei der Semi-Nested PCR (Primerkombinationen NS 166/NS 681 und NS 170/NS 681) konnte sowohl bei der Zoosporenexposition mit **10** als auch mit **100 Sporen/ml** Wasser bei zwei Krebsen keine DNA von *Aphanomyces astaci* nachgewiesen werden. Bei allen anderen Proben zeigten sich zum Teil schwache, zum Teil sehr starke Banden in der erwarteten Größe (Abbildungen 50 bis 52, A). Die PCR-Produkte der Infektionsversuche konnten durch die anschließende Verdauung mit den entsprechenden Restriktionsenzymen bestätigt werden

(III.C.1.6). Eine ausführliche Besprechung der Ergebnisse der Infektionsversuche erfolgt im nächsten Kapitel (III.C.2. *Auswertung der Infektionsversuche*).

2. Auswertung der Infektionsversuche

Die über einen Zeitraum von 32 Tagen (Versuchsende = Entnahme des letzten vitalen Edelkrebses) andauernden Infektionsversuche mit drei verschiedenen Zoosporenkonzentrationen wurden, wie unter III.B.1 und III.B.2 beschrieben, vorbereitet. Bei Auszählung der Zoosporen in der Neubauer Zählkammer wurde die Motilität dieser auf ca. 30 % geschätzt. Unter mehrfachen Kontrollzählungen wurden die Sporen auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt und mit diesen Sporensuspensionen die vorbereiteten Flatdecks versetzt. Vorsichtiges Handling sollte eine unnötige Agitation der Suspension vermeiden, die zu einer Abkapselung der Zoosporen und damit einer verminderten Infektiosität führen könnte. Zu diesem Zweck wurde ebenfalls die sprudelnde Sauerstoffzufuhr aus Luftausströmern für eine Stunde zu Beginn der Zoosporenexposition unterbrochen. Die Wassertemperatur während der Versuche betrug 18°C bis 21°C, im Durchschnitt 19°C. Alle zwei Tage wurde je ein Edelkrebs, der keine Symptome einer Infektion zeigte, aus den drei Versuchsgruppen 10 Sporen/ml Wasser, 100 Sporen/ml Wasser und 1000 Sporen/ml Wasser zur Untersuchung entnommen. Bei Auftreten von Todesfällen wurden diese sofort entfernt und ebenfalls untersucht. Die Probennahme der vitalen Krebs erfolgte so lange, bis kein Krebs mehr übrig war (nach 32 Tagen). Tabelle 18 gibt eine Übersicht über die Werte der statistischen Verteilung von Gewicht und Größe der untersuchten Krebse.

Tabelle 18: Übersicht über die statistischen Verteilungsmerkmale (Gewicht, Größe) der in den Infektionsversuchen (10, 100 und 1000 Sporen/ml) eingesetzten Edelkrebse

		Mittelwert	Standard- abweichung	Median	Modus	Minimum	Maximum
Gewicht in g	10 Sporen/ ml	32,81	12,92	31,00	22,00	14,00	72,00
	100 Sporen/ ml	31,03	10,52	31,00	31,00	13,00	55,00
	1000 Sporen/ ml	34,61	11,65	34,00	36,00	18,00	68,00
Größe in cm	10 Sporen/ ml	9,59	1,05	9,40	9,80	7,20	12,80
	100 Sporen/ ml	9,77	0,95	9,70	9,40	8,20	11,80
	1000 Sporen/ ml	9,97	1,05	9,80	9,40	7,80	12,30

Eine tabellarische Übersicht über die Daten zur Auswertung der drei Infektionsversuche geben die Tabellen 19 bis 21. Die hellgrau unterlegten Felder bei der Befallsstärke geben die zur DNA-Isolation eingesetzten Kutikulasegmente an, die dunkelgrau markierten Angaben des zur Extraktion verwendeten Gewebes verweisen auf Melaninbefall.

Tabelle 19: Daten zum Infektionsversuch mit 10 Sporen/ml Wasser

Krebs-Tag post expos.:	Klinische Daten:				Lichtmikroskopische Daten:				Molekularbiologische Daten:						
	entnommen aus Becken Nr.:	Länge in cm:	Gewicht in g:	fehlende Gliedmaßen: Scheren:	Schreitfüße:	Zustand bei Tierentnahme: aktiv, mit Chloroform euthanasiert:	verendet: autolytisch:	Lichtmikroskopische Beurteilung des Befalls der einzelnen Kutikulasegmente:					Gewicht des zur DNA-Extraktion eingesetzten Gewebes in mg:	Ergebnis der (Semi-) Nested PCR mit dem inneren Primerpaar BO 514 / BO 591:	NS 170 / NS 681:
								1	2	3	4	5			
1	2	1	9,8	27	0	0	X						38	(+)	+
2	4	2	8,7	22	0	0	X						51	+	++
3	6	2	9,7	34	0	0	X						50	++	+
4	8	2	9,3	25	1	0	X						50	+	++
5	2	2	9,8	32	1	1	X						49	++	++
6	9	2	10,6	49	1	0	X						52	++	++
7	10	1	8,7	22	1	0	X						50	++	++
8	11	1	7,7	21	1	5	X						36	++	+
9	12	2	9,4	27	0	0	X						50	+	++
10	14	1	8,8	19	1	1	X						52	+	++
11	15	1	10,8	46	0	1	X						51	+	++
12	1	1	9,2	19	2	0	X						51	+	++
13	16	2	10,2	47	0	2	X						51	+	++
14	2	2	12,8	72	1	1	X	X					50	++	+
15	17	2	10,5	42	0	0	X						48	++	++
16	18	1	10,0	32	0	1	X						50	++	+
17	2	2	8,8	24	1	0	X						50	+	+
18	20	1	9,4	31	0	0	X						48	++	+
19	21	1	10,2	39	0	1	X						50	+	(+)
20	22	2	8,0	20	0	0	X						49	++	(+)
21	23	1	9,6	35	1	0	X	X					51	++	+
22	24	2	11,2	63	1	0	X						50	+	+
23	25	1	9,8	35	1	4	X	X					50	+	+
24	1	1	9,2	29	0	1	X						50	++	-
25	1	1	9,0	26	2	0	X						49	+	+
26	2	2	9,4	30	0	2	X	X					51	++	+
27	26	1	10,2	41	1	0	X						50	++	+
28	2	2	9,4	32	0	0	X						50	(+)	+
29	28	1	9,8	40	0	1	X						51	+	+
30	30	1	7,2	14	0	0	X						49	+	+
31	32	2	8,8	22	0	0	X						50	+	-

■ = zur DNA-Extraktion eingesetzte Kutikulasegmente

■ = Segmente mit Melaninbefall zur DNA-Extraktion eingesetzt

Tabelle 20: Daten zum Infektionsversuch mit **100 Zoosporen/ml Wasser**:

Klinische Daten:		Lichtmikroskopische Daten:				Molekularbiologische Daten:							
		entnommen aus Becken Nr.:	Länge in cm:	Gewicht in g:	fehlende Gliedmaßen: Scheren:	Zustand bei Tierentnahme: aktiv, mit Chloroform euthanasiert:	verwendet:	autolytisch:	Lichtmikroskopische Beurteilung des Befalls der einzelnen Kutikulasegmente:	Gewicht des zur DNA-Extraktion eingesetzten Gewebes in mg:	Ergebnis der (Semi-) Nested PCR mit dem inneren Primerpaar BO 514 / BO 591:	Ergebnis der (Semi-) Nested PCR mit dem äußeren Primerpaar NS 170 / NS 681:	
Krebs-Tag post expos.:	Nr.:	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	BO 514 / BO 591:	NS 170 / NS 681:
1	2	3	11,3	47	0	0	X	-	-	-	-	50	++
2	4	4	9,4	26	0	0	X	-	-	-	++	54	++
3	6	3	10,7	32	0	0		+	+++	+++	+++	49	++
4	7	3	10,6	31	2	0		+	++	+	+	47	++
5	5	3	10,8	44	1	0		+	++	+++	+++	50	++
6	6	3	9,9	31	1	0		+	++++	+++	+++	50	++
7	4	4	9,7	31	0	0		+	++	+	+++	50	+
8	4	4	9,4	28	1	0		+	+++	+	+++	54	++
9	8	3	9,7	31	0	0		+	++	+++	+++	60	++
10	4	4	11,2	47	1	0		+	+++	+	+++	59	++
11	4	4	8,6	23	0	0	X	-	-	+/-	-	47	+
12	9	4	9,8	29	1	0		+	+++	+++	+++	52	++
13	4	4	9,6	32	1	0		+	+++	+++	+++	49	+
14	4	4	9,8	34	1	0	X	+	+++	+	+	50	++
15	10	3	8,4	15	1	3	X	-	-	-	-	49	+
16	3	3	11,8	55	1	0		+	+	+	+	51	+
17	4	4	10,2	37	0	4		-	++	+	+++	50	++
18	3	3	8,6	17	1	0		+	+	+++	+++	50	++
19	3	3	10,0	36	1	0		+	++	+	+	49	+
20	4	4	9,4	29	0	0	X	-	-	+	+	50	++
21	14	3	8,0	19	0	0	X	+/-	+/-	+	+	50	++
22	15	4	10,6	52	0	0		+	++++	Autolyse	+	51	(+)
23	4	4	10,4	41	0	0		+	+	+	+	50	++
24	4	4	8,4	13	0	0	X	-	+	+	+/-	48	+
25	17	3	9,4	22	0	1	X	+	+	+	+	49	+
26	18	3	9,8	33	1	0		+	+	+/-	+	51	++
27	4	4	8,2	20	1	0	X	+	++	+	+	52	+
28	20	3	8,8	23	0	0	X	+	+	+/-	+	51	+
29	22	4	9,0	25	0	0	X	-	+	+	-	49	+
30	24	3	9,2	28	0	0	X	+/-	+	+	+	49	++

■ = zur DNA-Extraktion eingesetzte Kutikulasegmente

■ = Segmente mit Melaninbefall zur DNA-Extraktion eingesetzt

Tabelle 21: Daten zum Infektionsversuch mit 1000 Zoosporen /ml Wasser:

Krebs-Tag post expos.: Nr.:	Klinische Daten:				fehlende Gliedmaßen:			Zustand bei Tierentnahme:		Lichtmikroskopische Beurteilung des Befalls der einzelnen Kutikulasegmente:					Molekularbiologische Daten		
	entnommen aus Becken Nr.:	Länge in cm:	Gewicht in g:	Scheren:	Schreitfüße:	Chloroform euthanasiert:	aktiv, mit Chloroform euthanasiert:	verendet:	autolytisch:	1	2	3	4	5	Gewicht des zur DNA-Extraktion eingesetzten Gewebes in mg:	Ergebnis der (Semi-)Nested PCR mit dem inneren Primerpaar BO 514 / BO 591: NS 170 / NS 681:	
																	0
1	2	5	10,1	31	0	0	0	X		-	-	-	-	-	31	+	(+)
2	4	6	10,6	36	0	0	0	X		-	-	-	-	-	34	++	++
3	6	6	10,9	42	0	0	0	X		-	-	-	-	-	51	++	++
4	7	6	12,3	68	0	0	0	X		-	-	-	-	-	50	+	++
5	7	6	9,3	20	1	0	0	X		+	+	++	++	++	53	++	++
6	8	5	8,9	32	1	4	0	X	X	+++	+++	+	Kanni.	46	++	++	
7	6	6	11,1	41	1	1	1	X		+	+++	-	+	49	++	++	
8	6	6	10,2	40	0	0	0	X		+/+	++	-	+	50	++	++	
9	9	5	9,4	44	1	0	0	X		++	+	+	+	51	++	++	
10	10	5	11,8	54	1	0	0	X		+	+	+	+	48	++	++	
11	6	6	9,8	41	1	0	0	X	X	-	+	+	+	48	++	++	
12	6	6	9,4	23	2	0	0	X	X	-	-	-	Autol.	47	++	++	
13	11	6	9,8	38	2	2	0	X	X	+++	+	-	Autol.	50	++	++	
14	6	6	9,4	33	1	0	0	X		+	+	++	++	51	++	++	
15	12	5	10,6	44	0	0	0	X		-	+	+++	+	50	++	+	
16	5	5	9,0	24	1	3	0	X	X	++	+	+	+/+	58	++	(+)	
17	5	5	9,4	25	2	3	0	X		+	+	++	+	60	++	++	
18	6	6	7,8	18	0	0	0	X		-	+	+	-	50	+	(+)	
19	6	6	9,8	40	0	0	0	X		-	-	-	+++	50	++	+	
20	13	5	9,4	30	0	0	0	X		++	+	+	+	56	++	++	
21	14	5	10,2	43	1	0	0	X		+++	+	+	+	50	++	++	
22	15	5	11,8	47	1	5	0	X		++	+	+	+	50	++	++	
23	5	5	10,8	36	1	2	0	X		++	+	+	+/+	52	++	++	
24	16	5	9,2	29	1	0	0	X		+	+	+	++	50	++	++	
25	6	6	8,8	21	0	3	0	X	X	+	++	+/+	++	51	++	(+)	
26	18	5	10,0	34	0	0	0	X		+	+/+	+	++	52	++	++	
27	6	6	9,4	22	2	0	0	X		-	+	+	+	50	++	+	
28	19	6	8,0	18	0	0	0	X		+++	++	++++	+	49	++	+	
29	20	5	8,5	26	0	0	0	X		+	+	+/+	+/+	50	++	+	
30	22	5	10,4	50	0	1	0	X		-	-	-	-	50	+	(+)	
31	24	5	9,0	23	1	0	0	X		+/+	+/+	+/+	+/+	49	+	(+)	

■ = zur DNA-Extraktion eingesetzte Kutikulasegmente

■ = Segmente mit Melaninbefall zur DNA-Extraktion eingesetzt

2.1 Symptomatik

In der Versuchsgruppe **10 Sporen/ml** Wasser trat der erste der Infektion erlegene Krebs acht Tage nach der Zoosporenexposition auf. Gliedmaßenverluste konnten neun Tage, Kratzbewegungen bei mehreren der Tiere zehn Tage post infectionem beobachtet werden. Geschwächte Abwehrbewegungen und noch lebende Krebse in Rückenlage, die unfähig waren, sich selbst wieder aufzurichten, zeigten sich im weiteren Verlauf der Infektion. Insgesamt verstarben in dieser Gruppe 16 Edelkrebse an den Folgen der Krebspest, 15 Tiere wurden im Rahmen der alle zwei Tage erfolgten Entnahme euthanasiert. Am 10. Tag nach der Sporenexposition wurde morgens ein über Nacht verendeter Edelkreb (Krebs Nr. 7) entfernt, dessen kaudales Abdomen einschließlich der vier letzten Kutikulasegmente von seinen Artgenossen abgefressen worden war. Somit stand zu seiner Untersuchung nur das kranialste Kutikulasegment zu Verfügung. Es wurde am selben Tag ein gesunder, gesondert markierter Edelkreb (Krebs Nr. 14) zugesetzt, der bereits sechs Tage später der Krebspest erlag. Der letzte aktive Edelkreb, der außer intensiven Putzbewegungen keine deutlichen krebspest-typischen Symptome zeigte, wurde am 32. Tag post expositionem getötet.

Nach einer Inkubationszeit von fünf Tagen, in denen bei den Edelkrebsen, die mit der Sporendosis 100 bzw. 1000 Sporen/ml infiziert worden waren, keinerlei Auffälligkeiten beobachtet werden konnten, traten die ersten Symptome in Form von Kratzbewegungen, Lethargie, schlaffer Lähmung und vereinzelt Rückenlage auf. Der erste verendete Krebs wurde bei der mit **100 Sporen/ml** infizierten Versuchsgruppe am 6. Tag nach der Zoosporenexposition entfernt, sieben Tage post expositionem traten Gliedmaßenverluste, besonders der Scheren, auf. 24 Tage nach Zugabe der Zoosporen wurde der letzte Edelkreb dieser Versuchsgruppe entfernt. Er war noch sehr aktiv und wurde mit Chloroform getötet. 17 Tiere dieser Gruppe verendeten, 13 wurden euthanasiert.

Die Krebse der Gruppe **1000 Sporen/ml** Wasser zeigten nach sechs Tagen deutliche Symptome der Krebspest. Am 8. Tag post expositionem verendete das erste Tier aufgrund der Infektion. Bereits am zweiten Tag musste ein Krebs entfernt werden, der seine Häutung nicht überlebte (Krebs Nr. 1). Da diese erst kurz vorher stattgefunden haben musste (Krebs war weder autolytisch noch von Artgenossen angefressen), wurden die Kutikulasegmente der Exuvie zur DNA-Extraktion eingesetzt. Am selben Tag wurde dieser nicht-infektionsbedingte

Verlust mit einem gesunden Edelkrebs nachbesetzt, der am Rücken mit einem roten Fleck markiert wurde. Dieser zeigte 10 Tage später deutliche Symptome und wurde daraufhin euthanasiert, da er seiner Schwäche nach zu urteilen sicher über Nacht verendet wäre (Krebs Nr. 19). Zusätzlich wurde am selben Tag planmäßig ein agiler, symptomloser Edelkrebs getötet. Insgesamt verendeten 18 Krebse an den Folgen der Infektion, 13 Tiere unterlagen der zweitägigen Tötung, im Rahmen derer der letzte Krebs 24 Tage post expositionem entfernt wurde.

Abbildung 37 zeigt das typische klinische Bild der Krebspest: einige mit 1000 Sporen/ml Wasser infizierten Edelkrebse weisen nach zwei Wochen Verluste der Scheren und Schreitfüße auf, befinden sich in Rückenlage und sind unfähig, sich selbständig wieder aufzurichten.

Innerhalb der **Kontrollgruppe** (keine Zoosporenexposition bei gleicher Hälterung) kam es während des gesamten Verlaufs der Versuche zu keinerlei Verlusten. Die Krebse wurden noch vier Monate nach Beendigung der Versuche von anderen Tieren getrennt gehältert und blieben auch währenddessen unauffällig. Schließlich wurden sie tiergerecht wieder in eine große Kunststofftonne mit Versteckmöglichkeiten und Wasserdurchlauf umgesetzt.

2.2 Lichtmikroskopische Untersuchungen der Abdominalkutikula

Die Segmente der weichen Abdominalkutikula (Nummerierung von cranial nach caudal) von insgesamt 92 infizierten Edelkrebsen wurden vor Einsatz in der DNA-Extraktion nativ lichtmikroskopisch auf Hyphenbefall (Abbildung 38) mit *Aphanomyces astaci* untersucht. Die **Befallsstärke** jedes einzelnen Kutikulasegmentes wurde nach den von KLÄRDING (2001) beschriebenen Kriterien festgehalten. „++++“ entspricht dabei einem Befall von > 10 % pro Flächenanteil, „+++“ einem Befall von 6-10 %, „++“ von 2-6 % und „+“ von < 2 %. Mit „-“ wurden nur Kutikulastücke beurteilt, die ganz sicher frei von sichtbarem Befall waren. „+/-“ beschreibt Segmente ohne erkennbaren Hyphenbefall aber mit vielfach punktförmigen Melanisierungen (Abbildung 39) und solche, bei denen Strukturen zu erkennen waren, die die sog. „penetration pegs“ (Keimschläuche) darstellen könnten. Letztere sind in Abbildung 40 zusammen mit auskeimenden Zoosporen zu sehen. Insgesamt konnte bei 27 der 92 infizierten Krebse Melanisierungen beobachtet werden (Abbildungen 39 bis 44).



Abbildung 37: An Krebspest erkrankte, noch lebende und in Rückenlage befindliche Edelkrebse mit deutlichen Gliedmaßenverlusten

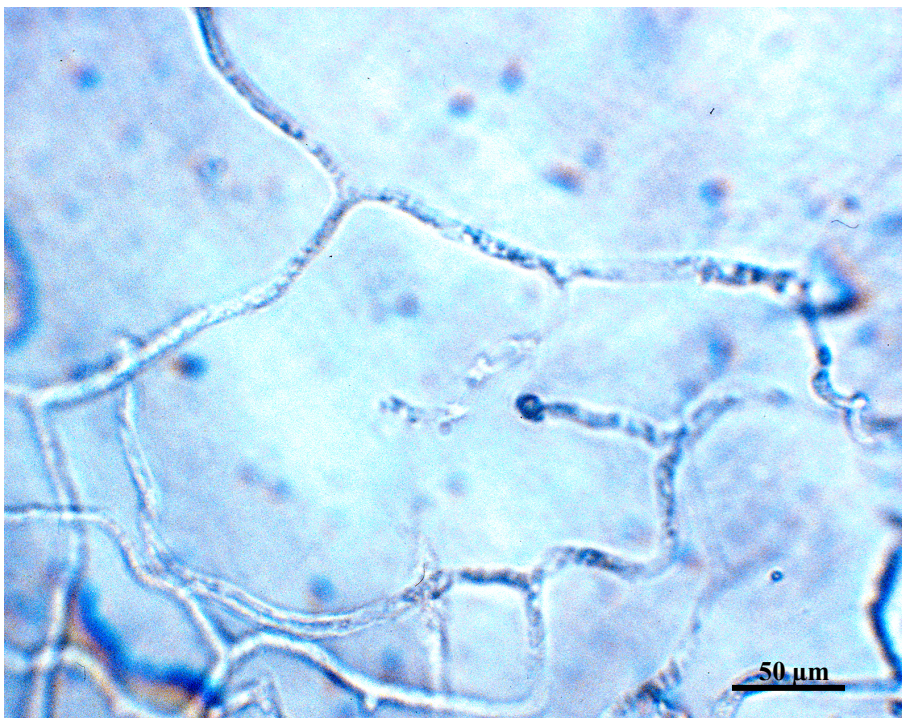


Abbildung 38: Hyphen von *Aphanomyces astaci* in der Abdominalkutikula eines mit Krebspest infizierten Edelkrebses, Nativpräparat (mit Blaufilter)

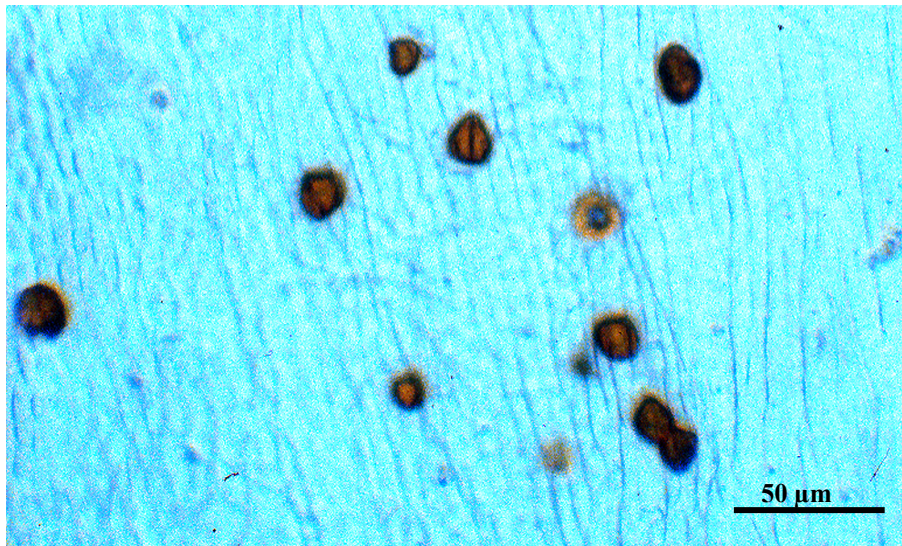


Abbildung 39: Punktförmige Melanisierungen in der Abdominalkutikula eines Edelkrebsees 20 Tage post expositionem mit *Aphanomyces astaci*-Zoosporen (10 Sporen/ml), Nativpräparat (mit Blaufilter)

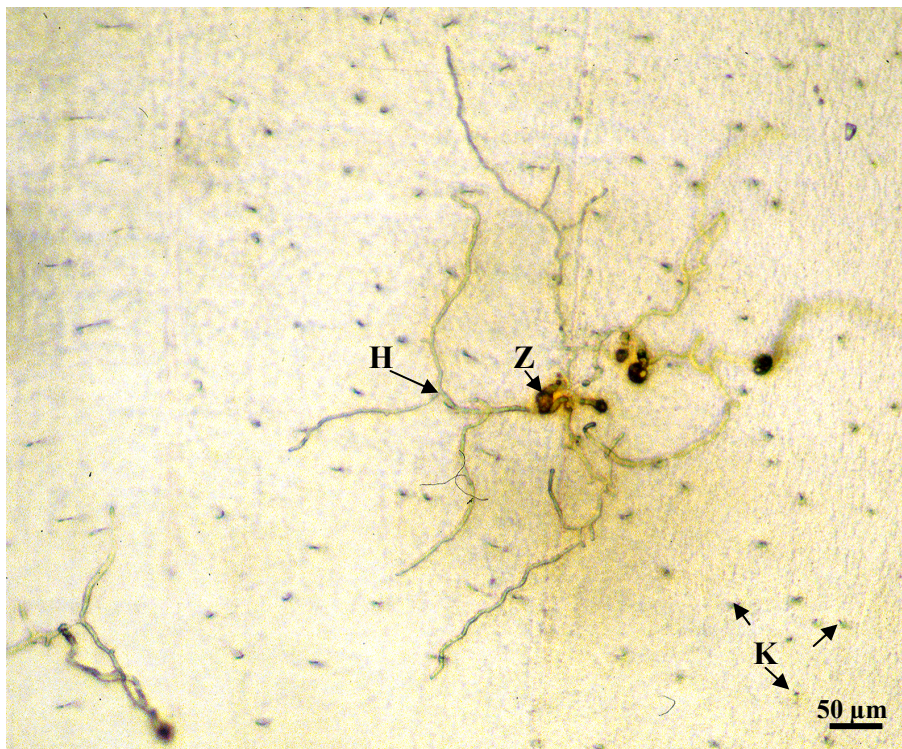


Abbildung 40: Enzystierte Zoosporen (Z) mit die Kutikula durchdringenden Hyphen (H) und Keimschläuchen (K) in der Abdominalkutikula eines Edelkrebsees, Nativpräparat

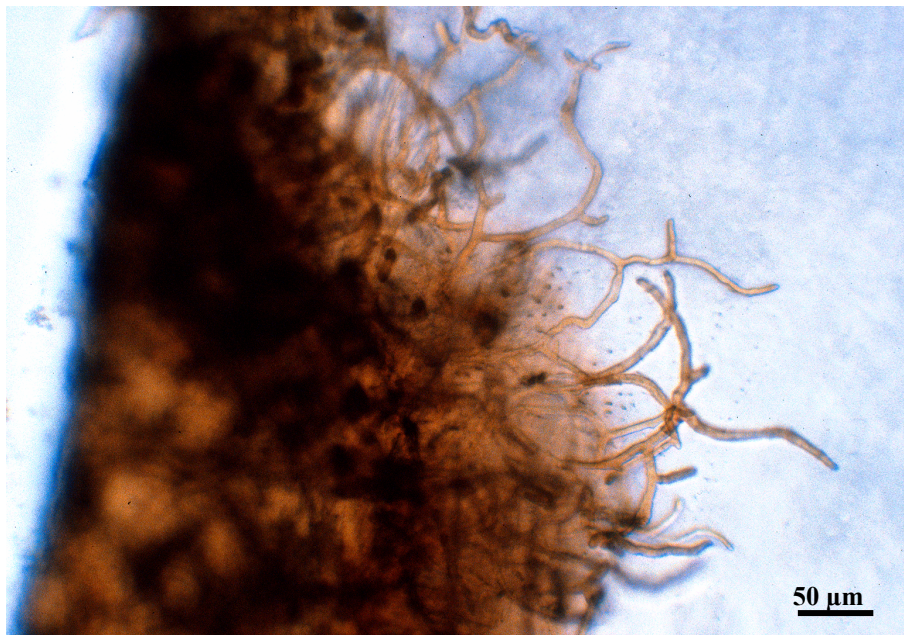


Abbildung 41: Hochgradig melanisiertes *Aphanomyces astaci*-Hyphengeflecht in der Abdominalkutikula eines Edelkrebse, Nativpräparat (mit Blaufilter)

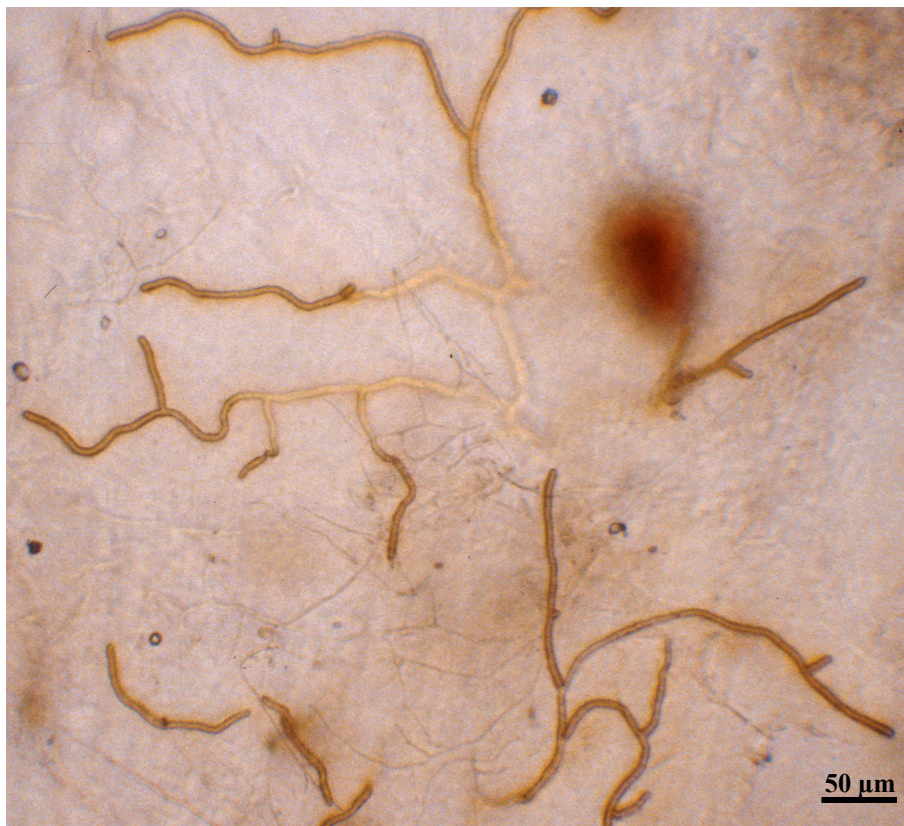


Abbildung 42: Dreidimensionales Wachstum von *Aphanomyces astaci*-Hyphen in der Abdominalkutikula eines Edelkrebse mit deutlicher Melanisierung der Hyphen, Nativpräparat

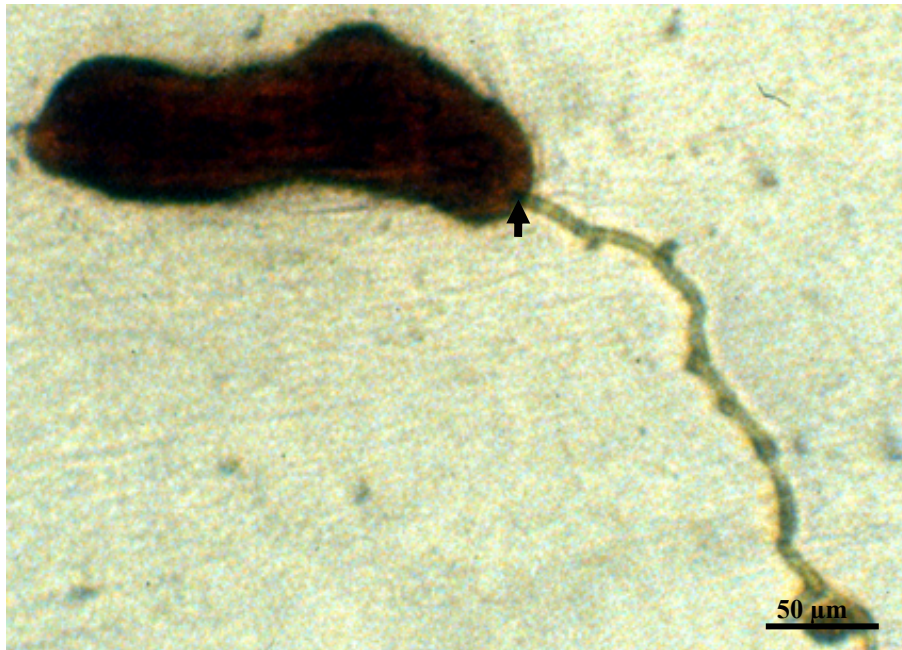


Abbildung 43: Durch Melanin gehemmtes Hyphenwachstum (►), Nativpräparat

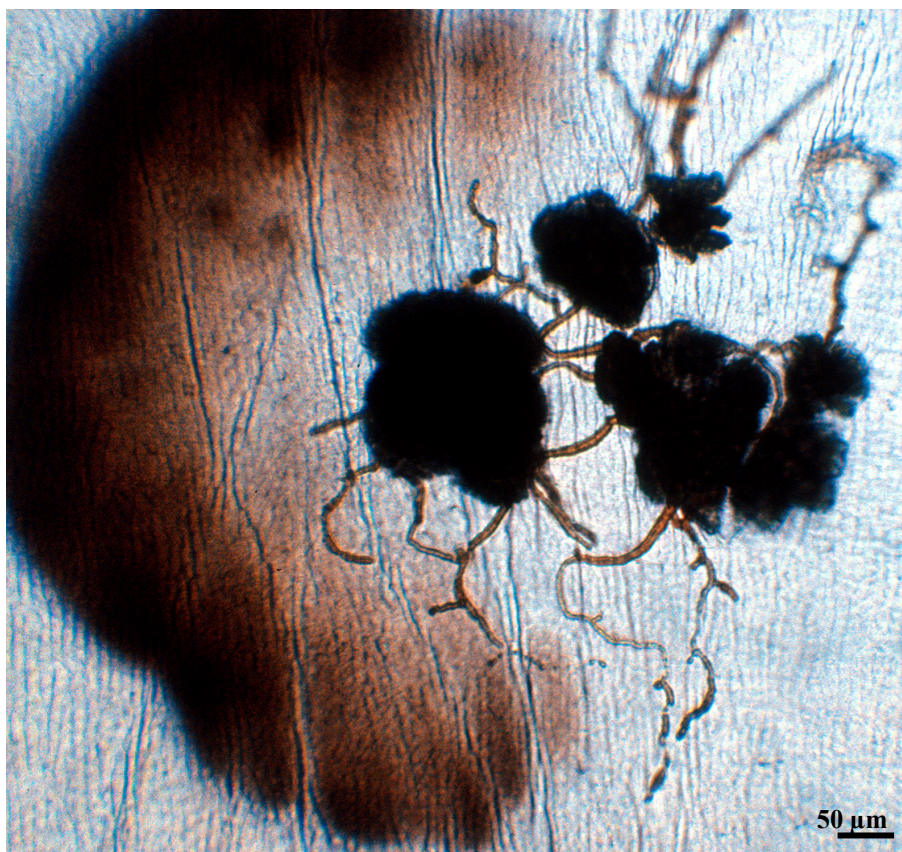


Abbildung 44: Melanisierte *Aphanomyces astaci*-Hyphen in der Abdominalkutikula eines Edelkrebses, Wachstum ausgehend von schwarz-braunen, feinverästelten Strukturen, Nativpräparat (mit Blaufilter)

Abbildung 45 zeigt die prozentuale Verteilung dieser Befallsstärken (+/- bis +++) aller untersuchten Kutikulasegmente (n = 92) in den drei Infektionsversuchen im Vergleich. Bei den Kutikulasegmenten, die aus dem Versuch mit der Exposition **10 Sporen/ml** Wasser stammen, wurde der größte Teil (48,67 %) als negativ beurteilt. Auf die Befallsstärke „+/-“ kommen 24,67 %, auf „+“ 14,67 %, auf „++“ 9,33 % und auf „+++“ 2,67 %. Ein hochgradiger Befall von „++++“ wurde gar nicht beobachtet. Bei **100 Sporen/ml** Wasser wurden 42,57 % der Segmente als „+“ beurteilt, 19,59 % als „-“, 12,84 % als „++“, 12,16 % als „+++“, 6,76 % als „+/-“ und 6,08 % als „++++“. Auch bei der Infektion mit **1000 Sporen/ml** Wasser sind die meisten Kutikulasegmente als „+“ (39,47 %) beurteilt worden, 30,26 % als „-“, 14,47 % als „++“, 9,21 % als „+/-“ und je 3,29 % als „+++“ und „++++“.

Dabei fällt auf, dass bei der Zoosporenexposition von 100/ml tendenziell ein stärkerer Befall als bei 1000 Sporen/ml auftrat, während bei 10 Sporen/ml die geringste Hyphendichte lichtmikroskopisch festgestellt werden konnte.

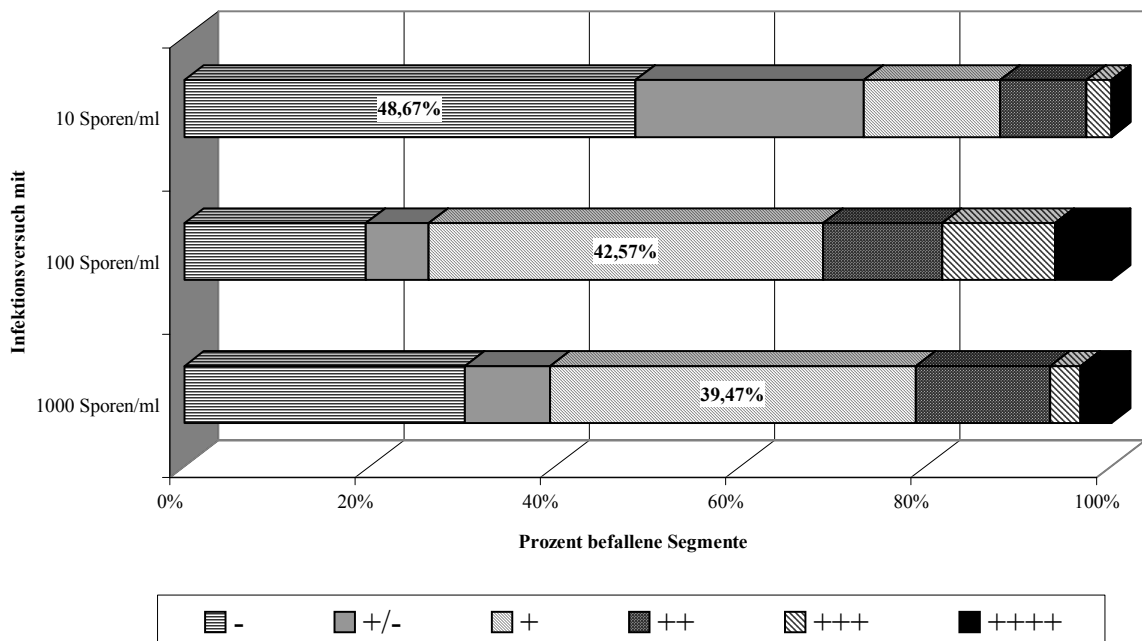


Abbildung 45: Prozentuale Verteilung der Befallsstärken der einzelnen Kutikulasegmente aus den drei Infektionsversuchen

Wie bereits oben für die einzelnen Versuche beschrieben (III.C.2.1), erlagen insgesamt 51 der Edelkrebse der Infektion, die restlichen wurden euthanasiert. Es wurde untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen dem Verlauf der Erkrankung und dem Befall mit Hyphen gibt. Da

fast die Hälfte der Tiere getötet wurde ohne den natürlichen Verlauf der Infektion abzuwarten, kann diese Auswertung etwas fragwürdig sein, da nur die schwächsten Krebse jeder Gruppe, nämlich die, die an den Folgen der Krebspest starben, in diese Statistik miteinbezogen wurden. Dennoch ist ein Unterschied zwischen den drei Sporendosen zu erkennen. Für diese Untersuchung musste ein Mittelwert des Befalls für jeden einzelnen Krebs ermittelt werden. Hierzu wurden, entsprechend dem Mittelwert der von KLÄRDING (2001) für die einzelnen Befallsstärken beschriebenen prozentualen Werten, zur quantitativen Erfassung Kutikula-segmente mit einem Befall von „++++“ als 11 % gezählt, mit einem Befall von „+++“ als 8 %, „++“ als 4 %, „+“ als 1 % und „+/-“-Befall als negativ bewertet und mit 0 % berechnet. Der Mittelwert aus den fünf Kutikulasegmenten eines Krebses ergab die **Gesamtbefallsstärke** (z.B. bei Befall der Segmente mit „+“, „+“, „+“, „+“, „-“ = 4 % + 4 % + 1 % + 1 % + 0 % = 10 % : 5 = 2 % Gesamtbefall, entspricht „+“). Für die jeweilige Befallsstärke wurde der Anteil der verendeten Krebse im Vergleich zu den euthanasierten ermittelt. Abbildung 46 zeigt, dass je stärker der Befall mit Hyphen war, die Tiere dazu neigten, noch vor Entnahme im Rahmen des Versuches zu verenden. Das heißt, dass bei den verendeten Edelkrebsen in der Regel ein höherer Befall lichtmikroskopisch festgestellt werden konnte als bei den mit Chloroform getöteten.

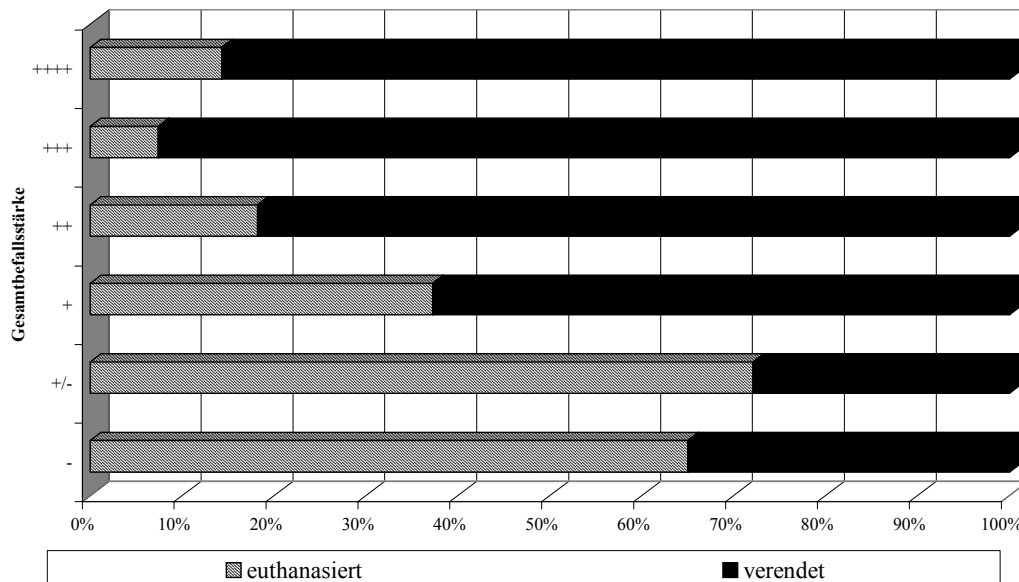


Abbildung 46: Anteil der verendeten Edelkrebsen in Abhängigkeit von der Befallsstärke

Melanisierungen wurden bei der höchsten Sporendosis ab Tag 14 post expositionem beobachtet, bei 10 und 100 Sporen/ml ab Tag 16. Die Anzahl der Beobachtungen bei allen untersuchten Segmenten erhöhte sich gegen Ende der Infektion und trat verstärkt bei der Zoosporenexposition 10/ml auf. Dabei waren vor allem Kutikulasegmente mit einem niedrigeren Befall an Hyphen betroffen (Abbildung 47).

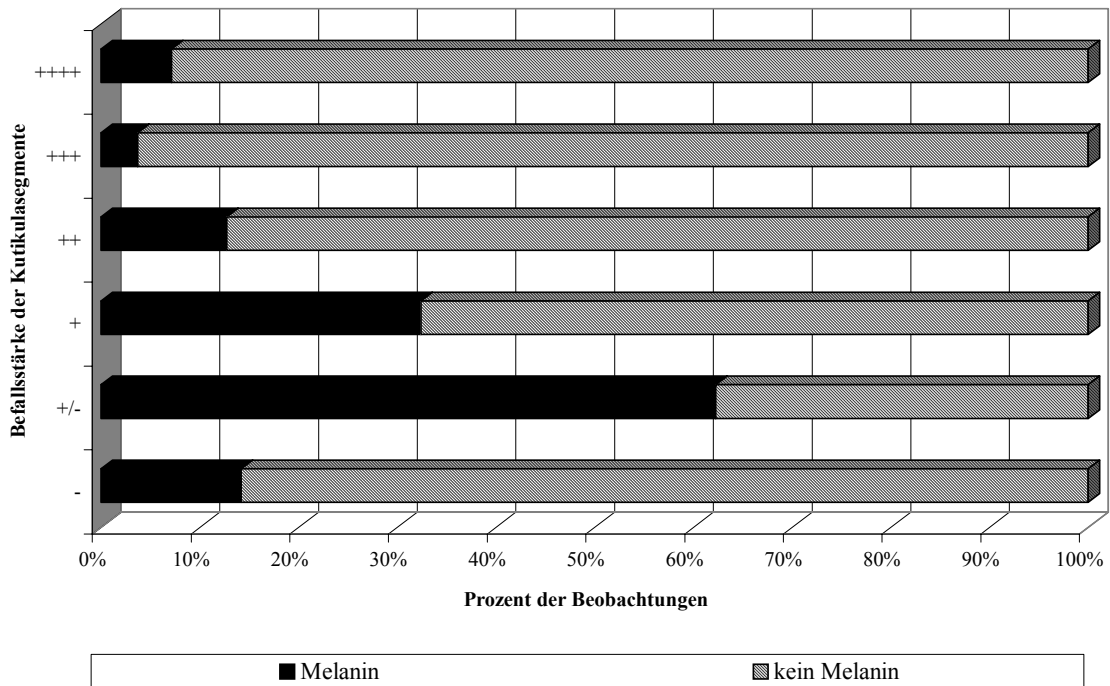


Abbildung 47: Gesamtauswertung des Anteils der mit Melanin befallenen Kutikulasegmente in Abhängigkeit von der Befallsstärke

Nach Beendigung der Infektionsversuche wurden von der nicht infizierten Kontrollgruppe zwei Stichproben entnommen, euthanasiert, lichtmikroskopisch auf Hyphenbefall untersucht und in der Extraktion eingesetzt. Die beiden Kontrollkrebse wiesen keine Krebspestsymptome oder Hyphen in der Kutikula auf.

2.3 Molekularbiologischer Nachweis von *Aphanomyces astaci*

Die Beurteilung der PCR-Ergebnisse erfolgte durch optischen Vergleich mit dem ebenfalls im Agarose-Gel aufgetragenen 100 bp-Molekulargewichtsmarker, dessen Banden à ~20 ng DNA enthalten. Ein PCR-Signal in etwa gleicher Stärke wurde mit „+“, ein schwächeres, aber noch sichtbares mit „(+)\“, eine Bande mit > 20 ng wurde mit „++“ beurteilt und ein negatives Ergebnis mit „-“.

Die erfolgte Bewertung der Banden der Abbildungen 48 bis 49 ist den Tabellen 19 bis 21 zu entnehmen. Die PCR-Ergebnisse für die beiden Edelkrebse der Kontrollgruppe waren negativ und wurden bei der Beschreibung des Agarosegels als „gesunder Krebs“ bezeichnet.

Wie bereits unter III.C.1.7 erwähnt, konnte *Aphanomyces astaci* ab dem ersten Tag der Probennahme (Tag 2 post expositionem) nachgewiesen werden. Die Nested PCR mit den Primern NS 166/NS 681 und BO 640/BO 525 ergab bei allen untersuchten Proben ein Signal. Tendenziell konnte bei höherem Befall des eingesetzten Materials auch eine etwas stärkere Bande beobachtet werden, doch kamen auch stark positive Signale bei lichtmikroskopisch negativem Befund und negative PCR-Ergebnisse mit der Semi-Nested PCR bei erwiesenem Hyphenbefall (bei der 10 Sporen/ml-Infektion Krebs Nr. 24 und 31, bei 100 Sporen/ml bei Krebs Nr. 19 und 30) vor. Bemerkenswert ist, dass die deutlich positiven PCR-Ergebnisse bei lichtmikroskopisch nicht zu erkennendem Hyphenbefall bei der Probennahme zu einem frühen Stadium der Infektion vorkamen, während die negativen PCR-Ergebnisse von Material stammen, das erst zu einem sehr viel späteren Zeitpunkt der Infektion gewonnen wurde.

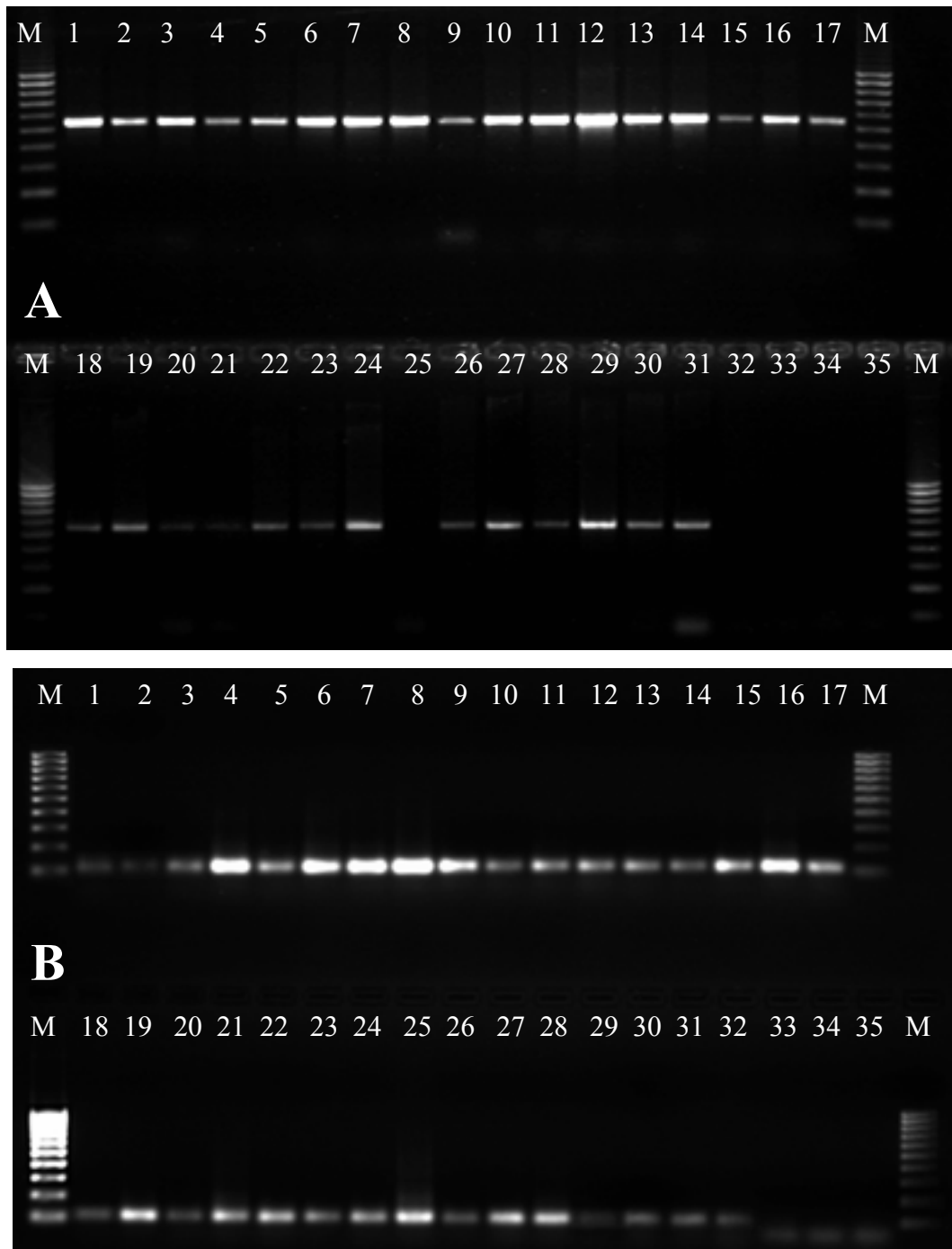


Abbildung 48: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte mit **(A)** Primer NS 170/NS 681 aus der Semi-Nested PCR und mit **(B)** Primer BO 525/BO 640 aus der Nested PCR mit den Proben aus dem Infektionsversuch **10 Sporen/ml Wasser**

M	100 bp-Molekulargewichtsmarker		
1	Positiv-Kontrolle	33	gesunder Krebs
2 bis 32	Krebs Nr. 1 bis 31	34	Negativ-Kontrolle der Extraktion
		35	Negativ-Kontrolle der PCR

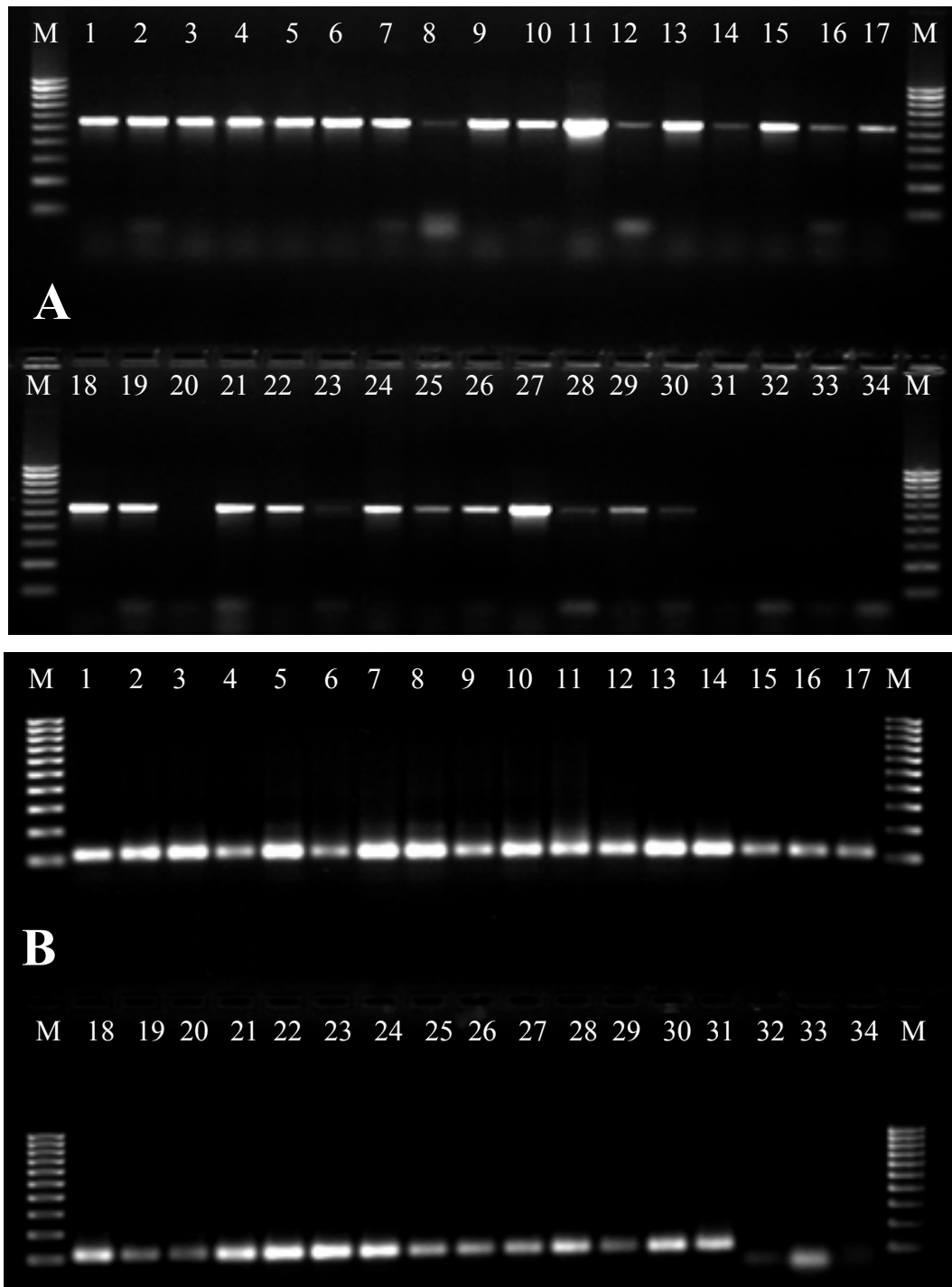


Abbildung 49: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte mit (A) Primer NS 170/NS 681 aus der Semi-Nested PCR und mit (B) Primer BO 525/BO 640 aus der Nested PCR mit den Proben aus dem Infektionsversuch **100 Sporen/ml** Wasser

M	100 bp-Molekulargewichtsmarker		
1	Positiv-Kontrolle	32	gesunder Krebs
2 bis 31	Krebs Nr. 1 bis 30	33	Negativ-Kontrolle der Extraktion
		34	Negativ-Kontrolle der PCR

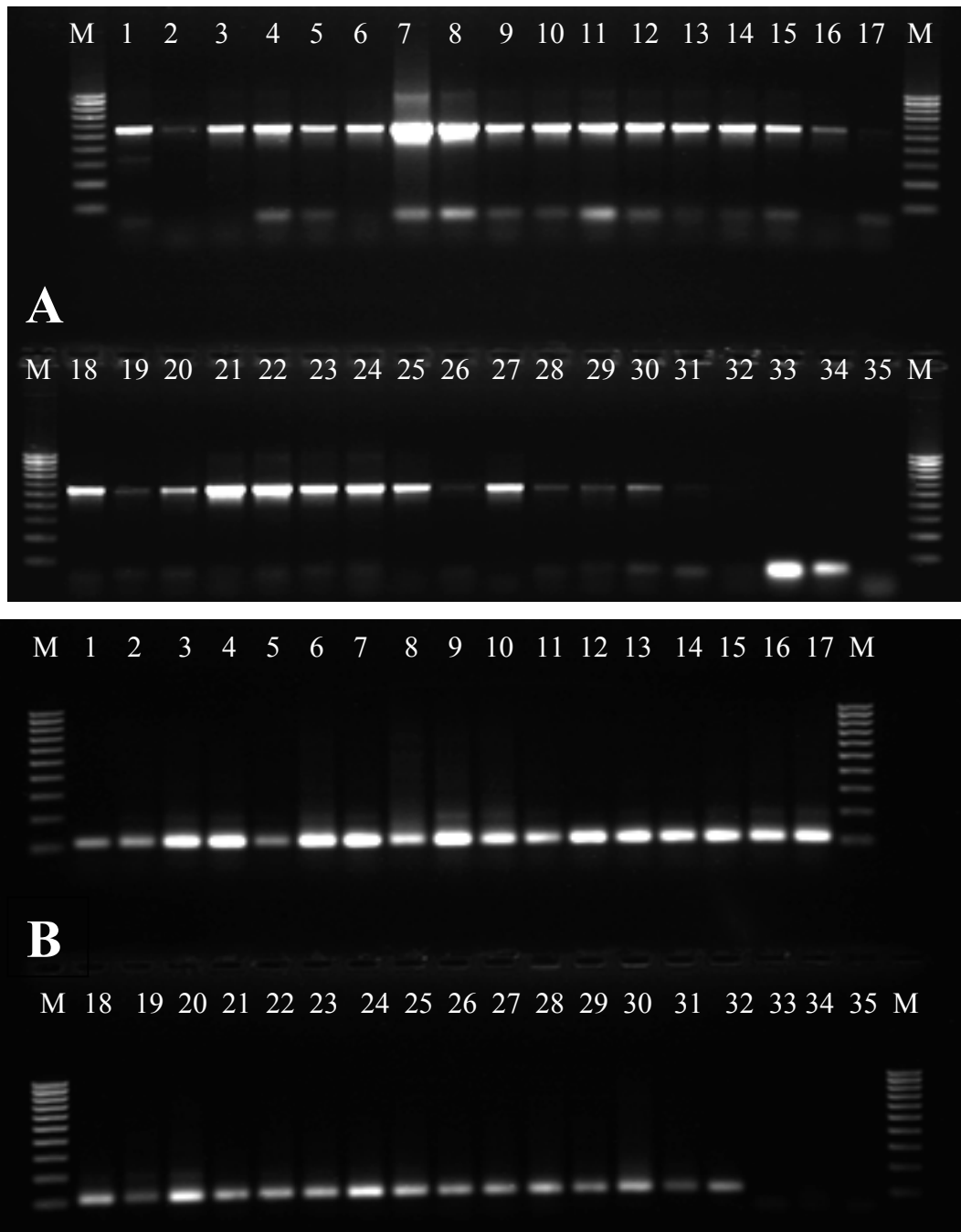


Abbildung 50: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte mit (A) Primer NS 170/NS 681 aus der Semi-Nested PCR und mit (B) Primer BO 525/BO 640 aus der Nested PCR mit den Proben aus dem Infektionsversuch **1000 Sporen/ml** Wasser

M	100 bp-Molekulargewichtsmarker	33	gesunder Krebs
1	Positiv-Kontrolle	34	Negativ-Kontrolle der Extraktion
2 bis 32	Krebs Nr. 1 bis 31	35	Negativ-Kontrolle der PCR

Ergebnisse

Es wurde weiterhin untersucht, ob zum Einen das Vorhandensein von Melanin in der Probe und zum Anderen die Todesart (verendet/euthanasiert) Einfluss auf das Ergebnis der PCRs hat. In der Abbildung 51 ergeben jeweils zwei Balken zusammen 100 % (je in A und B). Es wurde in der Auswertung kein Unterschied gemacht, welche PCR (Semi-Nested/Nested PCR) durchgeführt wurde. Es fällt auf, dass es mehr „++“-PCR-Ergebnisse bei Proben ohne Melanin (Abbildung 51, A) und solchen, bei denen die Krebse verendet sind (Abbildung 51, B), gibt. In der Beschriftung der Balken wurden Werte unter 2 % zur Gewährleistung der Übersicht weggelassen (betrifft „-“PCR-Ergebnisse).

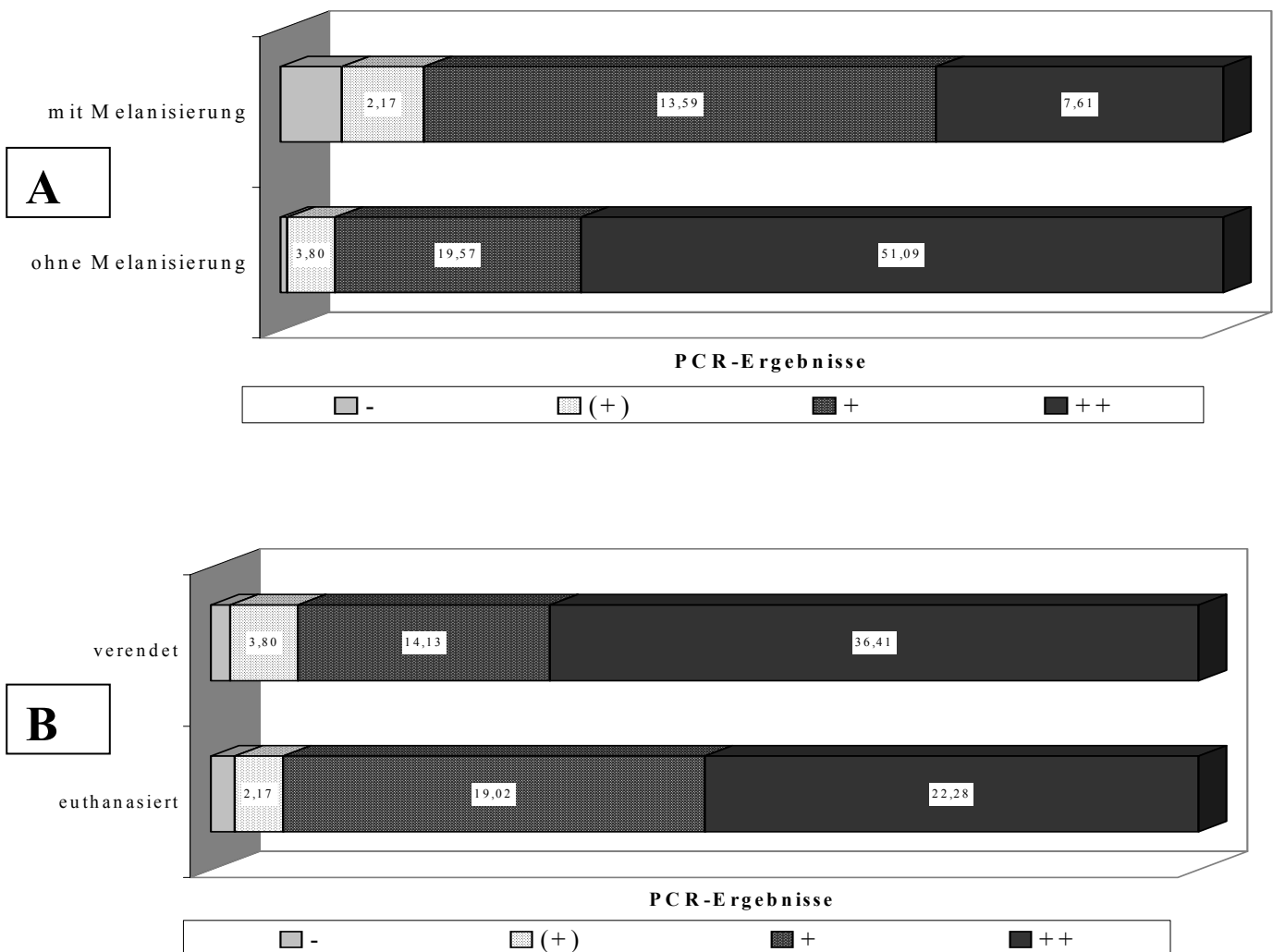


Abbildung 51: Stärke des PCR-Ergebnisses in Abhängigkeit von (A) Melaninbefall und (B) Todesart (Angaben in % der Beobachtungen)

Ergebnisse

Abbildung 52 gibt abschließend eine Zusammenfassung über die Verteilung der einzelnen PCR-Ergebnisse mit der Semi-Nested PCR und der Nested PCR in den drei Infektionsversuchen. Man kann zum Einen erkennen, dass mit höherer Zoosporenexposition auch das PCR-Ergebnis „++“ häufiger wird, und zwar bei beiden verschachtelten PCR. Zum Anderen ergab die Nested PCR mit NS 166/NS 681 als äußerem und BO 525/BO 640 als innerem Primerpaar verhältnismäßig mehr stark positive Signale als die Semi-Nested PCR. Negative Beurteilungen gab es nur bei der PCR mit NS 166/NS 681 und NS 170/NS 681 bei Proben aus den Versuchen mit 10 und 100 Sporen/ml Wasser.

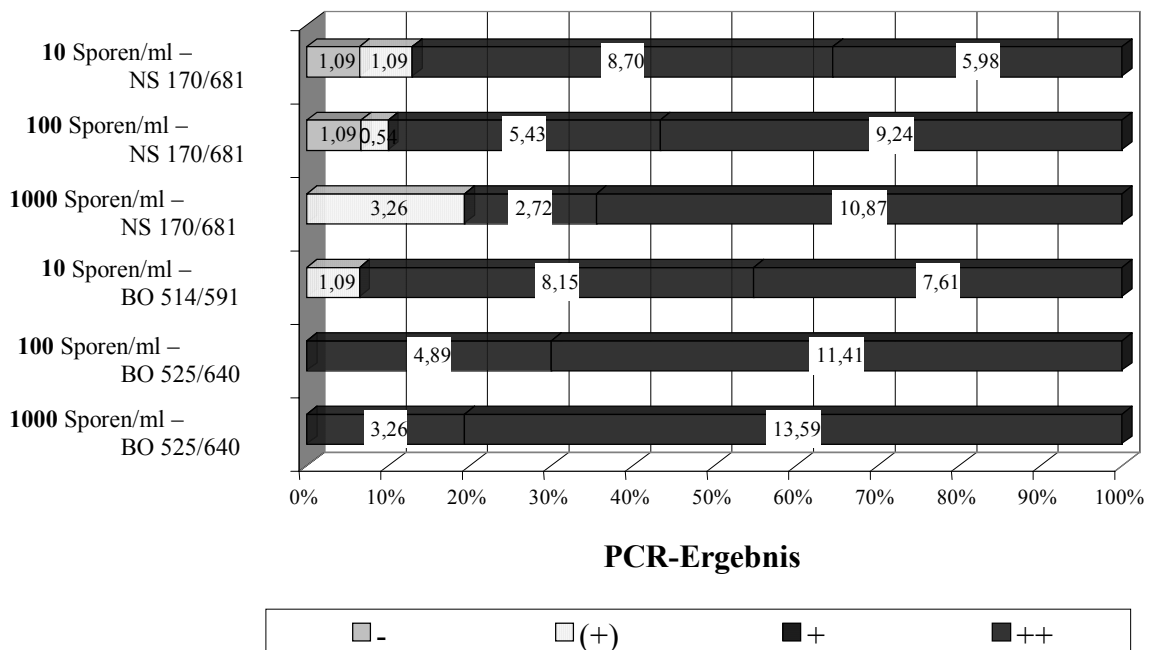


Abbildung 52: Prozentuale Verteilung der PCR-Ergebnisse bei der Semi-Nested PCR (NS 170/NS 681 als inneres Primerpaar) und der Nested PCR PCR (BO 525/ BO 640 als inneres Primerpaar) in den drei Versuchen mit unterschiedlicher Sporendosis (10, 100 und 1000 Sporen/ml)

3. Anwendung der Methode an diagnostischen Proben

Während des Zeitraumes der Anfertigung dieser Dissertation wurden 19 verendete Krebse mit Verdacht auf Krebspest zur Abklärung der Todesursache in das Institut für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten der LMU München eingeschickt. Diese wurden nach der schon zuvor beschriebenen Methode (III.B.3) seziiert, ihre Kutikula lichtmikroskopisch untersucht und die DNA von einzelnen Kutikulasegmenten mit dem DNeasy[®] Tissue Kit (Qiagen) isoliert. Die lichtmikroskopischen Beobachtungen in Bezug auf Hyphenbefall wurden mit dem Ergebnis der zuvor entwickelten und optimierten molekularbiologischen Methode verglichen. Damit sollte gezeigt werden, dass die hier entwickelte Methode zum spezifischen Nachweis von *Aphanomyces astaci* geeignet ist. Tabelle 22 gibt eine Aufstellung über die zur Untersuchung gelangten Krebse, ihre Herkunft, lichtmikroskopische Beobachtungen und PCR-/RFLP-Ergebnisse.

Tabelle 22: Untersuchte Proben des Instituts für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten (LMU München) unter Angabe ihrer Herkunft und der Ergebnisse der lichtmikroskopischen und molekularbiologischen Untersuchung. Tiere, die aus demselben Krankheitsausbruch stammten, wurden innerhalb derselben Tagebuchnummer durchnummeriert.

DK: Dohlenkrebs; **EK:** Edelkrebs; **KK:** Kamberkrebs; **SK:** Signalkrebs

+: PCR mit Bande in erwarteter Produktgröße, RFLP bestätigte Krebspest

+ (**RFLP ?**): PCR „+“, untypisches RFLP-Muster (extra Bande bei >200 bp)

-: kein PCR-Signal (Verdauung konnte nicht durchgeführt werden)

Tagebuch-Nr. des Krebses:	Krebs-Art:	Herkunft:	Lichtmikroskopisch beobachtete Befallsstärke:	Semi-Nested PCR mit NS 166/NS 681 und NS 170/NS 681	Nested PCR mit NS 166/NS 681 und BO 525/BO 640
1135/99	EK	Bayern, Deutschland	+/-	-	+
2093/99-1	EK	Bayern, Deutschland	+	-	+
2093/99-2	EK	Bayern, Deutschland	++	+	+

Ergebnisse

2093/99-3	EK	Bayern, Deutschland	++	+	+
1543/00-1	DK	River Sheep, England	++	-	+
1543/00-2	DK	River Sheep, England	+	-	+
2886/00	EK	Baden- Württemberg, Deutschland	+	-	+
2935/00	SK	Schweden	+/-	-	+
3040/00-1	EK	Kontaktversuch mit inf. SK aus Österreich	+/-	-	+
3040/00-2	EK	Kontaktversuch mit inf. SK aus Österreich	+	-	+
3040/00-3	EK	Kontaktversuch mit inf. SK aus Österreich	+++	+ (RFLP ?)	+
3257/00	SK	Schweden	++	-	+
3614/00	EK	Kontaktversuch mit inf. SK	+	-	+
3732/00	EK	Kontaktversuch mit inf. SK	+	-	+
311/01	EK	Kontaktversuch mit inf. KK	+/-	-	-
177/02-1	EK	Kontaktversuch mit inf. KK (177/02-2)	+++	+ (RFLP ?)	+
177/02-2	KK	Schweiz	-	-	+
178/02-1	EK	Bayern, Deutschland	-	-	-
178/02-2	KK	Bayern, Deutschland	-	-	-

Die Eluate aller Proben wurden zunächst in die verschachtelten PCRs eingesetzt. Bei Auftreten einer Bande wurde das PCR-Produkt ohne weitere Aufreinigung mit dem entsprechenden Restriktionsenzym (*Hinf I* bzw. *Hph I*) verdaut.

Bei den Proben 2093/99-2, 2093/99-3, 3040/00-3 und 177/02-1 konnten nach der **Semi-Nested PCR** mit den Primerkombinationen NS 166/NS 681 und NS 170/NS 681 Banden im erwarteten Größenbereich von 550 bp beobachtet werden. In der folgenden Verdauung mit dem Enzym *Hinf I* ergaben die beiden Proben 2093/99-2 und 2093/99-3 das *Aphanomyces astaci*-typische Muster (99 bp, 113 bp, 149 bp und 189 bp), 3040/00-3 und 177/02-1 dagegen

ein nur ähnliches Muster mit einer zusätzlichen Bande bei > 200 bp (Abbildung 53). Alle anderen der insgesamt 19 untersuchten Proben waren bereits nach der PCR negativ, so dass keine Restriktionsenzymanalyse durchgeführt werden konnte. Somit konnte mit der entwickelten Semi-Nested PCR nur bei den höhergradig infizierten Individuen (++) des Krankheitsausbruches 2093/99 der Krebspestverdacht bestätigt werden.

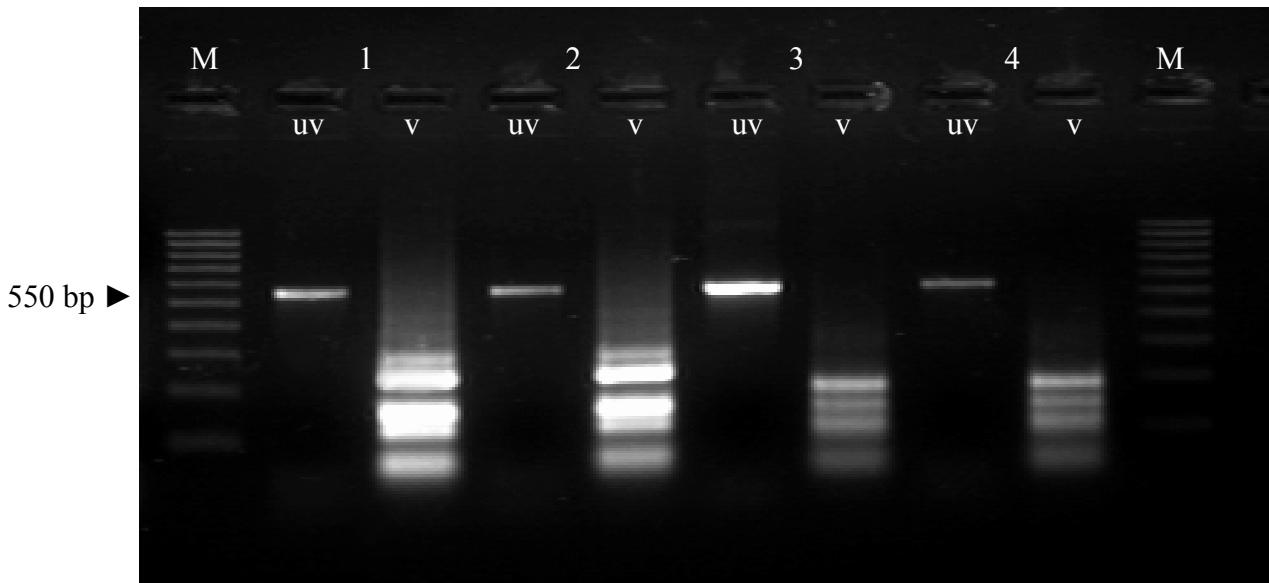


Abbildung 53: *Hinf I*-Restriktionsenzymverdauung der positiven PCR-Ergebnisse in der Semi-Nested PCR (NS 166/NS 681 und NS 170/NS 681)

M	100 bp-Molekulargewichtsmarker			
uv	unverdautes PCR-Produkt			
v	mit <i>Hinf I</i> verdautes PCR-Produkt			
<u>Probe:</u>				
1	3040/00-3	3	2093/99-3	
2	177/02-1	4	2093/99-2	

16 der 19 untersuchten Proben zeigten mit den Primern NS166/NS 681 und BO 525/BO 640 nach der **Nested PCR** Produkte bei 115 bp, die anschließend mit *Hph I* zu Fragmenten der Größe 60 bp und 55 bp gespalten wurden (Abbildung 54). Damit galt bei diesen Krebsen die Diagnose Krebspest als bestätigt. 311/01, 178/02-1 und 178/02-2 waren *Aphanomyces astaci*-negativ, wobei die beiden letzteren Proben als „gesunde Krebse“ in das Institut für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten eingeliefert worden waren und bei ihnen, im

Gegensatz zu den anderen untersuchten Individuen, kein klinischer Krebspestverdacht bestand.

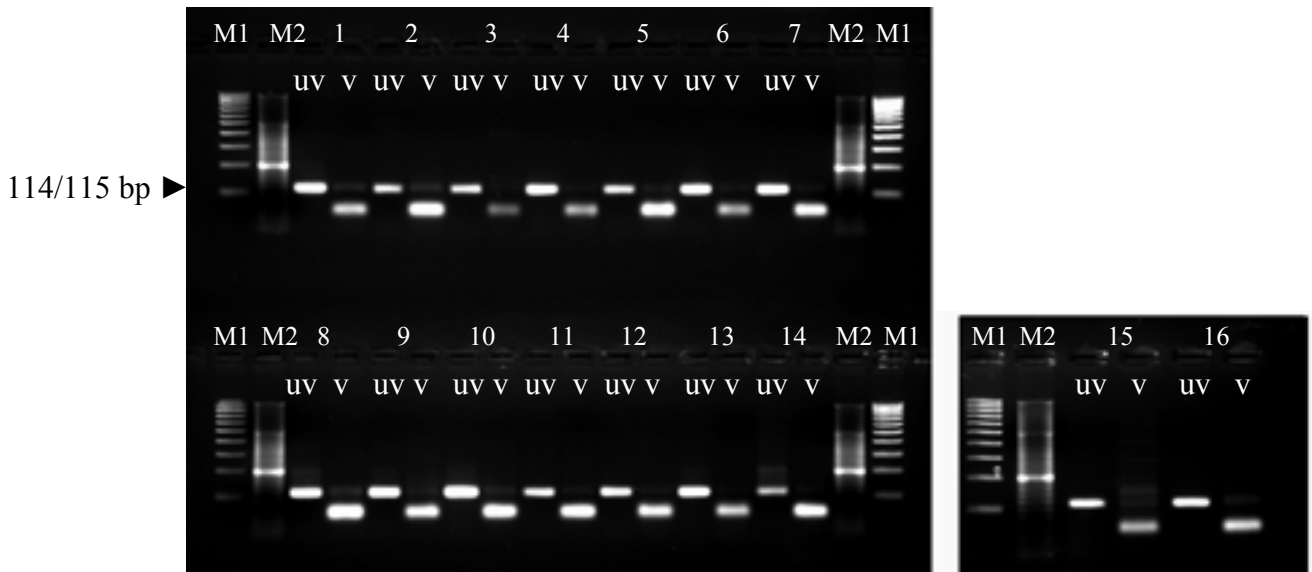


Abbildung 54: *Hph I*-Restriktionsenzymverdauung der positiven PCR-Ergebnisse in der Nested PCR (NS 166/NS 681 und BO 525/BO 640)

M1	100 bp-Molekulargewichtsmarker		
M2	20 bp-Molekulargewichtsmarker		
uv	unverdautes PCR-Produkt		
v	mit <i>Hph I</i> verdautes PCR-Produkt		
<u>Probe:</u>			
1	1135/99	9	3040/00-1
2	2093/99-3	10	3040/00-2
3	2093/99-2	11	3257/00
4	2093/99-1	12	3614/00
5	1543/-1	13	3732/00
6	1543/00-2	14	177/02-2
7	1886/00	15	3040/00-3
8	2935/00	16	177/02-1

Bei allen untersuchten Proben (Ausnahmen: 178/02-1 und 178/02-2) bestand aufgrund des Vorberichtes (meist aus Beständen mit sehr hoher Mortalitätsrate, bei einigen Individuen Verlust einer Schere) Krebspestverdacht. Tabelle 23 zeigt abschließend die Nachweis-häufigkeit von *Aphanomyces astaci* in den beiden entwickelten PCR-Verfahren im Vergleich zur lichtmikroskopischen Detektion von Hyphen. Dabei wurden die PCRs nur dann als positiv

Ergebnisse

beurteilt, wenn das Ergebnis durch typische RFLP-Muster verifiziert werden konnte. Die Auswertung der Proben 3040/00-3 und 177/02-1 mit den Primern NS 166/NS 681 und NS 170/NS 681 ist nicht in der Tabelle 21 erfasst. Die Semi-Nested PCR-Ergebnisse waren zwar positiv, was für eine *Aphanomyces*-Art spricht, und der Restriktionsenzymverdauung ergab ein von *Aphanomyces astaci* differierendes Muster, doch war es diesem bis auf die Bande > 200 bp so ähnlich, dass eine Koinfektion des Krebspesterregers und eines anderen nah verwandten Pilzes, die ein gemeinsames RFLP-Muster hervorbringen könnten, nicht ausgeschlossen werden konnte.

Tabelle 21: Auswertung der molekularbiologischen Ergebnisse (PCR mit anschließendem Restriktionsenzymverdauung) im Vergleich zu den nativ lichtmikroskopischen Beobachtungen bei den 19 untersuchten klinischen Proben

Hyphenbefall lichtmikroskopisch sichtbar	Semi-Nested PCR		Nested PCR	
	positiv	negativ	positiv	negativ
ja	2	8	12	0
zweifelhaft	0	4	3	1
nein	0	3	1	2

IV. Diskussion und abschließende Betrachtung

Seit dem 19. Jahrhundert bis heute verursacht der Krebspesterreger *Aphanomyces astaci* große wirtschaftliche Verluste in der Aquakultur und bedroht das Überleben vieler in der Natur vorkommender europäischer, australischer und ostasiatischer Süßwasserkrebse. Seine zuverlässige Diagnose spielt eine grundlegende Rolle in der Bekämpfung und Prävention von Krebspestausbüchen.

Weltweit finden Bemühungen statt, Tierseuchen zu erkennen und durch regelmäßige Kontrollen anhand vorgeschriebener Diagnoseverfahren zu bekämpfen. Das Internationale Tierseuchenamt (Office International des Epizooties, O.I.E., Gründungsjahr 1924, Sitz: Paris) beschreibt in seinem „Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases“ (2001) Standardmethoden zur weltweiten Diagnostik von Krankheiten aquatischer Tiere, die die Bedingungen des „International Aquatic Health Code“ erfüllen und dazu dienen, den Gesundheitsstatus dieser Tiere zu überwachen, bevor sie in den internationalen Handel gelangen. So ist auch die Krebspest als wichtige Erkrankung der Crustaceen im „O.I.E. Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases“ erfasst. Zur Identifizierung von *Aphanomyces astaci* ist derzeit die Anzucht und Erkennung allgemeiner morphologischer Kriterien in Zusammenhang mit der hohen Mortalität im Infektionsversuch vorgeschrieben. Diese Methode ist jedoch relativ langwierig, erfordert Tierversuche zur Bestätigung und erlaubt keine schnelle Diagnose direkt aus infiziertem Gewebe.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, ein sicheres und schnelles Verfahren zum Nachweis von *Aphanomyces astaci* direkt aus infiziertem Wirtsgewebe zu entwickeln, das es möglich macht, eine große Anzahl an Proben in kurzer Zeit zuverlässig zu überprüfen.

1. Entwicklung eines molekularbiologischen Nachweisverfahrens für die Krebspest

Als Diagnosemethode wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) gewählt, da sie in der Regel sehr sensitiv und spezifisch ist, geringe Anforderungen an das Probenmaterial stellt (DNA ist sehr stabil), auch bereits abgetötete und nicht (mehr) kultivierbare Pathogene erkennt und mit verhältnismäßig wenig Material und Zeitaufwand durchführbar ist. Sie wurde bereits zur Erkennung anderer Oomycota und Pilze erfolgreich eingesetzt (SANDHU et al.

1995, EINSELE et al. 1997, TOOLEY et al. 1997, GRIFFITH und SHAW 1998, GOLBANG et al. 1999, SCHUBERT et al. 1999).

Auch die O.I.E. (2001) erkennt bei meldepflichtigen Krankheiten der Krebse eine DNA-basierende Diagnostik an. So wird neben den traditionellen Nachweismethoden bei dem „Taura Syndrome“ (TSV) und der „Yellowhead Disease“ (YHV) unter anderem die RT-PCR, und bei der „White Spot Disease“ (WSSV) die Nested Polymerasekettenreaktion zum Standardnachweis beschrieben.

1.1 Wahl einer geeigneten Extraktionsmethode

Die für die PCR vorbereitende Aufbereitung der Proben ist ein wesentlicher Arbeitsschritt, da die *Taq*-Polymerase nur unter bestimmten Milieubedingungen (z.B. pH, Mg^{2+}) effektiv arbeitet. Aus diesem Grund muss bei der DNA-Extraktion darauf geachtet werden, dass Substanzen, die die PCR hemmen könnten, zuvor entfernt oder inaktiviert werden.

Zur DNA-Isolierung eignet sich sowohl frisches als auch in 70 %igem Ethanol fixiertes Probenmaterial. Formalin ist dagegen als Aufbewahrungsmedium ungeeignet und führt nach mehreren Tagen zu einer Degradierung der Qualität der Template-DNA (BARTON ROGERS et al. 1990). Dies trifft auch auf die in der vorliegenden Arbeit verwendete, nicht kalzifizierte Kutikula der Krebse zu (OIDTMANN, persönliche Mitteilung).

Die Abdominalkutikula wurde als Ausgangsmaterial für die hier entwickelte Methode gewählt, da sie zum einen durch die von SCHMID (1998) beschriebene Sektionsmethode problemlos von Muskulatur befreit und somit ein Befall mit Hyphen im Lichtmikroskop überprüft werden kann. Zum anderen ist die Kutikula relativ zellarm, so dass nach der Isolierung der DNA, die aus Wirts-DNA und Pilz-DNA besteht, das Verhältnis von Erreger- und Krebs-DNA nicht zu stark zugunsten des Wirtes verschoben ist, was die Detektion des Pathogens mittels PCR erleichtert.

Zu Beginn dieser Arbeit wurde die Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (modifiziert nach PÄÄBO 1990) durchgeführt. Diese Methode ist effektiv aber auch aufwendig und erfordert das Handling mit gesundheitsgefährdenden Stoffen. Mit dem Ziel, den Umgang mit toxischen und gesundheitsschädlichen Reagenzien zu reduzieren und Zeit zu sparen, wurde dann im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit auf Fertigmixtur zur Isolierung von DNA umgestiegen und dabei verschiedene Methoden miteinander verglichen. Eine

geeignete Methode zur Präparation von DNA sollte zelluläre DNAsen rasch inaktivieren, eine unspezifische Fragmentierung der DNA durch mechanische Scherkräfte (z.B. durch Pipettieren mit zu engen Pipettenspitzen) weitmöglichst vermeiden und Lipide, Polysaccharide und Proteine vollständig entfernen.

Es wurden zwei kommerzielle Fertigungskits (DNeasy[®] Tissue Kit von Qiagen, E.Z.N.A.[®] Invertebrate DNA Kit von Peqlab) verglichen. Beide eigneten sich zur Isolation von DNA aus infiziertem Krebsgewebe.

Vielfach wurden DNA-Isolationsmethoden bei Pilzen und Flechten beschrieben, die sich in der Methode zum Aufbrechen der Zellwände (MIN et al. 1994), deren Lyse, der Aufreinigungsschritte zur Entfernung der Proteine und der Art der DNA-Präzipitation unterscheiden (GARBER und YODER 1983, CUMMINGS und WOOD 1989, BAINBRIDGE et al. 1990, GOODWIN und LEE 1993, ZHU et al. 1993, BORGIA et al. 1994, LECCELLIER und SILAR 1994, PORTEOUS et al. 1994, ZHANG et al. 1996, LÖFFLER et al. 1997, MARTIN und WINKA 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde das Pilzmyzel in einem sterilen Mörser mit flüssigem Stickstoff gefroren und mit einem Pistill zu einem feinen Pulver zermörsert, um die Zellwände aufzubrechen (LEE et al. 1988, LEE und TAYLOR 1990, MÖLLER et al. 1992, ROZMAN und KOMEL 1994).

Diese Methode erwies sich als sehr effektiv und wird trotz des höheren Zeit- und Arbeitsaufwandes (Sterilisation der Gefäße nach jeder Benutzung) empfohlen. Dabei entstehen Aerosole, die von dem Arbeitspersonal eingeatmet werden können (LECCELLIER und SILAR 1994, ROSS 1995), die aber in diesem Fall von untergeordneter Bedeutung sind, da *Aphanomyces astaci* nicht humanpathogen ist.

Bei den Isolationskits wurde überprüft, ob eine Erhöhung der vom Hersteller empfohlenen Proteinase K-Konzentration eine höhere Ausbeute an DNA erzielen kann. Bereits CUMMINGS und WOOD (1989) hatten die Konzentration an eingesetzter Proteinase K variiert und dabei herausgefunden, dass nur bei hoher Konzentration diese Enzyms die spätere Restriktionsverdauung vollständig war, da sonst nicht entfernte DNA-assoziierte Proteine diese hemmen. Eine Homogenisation der Sporen durch Zermahlen mit flüssigem Stickstoff beeinflusste in ihren Versuchen die Reinheit der DNA und somit das Ergebnis der Hydrolyse nicht, doch war die Ausbeute an DNA höher, was ebenfalls für die in der vorliegenden Arbeit angewandte Methode spricht.

Wie in III.C.1.1 beschrieben, konnte besonders bei dem E.Z.N.A.[®] Invertebrate DNA Kit (Peqlab) eine erhöhte Enzymmenge eine größere Verdünnung (1:100, 1:1000) des Eluats in der PCR sichtbar machen, was einer geringeren Befallsstärke der Kutikula mit niedrigerer DNA-Ausbeute gleichzusetzen wäre.

Bei dem DNeasy[®] Tissue Kit (Qiagen) war kein deutlicher Unterschied bei verschiedenen Proteinase K-Konzentrationen zu erkennen, und aus Gründen der Zeitersparnis wurde in der dreistündigen Verdauung in Folge das im Kit mitgelieferte Enzym eingesetzt. Eine Verlängerung der Inkubationszeit von drei Stunden auf einen Tag brachte ebenfalls keine Verbesserung der PCR-Ergebnisse. Stattdessen traten vermehrt Nebenbanden bei < 400 bp auf, die aber nach Optimierung des PCR-Protokolls eliminiert werden konnten und wahrscheinlich nichts mit der Inkubationsdauer zu tun hatten.

Das Qiagen DNeasy[®] Tissue Kit erwies sich als zuverlässig und einfach in der Handhabung und wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit zur Isolierung von DNA aus infizierter Kutikula eingesetzt. Die Vorteile dieser mit einem kommerziellen Kit durchgeführten Extraktionsmethode liegen in der auch für nicht geschultes Personal einfachen Aufbereitung einer großen Anzahl von Proben, die bereits nach insgesamt dreieinhalb Stunden eine hohe Ausbeute an DNA gewährleistet. Nachteilig wirkt sich nur der etwas höhere Preis aus (derzeit 108,39 €/50 Anwendungen).

1.2 Konstruktion und Auswahl der Primer

Für den Nachweis von *Aphanomyces astaci* entwickelte bereits BAUSEWEIN (1999) ein Verfahren, das auf der PCR basiert. Dabei wurden Pilze in Reinkultur untersucht. Es entstand ein PCR-Produkt von ca. 1050 bp, das aufgrund seiner Größe nicht von *Aphanomyces helicoides*, *Aphanomyces laevis*, *Aphanomyces stellatus* (syn. *Achlya racemosa*), *Achyla colorata*, *Saprolegnia parasitica*, *Saprolegnia litoralis*, *Isoachlya toruloides* und *Leptolegnia sp.* abgrenzbar war. Erst durch eine anschließende Restriktionsenzym-Analyse mit drei verschiedenen Endonukleasen (*Alu I*, *Hind III*, *Ava I*) war eine Differenzierung von *Aphanomyces astaci* zu diesen Arten möglich.

Diese PCR eignet sich jedoch nicht zum Nachweis der Krebspest direkt aus Wirtsgewebe, da infizierte Tiere häufig einen sekundären Befall mit anderen Erregern aufweisen, und somit nicht gewährleistet ist, dass in der PCR das gewünschte Produkt von *Aphanomyces astaci* amplifiziert wird und nicht stattdessen das von anderen, nahe verwandten Pilzen. Diese

weisen in der Regel eine wesentlich höhere Wachstumsrate auf und neigen dazu, *Aphanomyces astaci* zu überwuchern. Das könnte bei starkem Sekundärbefall mit anderen Oomycota dazu führen, dass deren DNA in der PCR vermehrt wird und in Folge dessen eine möglicherweise vorhandene Krebspestinfektion undetektiert bleibt.

Das Bestreben der vorliegenden Arbeit war es, eine PCR zu entwickeln, die möglichst spezifisch und sensitiv *Aphanomyces astaci* direkt aus infiziertem Krebsgewebe nachweisen kann, so dass sich die schwierige und äußerst arbeits- und zeitaufwendige Anzucht des Pilzes in Reinkultur vor Einsatz in die PCR erübrigt. Zu diesem Zweck wurden anhand des Sequenzvergleichs verschiedener Oomycota neue Oligonukleotidprimer konstruiert (Anhang, Abbildung 61).

1.2.1 Strategische Überlegungen zum Primer-Design

Als Zielsequenz der Primer wurde die ITS-Region (ITS 1, 5.8S, ITS 2) der für das rRNA-Gen kodierenden DNA gewählt. Die Länge dieser Region variiert innerhalb verschiedener Pilzarten (siehe auch II.10) und enthält sowohl konservierte als auch variable Bereiche. Zusätzlich ist die rRNA hochrepetitiv und kommt bei Eukaryoten in 100facher Kopie vor (BAINBRIDGE 1990, MALACINSKI und FREIFELDER 1998), weshalb sie mit hoher Sensitivität entdeckt werden kann und gut für diagnostische Zwecke geeignet ist.

Die internen transkribierten Spacer 1 und 2 (ITS 1 und 2) des rRNA-Gens (rDNA) sind nichtkodierend, weshalb sich dort Mutationen während der Evolution ansammeln können, ohne dass die biologische Funktion des Organismus beeinträchtigt wird, und er einer natürlichen Selektion unterliegt. Durch die Wahl von Primern, die in diesem Bereich binden, wird die Wahrscheinlichkeit erhöht, eng verwandte Arten und Stämme, die sich nur durch Punktmutationen unterscheiden, mitzuerfassen. Diese hypervariablen Regionen ITS 1 und ITS 2 liegen zwischen den für die 18S (SSU)-5.8S- und 28S (LSU)-rRNA kodierenden DNA-Regionen. Diese wiederum sind hochkonserviert und Primer in diesen Bereichen ermöglichen die Amplifikation ganz unterschiedlicher Genotypen. Dazu gehören die universellen Primer ITS 1 und ITS 4 (WHITE et al. 1990), die die gesamte ITS-Region (ITS 1, 5.8S, ITS 2) amplifizieren und häufig zur Untersuchung des Genoms von pflanzenpathogenen Pilzen mittels PCR genutzt werden, insbesondere zur Konstruktion von spezifischen Primern innerhalb dieses Bereiches (SCHILLING et al. 1996, KAGEYAMA et al. 2000, TOOLEY et

al. 1997, BORNEMAN und HARTIN 2000, HENDOLIN et al. 2000, WEILAND und SUNDSBAK 2000). Zwar gehören die Oomycota nach aktueller molekularbiologischer Klassifikation nicht mehr zu den Pilzen, sondern zu den Chromista (siehe auch II.3.2), doch aufgrund ihrer Morphologie werden sie auch heute noch oft als solche bezeichnet. Auch in diesem Zusammenhang sollen sie noch als Fungi besprochen werden, da sie zum einen ein pilztypisches Mycel ausbilden, und zum anderen die bereits beschriebenen Primer ITS 1 und ITS 4 in der PCR sowohl bei ihnen als auch bei „echten Pilzen“ ein Produkt amplifizieren (WHITE et al. 1990).

Zur Konstruktion der Primer in der vorliegenden Arbeit wurden zunächst die Sequenzen der ITS-Region von sechs nah verwandten Oomycota-Arten (*Aphanomyces astaci*-Stamm M96/1, *Aphanomyces astaci*-Stamm FDL 457, *Aphanomyces astaci*-Stamm Li, *Aphanomyces laevis*, *Aphanomyces helicoides*, *Aphanomyces stellatus*, *Saprolegnia parasitica*, *Saprolegnia litoralis*, *Leptolegnia sp.*), die in beide Richtungen (mit ITS 1: 5' → 3', mit ITS 4: 3' → 5') sequenziert worden waren, mit 11 Oomycota-Sequenzen aus der *NCBI Genbank* (Accession No. AF218151, AF218155, AF218156, AF218154, AF266783, AF266798, AF266779, AF087474, AF271229, AB043506, AF271230) aligned. Das Alignment mit den markierten Primern ist im Anhang (Abbildung 61) dargestellt.

Grundsätzlich sollte bei dem Entwerfen von Primern darauf geachtet werden, dass sie aus mindestens 16 Nukleotiden bestehen (BROWN 1996, EDEL 1998), um zu gewährleisten, dass sie nur an einer Stelle im Genom binden. Außer der etwa gleichen Länge der Primer eines Primerpaares sollte ihr GC-Anteil ausgewogen (40–60 %) sein, um die Ausbildung von Sekundärstrukturen zu vermeiden. Zusätzlich sollten am 3'-Ende ein bis zwei G's oder C's lokalisiert sein, die für eine stabilere Bindung an dem Ende sorgen, das den Startpunkt für die *Taq*-Polymerase darstellt (RASMUSSEN und REED 1992, ROUX 1995). Basenfehlpaarungen zwischen Template und Primer sollten vermieden werden; diese wirken sich vor allem am 3'-Ende aus, wo sie zu einem vollständigen Versagen der Amplifikation und einem falsch-negativen Ergebnis der PCR führen können (LINZ und DEGENHARDT 1990). Die Annealing-Temperatur der beiden Primer sollte in etwa gleich sein. Je höher sie gewählt wird, desto spezifischer ist die PCR, da die Vermehrung unerwünschter Nebenprodukte reduziert wird (WU et al. 1991). Die Annealing-Temperatur wird durch die Anzahl der Wasserstoffbrücken-Bindungen beeinflusst und kann durch Hinzufügen und Weglassen von Nukleotiden an einem Primer beeinflusst werden. Letztlich muss bei der

Sequenz der Primer darauf geachtet werden, dass ihre 3'-Enden nicht komplementär zueinander sind, damit eine störende Primer-Dimer-Bildung vermieden wird, die die Qualität der PCR stark beeinflussen kann (COEN 1991).

Bei dem Alignment (Anhang, Abbildung 61) wurde darauf geachtet, dass konservierte Regionen übereinstimmten und untereinander geschrieben wurden. Die Zuordnung der Regionen ITS 1 (Kleinbuchstaben), 5.8S (Großbuchstaben) und ITS 2 (Kleinbuchstaben) der sequenzierten Arten (*Aphanomyces astaci* M96/1, *Aphanomyces astaci* FDL 457, *Aphanomyces astaci* Li, *Aphanomyces laevis*, *Aphanomyces helicoides*, *Aphanomyces stellatus*, *Saprolegnia parasitica*, *Saprolegnia litoralis*, *Leptolegnia sp.*) erfolgte in Analogie zu NCBI Genbank-Sequenzen von anderen Oomycota. Dabei entspricht die Größe der Bereiche denen von anderen Oomycota (II.10).

Die Sequenzen der Oligonukleotid-Primer wurden so gewählt, dass sie zu allen bekannten Sequenzen von *Aphanomyces astaci* und den anderen *Aphanomyces*-Arten (*Aphanomyces laevis*, *Aphanomyces helicoides*) homolog waren. *Aphanomyces stellatus* (syn. *Achlya racemosa*) wurde dabei außer acht gelassen, da seine Sequenz wesentlich mehr Polymorphismen aufwies, und bereits BAUSEWEIN (1999) bestätigt hatte, dass es sich hierbei um einen Vertreter der Gattung *Achlya* statt *Aphanomyces* handelt.

Desweiteren wurden die Primer nach dem Prinzip der geringsten Homologie zwischen den *Aphanomyces*-Arten und anderen Oomycota (*Saprolegnia*, *Leptolegnia*, *Achlya*, *Peronospora*, *Phytophthora*, *Pythium*) ausgewählt. Insgesamt konnten sechs Bereiche gefunden werden, auf die die oben beschriebenen Kriterien zutrafen. Die neu konstruierten Primer wurden entsprechend der Lage ihres 3'-Endes in der ITS-Region als NS 166, NS 170, NS 310, NS 318 (forward primer, sense primer, downstream primer) NS 681 und NS 700 (reverse primer, antisense primer, upstream primer) bezeichnet. Ihre Lage sowie die Position von BO 525 und BO 640 (OIDTMANN, unveröffentlicht) ist in Abbildung 55 dargestellt.

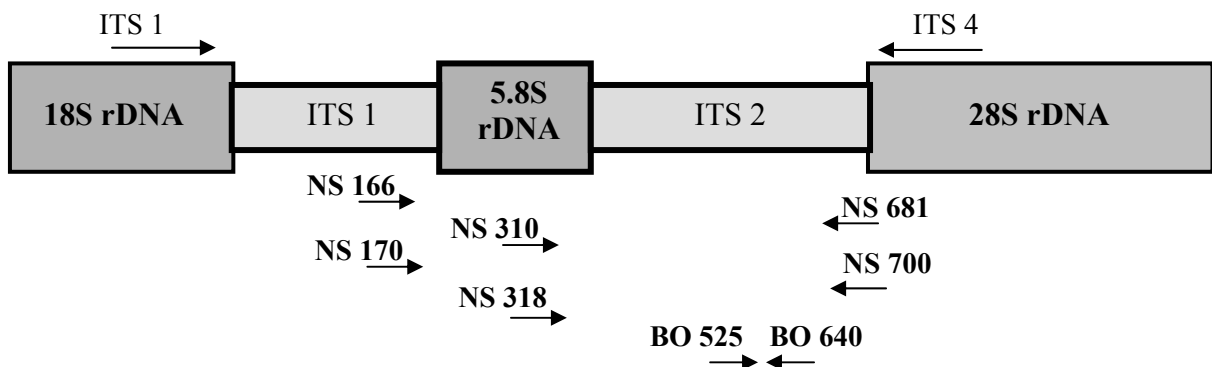


Abbildung 55: Lokalisation der Primer am rRNA-Gen

Die ITS-Regionen der Oomycota wurden anschließend mit *NCBI Genbank*-Sequenzen von Dekapoden (AF198536, AF198565, AF198574, AF198575, AF198582, AF198590, AF198593, AF198599, AF198606) verglichen, um zu vermeiden, dass die Primer später Wirtsgewebe amplifizieren, das ebenfalls in jedem DNA-Extrakt aus klinischen Proben enthalten ist. Die ITS-Regionen der Dekapoden waren zu denen der Pilze nur wenig homolog, so dass kein sinnvolles Alignment möglich war (nicht abgebildet). Stattdessen wurden die Sequenzen der neu konstruierten Primer in die Nukleotid-Datenbank der *NCBI-Genbank* unter Verwendung des Suchprogramms BLAST eingegeben und auf ihre Spezifität überprüft. Die BLAST-Recherche ergab keinen Treffer aller verwendeten Primer auf eine Krebssequenz.

1.2.2 Selektion der Primer

Bei den entwickelten vier „forward“ und zwei „reverse“ Primern ergeben sich insgesamt 8 denkbare Kombinationen zur Paarung. Ihre Lage im Genom ist im Anhang (Abbildung 61) dargestellt. Dabei liegen die Primer NS 166 und NS 170 um nur vier Basen verschoben in der ITS 1-Region der *Aphanomyces*-Arten. NS 310 und NS 318 sind bis auf acht Nukleotide identisch und binden in der konservierten 5.8S-Region. Die beiden „reverse“ Primer (NS 681 und NS 700) liegen exakt hintereinander, ohne sich zu überlappen. Ihr 3'-Ende liegt in der ITS 2-Region, das 5'-Ende von NS 700 in der 28S-Region. Alle acht Paarungskombinationen wurden optimiert (III.C.1.3) und ergaben mit der gewünschten Template-DNA ein Signal in dem erwarteten Größenbereich. Kein Primerpaar amplifizierte Wirts-DNA (III.C.1.4). Allerdings erwiesen sich besonders die Primer NS 310 und NS 318 als unzuverlässig im Gebrauch, ergaben zum Teil Nebenbanden und in ihrer Kombination mit NS 681 und NS 700 teilweise gar kein Signal bei schon zuvor positiv getesteten Proben.

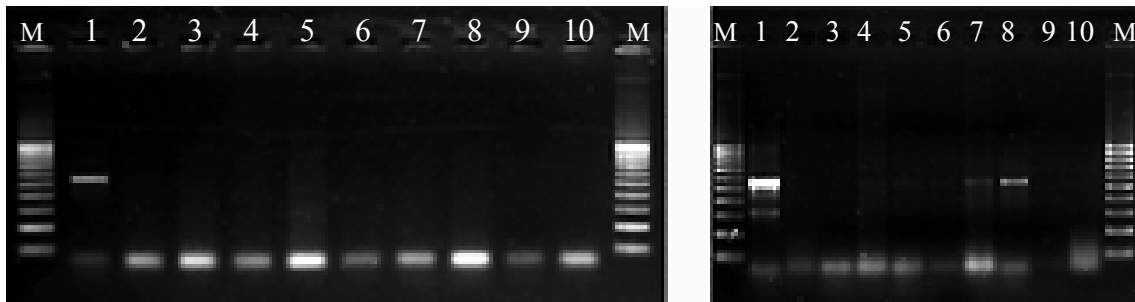
Die Nebenbanden, die selbst nach der Primer-Optimierung auftraten, könnten damit zusammenhängen, dass beide Primer in der konservierten 5.8S-Region liegen und zusätzlich zu dem aus Krebskutikula isolierten *Aphanomyces astaci* andere Pilz-DNA amplifizieren könnten. Außerdem unterscheidet sich der Primer NS 318 ausschließlich in der letzten Base seines 3'-Endes von den *Achlya*-Sequenzen und NS 310 nur in einer unterschiedlichen Base („C“ statt „T“) im Bereich seines 5'-Endes von *Phytophthora sp.* (AF 087474) (Anhang, Abbildung 61). Dies legt den Schluss nahe, dass trotz der spezifischeren „reverse“ Primer eine gelegentliche Vermehrung eines unspezifischen Produktes möglich ist. Das Fehlen einer Bande wiederum könnte dadurch erklärt werden, dass bei der Optimierung die Puffer des

PCR OptimizerTM Kits (Invitrogen) verwendet wurden, während später die mit der Polymerase mitgelieferten Puffer zum Einsatz kamen, denen die entsprechende Menge MgCl₂ zugesetzt wurde. Auch bei den anderen Primerpaaren konnte bei der Umstellung von den Optimizer Kit-Puffern auf die kostengünstigeren 10x Puffer eine Reduktion der Signalstärke beobachtet werden, doch schien dies keine so große Auswirkungen zu haben. Aus Kostengründen wurde der mit dem Enzym mitgelieferte Puffer bevorzugt und bei Magnesium-Optima über 1,5 mM dieses extra zugesetzt. Wegen ihrer Unzuverlässigkeit und der mangelnden Reproduzierbarkeit der PCR wurden im weiteren Verlauf der Arbeit die Primerkombinationen NS 310/NS 681, NS 310/NS 700, NS 318/NS 681 und NS 318/NS 700 nicht weiterverwendet.

In zahlreichen Versuchen erwiesen sich schließlich die Primerkombinationen NS 166/NS 681, NS 170/NS 681 und NS 166/NS 700 für die Krebspest-Diagnose am geeignetsten. Da aber eine Auswahl von zwei Primerkombinationen ausreichte und NS 166/NS 700 aufgrund der vergleichsweise niedrigen Annealing-Temperatur (45°C) unspezifischer erschien, wurden letztlich die Primerkombinationen NS 166/NS 681 (Annealing-Optimum bei 55°C) und NS 170/NS 681 (Annealing-Optimum bei 53°C) für die weitere Anwendung ausgewählt. Zusätzlich sollten die spezifischen Primer BO 525/BO 640 (OIDTMANN, unveröffentlicht) Anwendung finden.

1.3 Wahl des PCR-Protokolls

Nachdem die einzelnen Kombinationen mit den neu konstruierten Primern getestet worden waren, und die Auswahl auf NS 166/NS 681 und NS 170/NS 681 gefallen war, wurden die Reaktionsbedingungen für diese Primerkombinationen erneut variiert. Besonders eine Erhöhung der eingesetzten Eluat-Menge von 1 µl auf 10 µl optimierte den Ausgang der PCR (Abbildung 56, A und B), während eine noch größere Menge an Eluat im PCR-Reaktionsansatz einen „schmierigen“ Hintergrund erzeugte und die PCR nicht verbesserte. Fortan wurden jeweils 10 µl des unverdünnten Eluats in die einfachen PCRs (50 µl-Ansatz) eingesetzt. BAUSEWEIN (1999) verwendete 2 µl Template in einem 20 µl-Ansatz, doch bestand ihre DNA ausschließlich aus Pilz-Template, während in der vorliegenden Arbeit sowohl Oomycota-, als auch Krebs-DNA im Eluat enthalten war. Dies machte eine größere Menge an Ausgangs-DNA für einen entsprechend höheren Anteil an Erreger-DNA im Mastermix nötig.



M	100 bp-Molekulargewichtsmarker								M
1	Positiv-Kontrolle					6	30 Sporen/mg		
2	0 Sporen/mg					7	100 Sporen/mg		
3	1 Spore/mg					8	300 Sporen/mg		
4	3 Sporen/mg					9	Negativ-Kontrolle der Extraktion		
5	10 Sporen/mg					10	Negativ-Kontrolle der PCR		

Abbildung 56: Vergleich des PCR-Ergebnisses mit den Primern NS 166 und NS 681 nach Einsatz von (A) 1 µl, bzw. (B) 10 µl Eluat (unverdünnt) in den 50 µl-Mastermix einer Spiked PCR

Nach der Optimierung der einfachen PCRs wurde die Entwicklung einer Nested PCR angestrebt. Bei dieser dienen die Produkte der ersten PCR als Template für die zweite PCR, nach der die vervielfältigten Fragmente innerhalb der Produkte der ersten PCR liegen und dabei stets kürzer als diese sind. Dies sollte zum einen die Sensitivität und zum anderen die Spezifität der entwickelten Methode erhöhen.

Abbildung 57 und 58 zeigen anhand des Infektionsversuches mit 10 Sporen/ml die Sensitivitätssteigerung durch die verschachtelten PCRs (B) im Vergleich zu der einfachen PCR (A) mit nur dem jeweiligen inneren Primerpaar. Auf eine Beschriftung der einzelnen Gelspuren wurde verzichtet, da sie zur Verdeutlichung der höheren Empfindlichkeit der Nested PCR nicht nötig ist. Sie entspricht der in Abbildung 48 (III.C.2.2).

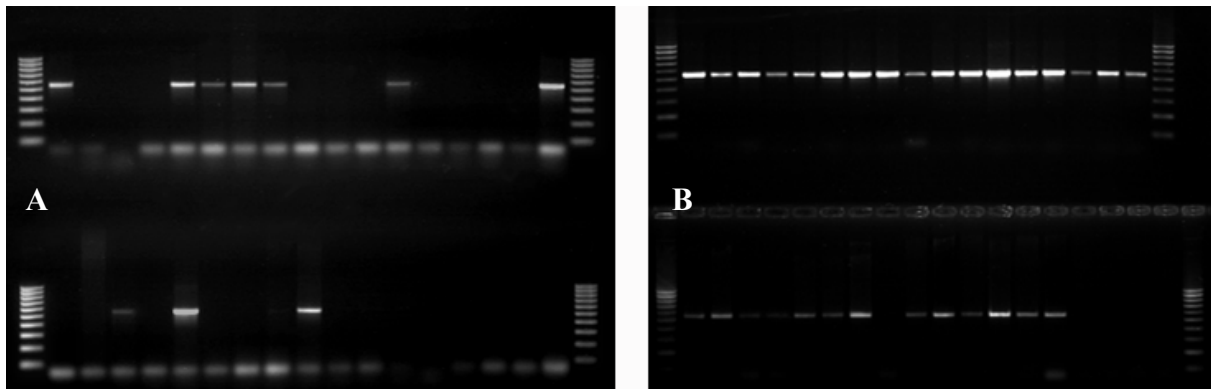


Abbildung 57: Vergleich der (A) einfachen PCR (NS 170/NS 681) mit der (B) Semi-Nested PCR (NS 166/NS 681 und NS 170/NS 681) mit DNA aus dem Infektionsversuch 10 Sporen/ml Wasser

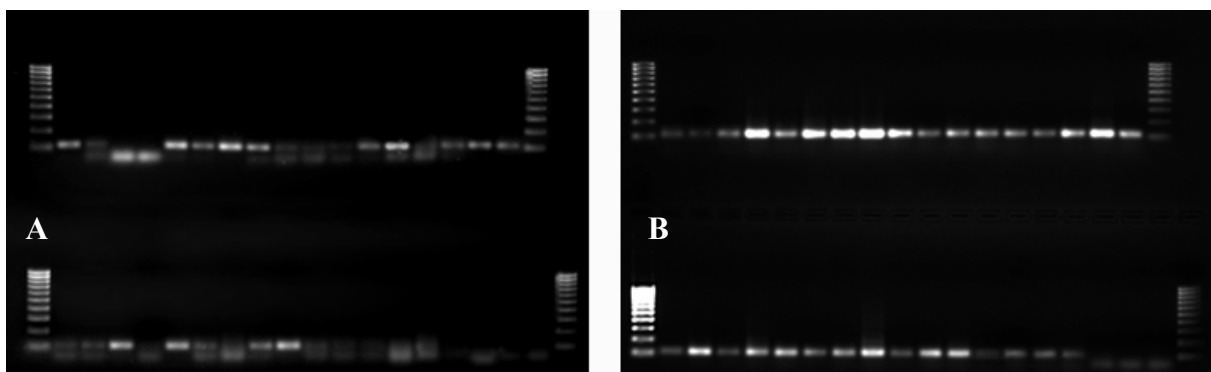


Abbildung 58: Vergleich der (A) einfachen PCR (BO 525/BO 640) mit der (B) Nested PCR (NS 166/NS 681 und BO 525/BO 640) mit DNA aus dem Infektionsversuch 10 Sporen/ml Wasser

Der Nachteil einer solchen Nested PCR liegt außer im höheren Aufwand in dem wesentlich größeren Kontaminationsrisiko. So ist durch Handling einer bereits in einer PCR vielfach vermehrten DNA die Gefahr groß, den Mastermix durch bereits entstandene PCR-Produkte zu verunreinigen und falsch-positive Ergebnisse zu erhalten. Zu diesem Zweck wird bei jeder PCR eine Negativkontrolle ohne DNA mitangesetzt. Außerdem werden die PCR-Mastermixe in einem ausschließlich für diesen Zweck reservierten Raum mit gesonderten Geräten unter weitmöglicher Verwendung von Einmalartikeln (Handschuhe, Pipettenspitzen mit Filter) angesetzt (KWOK und HIGUCHI 1989).

Bei allen PCRs wurden die Ansätze vor Einsatz in den Thermocycler auf Eis gehalten, um eine unspezifische Reaktion der Polymerase zu verhindern. Auf einen sogenannten „Hot Start“, bei dem die *Taq* erst nach 5minütiger Denaturierung der DNA zugesetzt wird, wurde verzichtet. Dieser erhöht in der Regel zwar die Spezifität, doch ist das Kontaminationsrisiko durch offene PCR-Gefäße in der Umgebung des Thermocyclers und durch Bildung von Aerosolen wesentlich größer.

Eine Überschichtung mit Mineralöl gegen Volumenverluste war bei dem verwendeten Thermocycler nicht nötig, da ein beheizbarer Deckel (110°C) integriert war.

Bereits bei der einfachen PCR zeigte die Primerkombination NS 166/NS 681 eine höhere Sensitivität (10 Sporen/mg Gewebe) als die Kombination NS 170/NS 681 (100 Sporen/mg Gewebe). Zur Auswahl einer geeigneten Nested PCR wurden dann die drei selektierten Primerkombinationen untereinander kombiniert, um die beste Paarung zu ermitteln, wobei jeweils 1 µl des Produktes aus der 1. PCR in die 2. PCR eingesetzt wurde. Um möglichst realistische Bedingungen zu erhalten, wurde die Kutikula von natürlich infizierten Edelkrebse extrahiert, deren Befall zuvor lichtmikroskopisch als gering-, mittel- und hochgradig beurteilt worden war. Die Menge an PCR-Produkt wurde sowohl für die einzelnen PCRs mit den äußeren Primern als auch für die Nested PCRs, nach jeweils 40 und 60 Zyklen überprüft. Dabei konnten die einfachen PCRs mit den Primerkombinationen NS 166/NS 681 und NS 170/NS 681 keine der drei Befallsstärken detektieren, während die Semi-Nested PCR mit NS 166/NS 681 außen und NS 170/NS 681 innen und die Nested PCR mit NS 170/NS 681 außen und BO 525/BO 640 innen ausschließlich bei der als hochgradig infiziert beurteilten Kutikula ein deutliches Signal ergaben. Die Primerpaarung NS 166/NS 681 in der 1. PCR und BO 525/BO 640 in der 2. PCR erwies sich als am besten geeignet, da sie bei allen drei Befallsstärken eine Krebspestinfektion nachweisen konnte. Eine etwas niedrigere Zyklenzahl in der 1. PCR zeigte sich als günstiger, was daran liegen könnte, dass die äußeren Primer nicht nur *Aphanomyces astaci*, sondern auch andere *Aphanomyces*-Arten, die zum Teil im Wasser und bei Krebsen vorkommen können, amplifizieren. Ist die Zyklenzahl der ersten PCR zu hoch, können auch andere, sehr nah verwandte Pilze in vielfacher Kopie vorliegen, was eine Amplifikation mit BO 525/BO 640 in der zweiten PCR erschweren könnte, wenn der Anteil an *Aphanomyces astaci*-DNA im Verhältnis ungünstig verteilt ist. Sowohl für die erste als auch für die zweite PCR werden 45 Zyklen vorgeschlagen. Obwohl sich die Nested PCR mit den Primerkombinationen NS 166/NS 681 und BO 525/BO 640 als am sensitivsten erwiesen hat, wurden im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit außer

diesem Protokoll auch das der Semi-Nested PCR mit den Primerkombinationen NS 166/NS 681 und NS 170/NS 681 weiterverfolgt. Letzteres weist Charakteristika einer Re-PCR auf, da nicht nur ein Primer (NS 681) bei der 1. und 2. PCR komplett gleich ist (Semi-Nested), sondern die Lage des Primers NS 170 nur um 4 Nukleotide im Vergleich zu NS 166 verschoben ist.

Beide PCR-Protokolle, die Nested-PCR und die Semi-Nested PCR, weisen Vor- und Nachteile auf. Die Vorteile der Nested PCR mit BO 525/BO 640 als innerem Primerpaar liegen in der hohen Sensitivität und Spezifität, auf die später noch eingegangen werden soll. Die inneren Primer liegen in einer für *Aphanomyces astaci* hochkonservierten Region, in der die bisher charakterisierten und getesteten Stämme miterfasst werden. Gleichzeitig ist dieser Bereich variabel genug, um eine Amplifikation anderer *Aphanomyces*-Arten zu verhindern. Ein Problem könnte dann entstehen, wenn Mutationen von *Aphanomyces astaci* im Ansatzbereich der Primer auftreten, die eine Detektion des Erregers verhindern. Die Bestimmungskriterien, wann es sich um verschiedene Stämme einer Art oder Arten einer Gattung handelt, sind nicht genau festgelegt und hängen oft von vielen verschiedenen (morphologischen und molekularbiologischen) Faktoren ab. Eine Mutation im Bereich der Primer BO 525/BO 640 macht aber noch keine andere Art, wenn sich der Erreger morphologisch und physiologisch wie *Aphanomyces astaci* verhält. Somit könnte es im Laufe der Entwicklung zu geringfügigen Veränderungen im Genom von *Aphanomyces astaci* kommen, für deren Erkennung die Primer BO 525/BO 640 zu spezifisch sind. Bereits bei den Stämmen Da und FDL 457 konnte eine Insertion in der ITS-Region im Vergleich zu den anderen sequenzierten *Aphanomyces astaci*-Stämmen beobachtet werden; diese lagen jedoch an einer Stelle, die eine Amplifikation mit den spezifischen Primern nicht beeinflusste.

Bei der Konstruktion der Primer NS 170/NS 681, die als inneres Primerpaar in der Semi-Nested PCR dienen, wurde bewusst auf die hohe Spezifität verzichtet. Sie sollten in der Lage sein, auch nah verwandte andere *Aphanomyces*-Arten nachzuweisen, ohne aber zu unspezifisch zu sein. Die DNA von anderen Oomycota wie *Saprolegnia*-Arten, die oft als Sekundärerreger vorkommen, sollte nicht amplifiziert werden; allerdings sollte die Wahrscheinlichkeit erhöht werden, auch neue und noch nicht bekannte Genotypen von *Aphanomyces astaci* nachzuweisen. Unter der geringeren Spezifität litt allerdings auch die Sensitivität dieser PCR.

1.4 Bestimmung der Spezifität und analytischen Sensitivität

Im Folgenden wurden beide PCR-Strategien weiterverfolgt und sowohl ihre Spezifität als auch Sensitivität bestimmt.

Die Spezifität aller Primerpaare, auch der inneren alleine, wurde zunächst in den einfachen PCRs überprüft und nach Optimierung der Protokolle zu verschachtelten PCRs deren Ergebnisse bestätigt. Die Semi-Nested PCR mit NS 170/NS 681 als innerem Primerpaar ergab Produkte in der erwarteten Größe bei allen 20 getesteten *Aphanomyces astaci*-Stämmen, bei *Aphanomyces cladoganus*, *Aphanomyces cochloides*, *Aphanomyces euteiches*, *Aphanomyces helicoides*, *Aphanomyces iridis*, *Aphanomyces irregulare* und *Aphanomyces laevis*. Keine Amplifikation fand statt bei *Aphanomyces stellatus* (syn. *Achlya racemosa*) und *Aphanomyces brassicae*. Die ITS-Region der Letzteren wurde sequenziert und unterschied sich in ihrer Sequenz deutlich von der der anderen *Aphanomyces*-Arten. Die ITS-Sequenz von *Aphanomyces stellatus* war bereits bekannt, ebenso die fehlende Homologie der Primer NS 166, NS 170 und NS 681 innerhalb dieses Genoms. Bereits BAUSEWEIN (1999) hatte seine Zugehörigkeit zu der Gattung *Achlya* bestätigt, was auch in der vorliegenden Arbeit erklärt, warum kein Produkt mit dem Primerpaar NS 170/NS 681 erzielt werden konnte.

Somit konnten mit der Semi-Nested PCR zuverlässig *Aphanomyces astaci* und sehr nah verwandte Arten nachgewiesen werden. Die unteren Nachweisgrenzen für diese Methode sind im Vergleich zu der Nested PCR in Tabelle 23 festgehalten.

In der einfachen und in der Nested PCR mit BO 525/BO 640 wurden ausschließlich die 20 eingesetzten *Aphanomyces astaci*-Stämme nachgewiesen, alle anderen Oomycota, einschließlich der *Aphanomyces*-Arten außer *Aphanomyces astaci*, ergaben kein Signal. Die Sensitivität dieses PCR-Protokolls ist in Tabelle 24 dargestellt.

Tabelle 24: Sensitivität der Semi-Nested und der Nested PCR

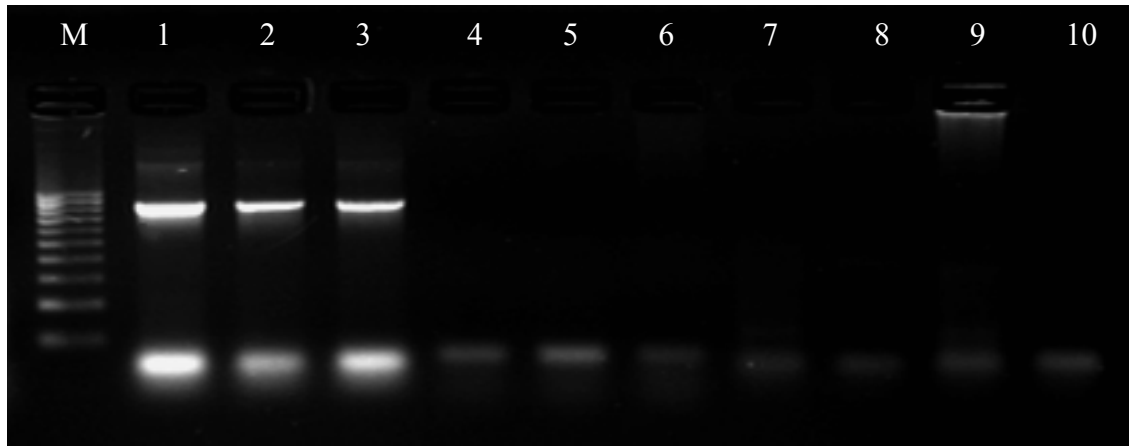
Art der eingesetzten DNA:	untere Nachweisgrenze	
	Semi-Nested PCR mit NS166/NS 681 und NS 170/NS 681	Nested PCR mit NS166/NS 681 und BO 525/BO 640
Plasmid-DNA	10 fg	10 ag
DNA aus Pilzmycel	1 ag	1 ag
DNA aus Zoosporen	10 Sporen	1 Spore
Spiked PCR	10 Sporen/mg	1 Spore/mg
DNA aus Infektionsversuchen	ab Tag 2 mit Ausnahmen	ab Tag 2 durchgehend

Außer *Aphanomyces astaci* und anderen Oomycota wurden in der Spezifitätsbestimmung die DNA von anderen Pilzen, die bei Krebsen zu finden sind, ebenso eingesetzt, wie auch Bakterien und Parasiten, die bei Krebsen vorkommen sowie Wirts-DNA. Sowohl die Semi-Nested als auch die Nested PCR amplifizierten keine dieser Nukleinsäuren.

Diese DNA wurde ebenfalls in PCRs mit Primern eingesetzt, von denen ein Produkt erwartet wird. Dies diente zur Bestätigung der ausreichenden DNA-Menge in den Proben (III.C.1.5). Bei *Aeromonas hydrophila* konnte mit den Primern CSPU 3/CSPU 5 nicht die von FRANCIS und STEWART (1997) beschriebene, für gramnegative Bakterien typische, Bande bei 200 bp beobachtet werden. Trotz mehrmaliger Wiederholung der PCR stellte sich das PCR-Produkt dieser Spezies als mehrere unspezifische Banden dar.

Die „gesunde“ Krebs-DNA wurde aus der Muskulatur isoliert, da diese wesentlich zellreicher ist und eine vielfach höhere Ausbeute an DNA garantiert als aus der Kutikula zu gewinnen wäre. Gleichzeitig wurde aber auch DNA aus der Kutikula zur Kontrolle eingesetzt. Dabei wurde die Kutikula und Muskulatur von verschiedenen Krebsarten herangezogen: *Astacus astacus* als Vertreter der hochempfindlichen Spezies, bei denen sich *Aphanomyces astaci* in der Regel ungehindert ausbreitet, sowie *Pacifastacus leniusculus* und *Procambarus clarkii* als Vertreter der weniger empfänglichen Spezies, die zwar eine Infektion in sich tragen können, dieser aber in der Regel nicht erliegen und somit als Vektoren für die empfänglichen Arten fungieren. Für die entwickelte Methode ist es essentiell, dass die Primer keine Homologie zu Krebs-DNA zeigen, da die Erreger-DNA ohne vorherige Anzucht von *Aphanomyces astaci* aus der Kutikula immer in Verbindung mit Wirts-DNA vorliegt. Sowohl die einfachen PCRs (Abbildung 59), als auch die Semi-Nested und die Nested PCR amplifizierten von allen drei

Krebsarten kein Produkt mit der Template-DNA (III.C.1.5). Als Positivkontrolle der DNA-Extraktion aus Krebsgewebe wurden die Eluate in einer PCR mit den krebsspezifischen Primern 143 F/145 R eingesetzt, was zu deutlichen Signalen im erwarteten Größenbereich von 825 bp führte (Abbildung 59: einfache PCRs; siehe auch III.C.1.5: verschachtelte PCRs).



M	100 bp-Molekulargewichtsmarker	10	Negativ-Kontrolle
<u>DNA von:</u>		<u>PCR mit Primer:</u>	
1, 4, 7	<i>Astacus astacus</i>	1-3	143F/145R
2, 5, 8	<i>Procambarus clarkii</i>	4-6	NS170/NS 681
3, 6, 9	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	7-9	BO 525/BO 640

Abbildung 59: Darstellung der Spezifität der entwickelten einfachen PCRs gegenüber Wirtsgewebe

Die Sensitivität der entwickelten PCRs wurden bereits in Tabelle 24 zusammenfassend dargestellt. Diese entspricht bzw. übertrifft sogar die Ergebnisse anderer Veröffentlichungen über Pilze, bei denen sie mit 100 fg unter Einsatz von befallenem Gewebe angegeben wurde. Variationen in der Sensitivität wurden in diesem Zusammenhang mit dem unterschiedlichen GC-Gehalt in der ITS-Region verschiedener Spezies erklärt (HENDOLIN et al. 2000).

Erstrebenswert bei der Entwicklung einer PCR ist die Detektion von nur einer genomischen Einheit. Um die Anzahl an genomischen Einheiten bestimmen zu können, muss folgendermaßen vorgegangen werden (BAUSEWEIN 1999):

In der vorliegenden Arbeit wurde ein 747 bp-großes Insert (ITS-Region von M96/1) in einen 3900 bp-großen Vektor (pCR[®]2.1) eingebaut. Vektoren sind DNA-Trägermoleküle, deren Funktion meist von bakteriellen Plasmiden übernommen wird. Da das Insert nur einmal in dem Plasmid vorkommt, kann ein Plasmid-Molekül einer genomischen Einheit gleichgesetzt werden.

Berechnung des Molekulargewichtes der gesamten Plasmid-DNA

(Vektor + Insert = 4647 bp):

(660 g*mol⁻¹*bp⁻¹ = durchschnittliches Molekulargewicht eines Basenpaares)

$$4647 \text{ bp} \times 660 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{bp}^{-1} = 3\,067\,020 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

$$1 \text{ mol Plasmid-DNA} = 3\,067\,020 \text{ g}$$

Berechnung der Anzahl der in 10 ag *Aphanomyces astaci*-Plasmid-DNA enthaltenen

Plasmidmoleküle:

(6,022 * 10²³ mol⁻¹ = Avogadro'sche Zahl)

$$3\,067\,020 \text{ g} = 6,022 \cdot 10^{23}$$

$$10^{-17} \text{ g} = x \text{ Genomäquivalente}$$

$$x \text{ Genomäquivalente} = \frac{10^{-17} \text{ g} \times 6,022 \cdot 10^{23}}{3\,067\,020 \text{ g}} = 1,964$$

$$10 \text{ ag Plasmid-DNA} \approx 1,9 \text{ Plasmid-Moleküle}$$

Entsprechend enthalten 10 fg Plasmid-DNA 1900 Plasmid-Moleküle.

In Analogie zu dieser Berechnung wird geschlossen, dass die untere Nachweisgrenze der Nested PCR bei 1,9 Genomäquivalenten, die der Semi-Nested PCR bei 1900 Genomäquivalenten liegt. Erstere liegt um zwei Zehnerpotenzen höher als bei der von BAUSEWEIN (1999) beschriebenen PCR (184 Genomäquivalente), Letztere um eine Zehnerpotenz niedriger.

BAUSEWEIN (1999) sah im Falle der Zoospore diese einzellige Fortpflanzungsform als ein Genomäquivalent an, bedachte dabei aber nicht die Tatsache, dass die rRNA in vielfacher Kopie vorkommt. In der vorliegenden Arbeit konnte 1 Zoospore mit der Nested, 10

Zoosporen mit der Semi-Nested PCR nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von BAUSEWEIN (1999) lag die Nachweisgrenze gegenüber zellulärer DNA in der vorliegenden Arbeit bei beiden PCRs höher (1 ag) als bei dem Einsatz von Plasmid-DNA. Diese Tatsache kann dadurch erklärt werden, dass bei Eukaryoten die Gen-Sequenzen, die für rRNA kodieren, in vielfachen Kopien und in Tandemanordnung vorkommen; so liegt die Zahl der Kopien bei filamentösen Pilzen beispielsweise bei etwa 100 (BAINBRIDGE 1990). Dadurch können Sequenzen in diesem Bereich, wie es auf die ITS-Region zutrifft, mit hoher Sensitivität detektiert werden.

Wie bereits im Literaturteil eingehend erläutert (II.10) beträgt die Gesamtgenomgröße bei den Oomycota 40-50 Mb. Ebenfalls dort beschrieben ist die Umrechnung $1 \text{ pg} \approx 0,98 \times 10^6 \text{ kb}$. Analog dazu ist aufgerundet $1 \text{ ag} \approx 1 \text{ kb}$. Theoretisch angenommen, dass das Genom von *Aphanomyces astaci* etwa 45 Mb groß ist und die ITS-Region 100fach in diesem vorkommt, so ist der zu amplifizierende Bereich der ITS-Region in 450 kb einmal enthalten. Nachdem $1 \text{ ag} \approx 1 \text{ kb}$, ist es wahrscheinlich, dass man mit einer sehr sensitiven PCR 450 ag zelluläre DNA detektieren kann. Eine noch höhere Sensitivität (1 ag), wie sie in der vorliegenden Arbeit gefunden wurde, kann dann auftreten, wenn die Template-DNA genau den Bereich enthält, der viele hintereinanderliegende Cluster der zu amplifizierenden Sequenz enthält. Die für die rRNA kodierenden Gene liegen in Clustern von etwa 13 kb Länge vor (II.10), in denen die gewünschte Sequenz jeweils einmal vorkommt und die durch etwa 2 kb (II.10) voneinander getrennt sind. So ein Bereich kann theoretisch etwa 30mal in 450 kb vorkommen, so dass die Detektionsgrenze noch wesentlich niedriger liegen kann. Dies sind alles nur rein theoretische Werte, deren Berechnungen hilfreich sind, um die Sensitivität einer PCR abschätzen zu können und die im vorliegenden Fall die hohe Sensitivität der entwickelten Methoden (1 ag bei genomischer DNA aus Pilzmycel) verdeutlichen.

Im Vergleich dazu erscheint die Sensitivität der Spiked PCR (10 Sporen/mg für die Semi-Nested PCR, 1 Spore/mg für die Nested PCR, II.C.1.8) wesentlich schlechter, da pro Spore die zu amplifizierende Sequenz mehrfach vorhanden ist und somit theoretisch auch < 1 Spore nachgewiesen werden könnte. Dass dies nicht der Fall war, könnte einerseits an einer zum Teil PCR-inhibierenden Wirkung des zugesetzten Wirtsgewebes und andererseits an der Ungenauigkeit der Menge der eingesetzten Sporen liegen. Die gewünschte Sporenmenge wurde dabei, wie unter III.B.4.4 beschrieben, aus der Gesamtsporensuspension (75370 Sporen/ml nach Auszählung in der Neubauer Zählkammer, entspricht ca. 75 Sporen/ μl)

entnommen und letztlich in einen 20 µl-Ansatz, der zur DNA-Extraktion eingesetzt wurde, verbraucht. Bei weniger als 100 Sporen wurde vor der Entnahme der gewünschten Sporenmenge die Suspension verdünnt, um das Pipettier-Volumen zu erhöhen. Es folgten Kontrollzählungen in der Neubauer-Zählkammer, wobei allerdings bei Einsatz der entsprechenden Menge Suspension nicht immer die erwarteten Sporen < 10 ausgezählt werden konnten, da die Menge zu gering war. So könnte es theoretisch sein, dass trotz sorgfältiger Mischung der Sporensuspension, tatsächlich weniger als 10, 3 oder 1 Spore zu 30 mg Wirtsgewebe zugesetzt wurden, oder dass durch die Proteinase K-Verdauung die Zellwände der Sporen nicht vollständig lysiert wurden und somit die DNA-Ausbeute geringer als gewünscht war.

1.5 RFLP (Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus)

Im Falle der Semi-Nested PCR diene die anschließende Restriktionsenzym-Verdauung mit *Hinf I* der endgültigen Artdiagnose von *Aphanomyces astaci* und der Unterscheidung dessen von nah verwandten, anderen *Aphanomyces*-Arten. Bei der Nested PCR konnte bereits aufgrund des Auftretens einer Bande bei 114/115 bp die Krebspest-Diagnose gestellt werden, die im Folgenden mittels Restriktionsenzym-Analyse mit *Hph I* bestätigt wurde. Solch eine Verifikation eines PCR-Produktes ist grundsätzlich sehr wichtig, um die Wahrscheinlichkeit einer „falsch-positiven“ Diagnose nochmals zu minimieren.

Wichtig bei der Auswahl einer Restriktions-Endonuklease ist, dass zum einen ihre Erkennungssequenzen unterschiedlich häufig sowie an unterschiedlichen Positionen auf der amplifizierten Ziel-DNA bei verschiedenen Spezies vorkommen, und dass zum anderen der Bereich des Zielgens genügend innerhalb einer Art konserviert ist, damit alle Stämme innerhalb einer Spezies miterfasst werden. Das Restriktionsenzym sollte das PCR-Produkt wenigstens einmal schneiden, um eine misslungene Enzymhydrolyse erkennen zu können, die von einem Genotyp mit fehlenden Schnittstellen ansonsten nicht zu unterscheiden wäre (SAMBROOK et al. 1989).

Die anfänglichen Bedenken, dass die Verdauung von dem nur 115 bp-großen PCR-Produkt in zu kleinen Fragmenten (deutlich < 100 bp) enden könnte, die im Agarosegel kaum erkennbar sein würden, da Ethidium-Bromid die DNA quantitativ färbt (SAMBROOK et al. 1989)

waren unbegründet. Die Nested PCR garantiert genügend PCR-Produkt und ist ausreichend spezifisch, so dass die Fragmente der enzymatischen Hydrolyse in ausreichender Konzentration vorliegen und deutlich der Erfolg einer stattgefundenen Verdauung, sogar ohne vorherige Aufreinigung der PCR-Produkte, zu sehen ist. Dazu trägt auch die Tatsache bei, dass die beiden entstehenden Fragmente von 60 bp und 55 bp im Gel aufgrund des geringen Größenunterschiedes nicht getrennt sichtbar sind und somit nur als eine konfluierende, stärker ausgeprägte Bande in Erscheinung treten.

Unerwarteterweise gestaltete sich die Auswahl eines geeigneten Enzyms zum Schneiden des 550 bp-großen PCR-Produktes schwieriger, da die Sequenzen der unterschiedlichen *Aphanomyces*-Arten in Bereichen der Schnittstellen sehr ähnlich waren. Nach praktischer Anwendung von den drei anhand von Sequenzdaten ausgewählten Restriktionsenzymen konnte *Aphanomyces astaci* nur mit *Hinf I* von den anderen *Aphanomyces*-Arten unterschieden werden. Eine weitere interspezifische Differenzierung war ausschließlich bei *Aphanomyces irregulare* und *Aphanomyces helicoides* möglich, deren RFLP-Muster sich von dem der anderen Arten unterschied. Außer der großen Homologie der Sequenzen verschiedener *Aphanomyces*-Arten in der ITS-Region könnte auch eine niedrigere DNA-Konzentration in den PCR-Produkten zu den Schwierigkeiten bei der Enzymhydrolyse beitragen. Die Semi-Nested PCR ist weniger sensitiv als die Nested PCR und bei weniger Ausgangsmaterial wird auch die DNA-Menge pro Fragment nach der Verdauung weniger. In der Nested PCR dagegen muss sich die DNA-Menge nur auf zwei Banden verteilen, die zudem zu einem stark sichtbaren Signal zusammenfließen. Zusätzlich wurde bei der PCR und RFLP zum Teil DNA von Nicht-*Aphanomyces astaci*-Arten eingesetzt, die bereits vor mehreren Monaten gewonnen worden war, was bereits zu einer Degradierung der DNA hätte führen können, so dass die Menge an geeignetem Template in der Probe eventuell reduziert war. Dies stellte bei der Restriktionsenzym-Analyse der Produkte der Nested PCR kein Problem dar, da diese mit Nicht-*Aphanomyces astaci*-Arten gar kein Signal ergaben. Andererseits waren andere DNA-Proben, wie die der Infektionsversuche, mehrfach und über einen längeren Zeitraum ohne sichtbare Qualitätsverluste verwendet worden.

Die alleinige Durchführung einer Nested PCR als Beweis eines spezifisch positiven Befundes ist unzureichend, da durchaus die Wahrscheinlichkeit besteht, dass zufällig Amplifikate in der gleichen Größe wie das PCR-Produkt entstehen. Die Restriktionsenzym-Analyse dagegen eignet sich sehr gut zur Verifizierung der Ergebnisse einer diagnostischen PCR. Ihre Vorteile

gegenüber der Sequenzierung zur Bestätigung liegen in ihrem geringeren Kosten- und Zeitaufwand. Desweiteren ist eine Sequenzierung von DNA-Fragmenten < 120 bp grundsätzlich sehr schwierig, während sich die Verdauung des 115 bp-PCR-Produktes in der vorliegenden Arbeit als unproblematisch erwiesen hat. Als Nachteil des RFLP ist die Tatsache zu sehen, dass zwischen den Restriktionsenzym-Erkennungsstellen gelegene Mutationen nicht erkannt werden können und eine Unterscheidung verschiedener Stämme einer Art nicht möglich ist. In der Diagnostik ist dies nach vorherigem Auftreten einer PCR-Bande bei der entsprechenden Erkrankung nicht so sehr von Bedeutung; bei phylogenetischen Studien ist die Sequenzierung allerdings sinnvoller. Aufgabe der vorliegenden Arbeit war aber nicht die phylogenetische Untersuchung der einzelnen Stämme von *Aphanomyces astaci*, sondern der Nachweis der Art und somit die Diagnostik der Krebspest, die von allen Stämmen (M96/1, FDL 457, Da, etc.) gleichermaßen ausgelöst wird. Dennoch wurden die ITS-Regionen der *Aphanomyces astaci*-Stämme VL, Da, Kv, Pc und E im Rahmen dieser Arbeit sequenziert, um einen ausreichenden Vergleich der Basenabfolgen von Stämmen zu haben, die mittels RAPD (II.13) unterschiedlichen Genotypen zugeordnet werden. Die ITS-Regionen aller bisher sequenzierten Stämme wurden gegeneinander aligned (Anhang, Abbildung 62) und zeigten eine große Homologie mit 97,3 bis 100,0 % Identität (III.C.1.7, Tabelle 17).

2. Auswertung der Infektionsversuche

Da die Zoosporen eine Motilität von etwa 30 % aufwiesen und durch vorsichtiges Handling und Entfernung der Luftausströmer für eine Stunde nach Zugabe der Sporensuspension eine Enzystierung minimiert wurde, ist anzunehmen, dass der Tag der Zoosporenexposition dem der Infektion entspricht. Zusätzlich wurde den Tieren während des Versuches die Nahrung entzogen, um zu verhindern, dass sich die wenig spezifisch chemotaktisch verhaltenden Sporen an Futterresten oder Kot festsetzen konnten, und um die Häufigkeit eines Wasserwechsels reduzieren zu können, damit die Sporendosis in den einzelnen Becken weitgehend erhalten blieb.

Die Symptomatik und der Zeitraum des Auftretens von Todesfällen entsprach bei allen drei Zoosporen-Expositionsmengen den bereits von anderen Autoren beschriebenen Infektionsversuchen (SCHMID 1998, KLÄRDING 2001). Der Grund, warum die Symptome bei der Zoosporenexposition von 100/ml Wasser stärker auftraten als bei 1000 Sporen/ml

Wasser könnte sein, dass zum Einen eine ungewollte, verstärkte Agitation des sporenhaltigen Wassers bei 1000 Sporen/ml Wasser vor Einfüllen in die Flatdecks zu einer Enzystierung vieler Zoosporen geführt haben könnte und diese sich somit nicht an Krebse anheften konnten.

Es fiel auf, dass bei dem Versuch mit 10 Sporen/ml die meisten der untersuchten Kutikulasegmente einen Befall von „-“ aufwiesen, bei 100 und 1000 Sporen/ml dagegen einen stärkeren von „+“ (III.C.2.1, Abbildung 45).

Die bei insgesamt drei Edelkrebsen lichtmikroskopisch beobachteten dunkelbraunen, filigranen Strukturen, die stets in Verbindung mit örtlich begrenzten, melanierten Hyphen auftraten (III.C.2.1, Abbildung 44), konnten nicht näher identifiziert werden. Sie wurden als pathologische Veränderungen angesehen, die fest in der Kutikula verankert waren, keinen Einfluss auf den Ausgang der PCR hatten und über die auch in der Literatur keine Angaben zu finden waren. Eventuell könnte es sich dabei um verstärkte Melaninablagerungen gehandelt haben, wogegen aber die „bäumchenartige“ Aufzweigung des Gebildes spricht, die an lichtdurchlässigen Stellen zu erkennen war.

Häufig wird in der Literatur das vermehrte Vorkommen von Melanisierungen bei krebspestinfizierten amerikanischen Krebsarten beschrieben und daraus geschlossen, dass diese ihr Immunsystem erfolgreicher gegen den Erreger einsetzen können und die braunen Flecken in der Kutikula ein Zeichen dafür sind (siehe auch II.5). Aber auch bei Edelkrebsen können diese Melanisierungen bei einer Aphanomykose (UNESTAM und WEISS 1970, ALDERMAN et al. 1984) ebenso wie bei gesunden Krebsen nach früheren Verletzungen (KLÄRDING 2001) beobachtet werden. Wie eigene Untersuchungen zeigten, traten Melanisierungen in der Abdominalkutikula (Abbildungen 39-44) frühestens ab Tag 14 post expositionem und vermehrt bei Tieren der Versuchsgruppe 10 Sporen/ml Wasser auf, wobei vor allem Kutikulasegmente mit einem niedrigen Hyphenbefall betroffen waren (III.C.2.1, Abbildung 47). UNESTAM (1989) behauptete, dass es nur bei Infektion mit schwach virulenten Stämmen zu solchen Prozessen kommt, was im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden konnte. Vielmehr scheint eine initial geringere Infektionsdosis dem Krebs mehr Zeit zu geben, seine Immunabwehr zu aktivieren, wobei er aber letztlich doch der Infektion erliegt, insbesondere wenn er mit anderen Trägern der Krankheit zusammen gehältert wird. In diesem Zusammenhang wird das Vorkommen von

Melanisierungen häufiger bei experimentellen Infektionen als bei natürlichen Krebspest-Ausbrüchen beschrieben (NYBELIN 1936, BARAN und SOYLU 1989).

Mit beiden entwickelten PCR-Methoden, der Semi-Nested und der Nested PCR, konnte ab Tag 2 post expositionem (entspricht Tag 1 der Probenentnahme) ein positives Signal erreicht werden. Die Möglichkeit, dass dieses durch nur an der Kutikula anhaftende Zoosporen zustande gekommen sein könnte, wurde durch die vor der Sektion durchgeführte Desinfektion der Abdominalkutikula ausgeschlossen. Selbst eine zur Extraktion eingesetzte Exuvie (Krebs-Nr. 10, bei 1000 Sporen/ml Wasser) ergab eine PCR-Bande, was darauf hindeutet, dass die Häutung erst kurz zuvor stattgefunden haben musste.

Bei der Nested PCR mit den Primerkombinationen NS 166/NS 681 außen und BO 525/BO 640 innen konnte bei allen untersuchten Krebsen ein Signal beobachtet werden, bei der Semi-Nested PCR mit den Primerkombinationen NS 166/NS 681 außen und NS 170/ NS 681 innen konnte bei 4 der 92 Tieren keine Krebspest nachgewiesen werden. Es war auffallend, dass sowohl diese „falsch-negativen“ Ergebnisse als auch schwächer auftretende Signale bei allen drei Sporendosen und mit beiden entwickelten verschachtelten PCRs erst bei gegen Ende der Versuche examinierten Krebsen auftraten. Wie bereits oben erwähnt, kamen auch eventuelle Melanisierungen nicht vor Tag 14 post expositionem vor. Dies lässt die Vermutung zu, dass Melanin oder andere Faktoren der Immunabwehr die PCR in irgendeiner Weise hemmen könnten oder das Melanin den Pilz und damit auch dessen DNA schädigt. Ein anderer Grund könnte aber auch sein, dass die Tiere, die die Infektion für einen längeren Zeitraum überlebt haben und nach über zwei Wochen noch agil sind, ein besseres Immunsystem aufweisen, somit das Hyphenwachstum nicht so schnell fortschreiten konnte und folglich weniger Erregermaterial im Wirtsorganismus vorhanden ist. Dagegen spricht allerdings die Tatsache, dass schon zu Beginn der Infektion, als lichtmikroskopisch zum Teil gar keine Hyphen festgestellt werden konnten, deutlich positive PCR-Signale auftraten.

Es wurde vermutet, dass zum Einen das Vorhandensein von Melanin in der Probe und zum Anderen die Todesart (euthanasiert/verendet) bzw. bereits ablaufende autolytische Vorgänge Einfluss auf den Ausgang einer PCR und die Stärke der Banden haben könnten. Da eine PCR vielfache Zyklen an enzymatischer Reaktion beinhaltet, ist sie sehr sensitiv gegenüber Störungen durch Proteine, Salze, Chloroform, Phenol, Ethanol und andere Verunreinigungen. Wie Abbildung 51 (III.C.2.2) zeigte, kommen bei spontan verendeten Krebsen und solchen

ohne beobachteten Melanisierungen vermehrt stärker positive PCR-Signale vor als bei den euthanasierten Tieren und denen mit fleckiger, brauner Pigmentierung; Rückstände von inhibierenden Faktoren könnten bei diesen eine Rolle gespielt haben.

Innerhalb der ersten Tage der Infektionsversuche konnten oft stärkere PCR-Signale als in der Endphase beobachtet werden. Dies steht im Widerspruch zu lichtmikroskopisch-positiven Befunden und der erfolgreichen Anzucht von *Aphanomyces astaci*, die am besten erst kurz vor oder nach dem Tod eines Krebses (SCHMID 1998) gelingen, und stellt einen entscheidenden Vorteil gegenüber den herkömmlichen Nachweismethoden dar.

Tendenziell kamen bei den Versuchen mit höherer Zoosporenexposition auch die stärkeren PCR-Ergebnisse häufiger vor (III.C.2.2, Abbildung 52), allerdings konnte kein Zusammenhang zwischen der Befallstärke und der Stärke des PCR-Ergebnisses hergestellt werden. Dies könnte zum einen an mangelnder Information darüber liegen, wie viele Zellkerne sich in einer Hyphe befinden und damit genetische Information, zum anderen an dem vermehrten Auftreten von Inhibitoren in den einzelnen Fällen oder dem Hantieren mit sehr kleinen Mengen (μl -Bereich), so dass bei Ungenauigkeit der Pipetten und durch Pipettierfehler (zu tiefes Eintauchen in das Gefäß) mehr oder weniger DNA als tatsächlich gewünscht in die PCR eingesetzt wird.

3. Diskussion und Einsatzmöglichkeiten der entwickelten Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Strategien zur Diagnostik der Krebspest verfolgt. Die eine basiert auf der Überlegung, dass die Primer möglichst spezifisch *Aphanomyces astaci* nachweisen sollten, um die Sensitivität und Spezifität der Methode zu erhöhen, damit eventuelle sekundäre Verpilzungen der Krebse das PCR-Ergebnis nicht verfälschen können. Hierzu wurde die Nested PCR mit den Primerkombinationen NS 166/NS 681 und BO 525/BO 640 entwickelt und optimiert. Die zweite Strategie schließt die Überlegung mit ein, dass sich die in dieser Arbeit als Zielsequenz gewählte ITS-Region relativ schnell entwickelt und es irgendwann in der Zukunft zur Ausbildung anderer Genotypen von *Aphanomyces astaci* kommen könnte, die aufgrund von Punktmutationen im Bereich der Ansatzstelle der Primer nicht mehr detektiert werden könnten. Deshalb wurde bei der Entwicklung der Semi-Nested PCR mit den Primern NS 166/NS 681 und NS 170/NS 681 bewusst auf die sehr hohe

Spezifität verzichtet, um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen auch andere Genotypen identifizieren zu können. Dies hatte zur Folge, dass bei dieser PCR nicht nur bei *Aphanomyces astaci* ein positives Signal auftritt, sondern auch bei anderen *Aphanomyces*-Arten.

Sowohl bei den Infektionsversuchen als auch bei der Sensitivitätsbestimmung ergaben beide PCRs sehr zufriedenstellende Resultate (Tabelle 24). Als aber die Anwendbarkeit der Methoden an Feldmaterial unterschiedlicher Herkunft überprüft wurde (III.C.3), war das Ergebnis der Semi-Nested PCR nicht sehr überzeugend. Die Nested PCR mit den Primern NS 166/NS 681 außen und BO 525/ BO 640 innen konnte in 16 der 19 untersuchten Fällen durch Auftreten einer spezifischen Bande bei 115 bp eine Krebspestinfektion nachweisen, die durch die anschließende Restriktionsenzym-Analyse bestätigt werden konnte. Die Semi-Nested PCR mit NS 170/NS 681 zeigte nur bei vier der Proben ein Signal, was noch nicht für eine Krebspestinfektion, sondern nur einen Befall mit einer *Aphanomyces*-Art spricht. Die folgende Verdauung mit *Hinf I* diente der endgültigen Spezies-Diagnose. Nur bei zwei der vier Proben konnte auf diese Art und Weise *Aphanomyces astaci* identifiziert werden. Bei den anderen beiden Proben, 3040/00-3 und 177/02-1 trat ein ähnliches, aber doch mit einer zusätzlichen Bande differierendes RFLP-Muster auf. Da diese Proben, wie mit der Nested PCR bewiesen, *Aphanomyces astaci*-infiziert waren, könnte man aus den sehr ähnlichen Schnittstellen schließen, dass durch die PCR sowohl *Aphanomyces astaci*-DNA als auch die eines nah verwandten Pilzes amplifiziert wurde und der RFLP eine Kombination der Verdauung der DNA von beiden Pilzarten ist. Eine Bande > 200 bp wie sie hier aufgetreten ist, oder ein gleiches Muster konnte bei der Wahl einer geeigneten Restriktionsenzym-Verdauung (III.C.1.6), bei dem die unterschiedlichen *Aphanomyces*-Arten geschnitten worden waren, nicht beobachtet werden, so dass das Ergebnis nicht genau zugeordnet werden konnte. Das Nicht-Vorhandensein von positiven PCR-Signalen bei den meisten Proben nach der Semi-Nested PCR dürfte auf die geringere Sensitivität im Vergleich zu der Nested PCR zurückzuführen sein.

Dieser Mangel an Sensitivität sowie das Fehlen eines geeigneten Enzyms, das in der Verdauung Bruchstücke erzeugt, an denen eine interspezifische Diagnose erfolgen kann, sind entscheidende Nachteile der Semi-Nested PCR. Zwar konnte bei *Aphanomyces astaci* ein typisches RFLP-Muster beobachtet werden, aber *Aphanomyces euteiches*, *Aphanomyces iridis*, *Aphanomyces laevis*, *Aphanomyces cladogamus* und *Aphanomyces cochloides* konnten auf diese Art und Weise nicht voneinander unterschieden werden. Wenn so viele

unterschiedliche Spezies auf die gleiche Art und Weise geschnitten werden, liegt die Vermutung nahe, dass irgendwann eine dem Krebspesterreger ähnliche, aber nicht diese Krankheit hervorrufende, Art auftaucht, die ebenfalls zu dem „typischen“ Muster hydrolytisch gespalten wird und somit zu einer falsch-positiven Diagnose führt. Der große Vorteil der Semi-Nested PCR liegt darin, dass nah verwandte Arten, die mit der Nested PCR kein Signal ergeben würden, erkannt werden. Somit könnten auch neue Genotypen von *Aphanomyces astaci* mit Mutationen in den Bereichen der spezifischen Primer BO 525/BO 640 nachgewiesen werden.

Aus den beschriebenen Gründen eignet sich die entwickelte Semi-Nested PCR nicht so sehr zum Nachweis der Krebspest aus Wirtsgewebe. Sollte sie dazu eingesetzt werden, wäre eine Sequenzierung des PCR-Produktes sinnvoller als ein Verdauung. Dies ist für die Routinediagnostik wiederum zu teuer, insbesondere da mit der Nested PCR eine wesentlich potentere Möglichkeit zur Verfügung steht. Allerdings könnten die Primerpaarungen NS 166/NS 681 und NS 170/NS 681 bei phylogenetischen Studien der Gattung *Aphanomyces* Einsatz finden, da sie wesentlich sensitiver sind als sogenannte universelle Primer, wie ITS 1/ITS 4. Desweiteren könnten sie, sowie alle sechs in dieser Arbeit neu konstruierten Primer, als Grundlage zur Entwicklung eines PCR-Protokolls zum Nachweis von Nicht-*Aphanomyces astaci*-Arten dienen, was allerdings nicht Aufgabe der vorliegenden Dissertation war.

Zur Diagnose der Krebspest aus Wirtsgewebe hat sich die Nested PCR mit den Primern NS 166/NS 681 außen und BO 525/BO 640 innen als äußerst zuverlässig, spezifisch und sensitiv erwiesen. Zu den Nachteilen dieser Methode gehört das mit 115 bp sehr kurze PCR-Produkt, das nur eine geringe Auswahl an Restriktionsenzymen zur Verifikation des Ergebnisses bietet. Wie aber bereits bei der Semi-Nested PCR gezeigt wurde, bedeutet ein größeres PCR-Produkt von 550 bp nicht gleichzeitig eine umfassendere Selektion an Endonukleasen. Im Gegenteil, in der vorliegenden Arbeit zeigte sich die Hydrolyse des 115 bp-Fragmentes mit *Hph I* als unproblematischer als die Verdauung des 550 bp-Fragmentes mit *Hinf I* oder anderen Enzymen. Das nur 115 bp große PCR-Produkt könnte aber auch den Vorteil haben, dass die Wahrscheinlichkeit einer vollständigen Amplifikation während eines Zyklus bei wesentlich mehr DNA-Stücken gegeben ist, von denen wiederum nur vollständig amplifizierte PCR-Produkte in dem nächsten Zyklus als Template dienen können. Dies wäre ein weiterer Grund für die höhere Sensitivität der Nested PCR. Nachteilig könnte sich auf die Nested PCR die Tatsache auswirken, dass die äußeren Primer ein etwa 4x größeres Produkt als die inneren Primer amplifizieren. Dieser weite Abstand der beiden Primerkombinationen könnte zu einem

unnötigen Sensitivitätsverlust führen, der sich in der vorliegenden PCR aber nicht bemerkbar machte. Die Wahl von näher gelegenen äußeren Primer war jedoch aufgrund fehlender geeigneter Sequenzabschnitte als potentielle Primeransatzstellen nicht möglich. Bei der Konstruktion von so spezifischen Primern wie es BO 525/BO 640 sind, besteht die Gefahr, dass noch unbekannte *Aphanomyces astaci*-Stämme mit geringgradig polymorphem Genotyp nicht mehr erkannt werden. Allerdings wurden die in dieser Arbeit eingesetzten *Aphanomyces astaci*-Stämme (III.A.2, Tabelle 9) in einem Zeitraum von 37 Jahren (1962 bis 1999) isoliert ohne dass Mutationen aufgetreten sind, die den Ausgang der PCR beeinflussen. Der entscheidende Vorteil der entwickelten Nested PCR liegt außer in der hohen Sensitivität in der Spezifität. Zwar wird heutzutage vermehrt auf Protokolle zurückgegriffen, die ein weniger spezifisches PCR-Produkt hervorbringen, welches dann durch RFLP näher identifiziert wird, doch eignet sich diese Methode nicht so sehr zum Nachweis der Krebspest. *Aphanomyces astaci* ist ein sehr langsam wachsender Erreger, der häufig durch Sekundärkeime, die bei den durch die Infektion geschwächten Tieren vermehrt vorkommen, überwuchert wird. Eine PCR die außer der DNA des Krebspesterregers gleichzeitig die anderer Pilze hochamplifizieren würde, könnte zu einem falsch-negativen Ergebnis führen, da *Aphanomyces astaci* aufgrund seiner vergleichsweise geringeren Konzentration undetektiert bleibt.

4. Molekularbiologischer Nachweis von *Aphanomyces astaci* aus Krebsgewebe

Bis vor kurzem beanspruchte der Nachweis von *Aphanomyces astaci* mindestens zwei Wochen, da der Erreger erst in Reinkultur aus infiziertem Gewebe angezüchtet werden musste. Danach folgte die Produktion von Zoosporen, die im Tierversuch mit 100 %iger Mortalität erst die Bestätigung erbrachten (ALDERMAN und POLGLASE 1986, CERENIUS et al. 1988). Die von BAUSEWEIN (1999) beschriebene PCR-RFLP machte den Tierversuch überflüssig, konnte aber nur bei Pilzisolaten in Reinkultur angewendet werden. Dazu war es nötig, dass die infizierten Tiere kurz vor oder nach ihrem Tod zur Untersuchung gelangten, da sonst die Anzucht des Erregers nicht gelang.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte eine PCR zum Nachweis des Krebspesterregers etabliert werden, die die von FINCKH und ROLFS (1998) beschriebenen fünf Kriterien für eine erfolgreiche PCR (1) Spezifität, (2) Sensitivität, (3) Effizienz, (4) Reproduzierbarkeit und (5) Genauigkeit erfüllt.

Der besondere Vorteil der hier entwickelten Methode liegt darin, dass *Aphanomyces astaci* direkt aus infizierter Kutikula diagnostiziert werden kann, so dass seine schwierige und langwierige Anzucht überflüssig wird. Die Verifikation des ohnehin spezifischen PCR-Produktes durch Restriktionsenzym-Analyse bietet zusätzliche Sicherheit und die Wahl einer Nested PCR steigerte nochmals die Spezifität und Sensitivität. Die Diagnose kann innerhalb eines Tages gestellt werden und führt im Gegensatz zu allen anderen Methoden schon in einem sehr frühen Stadium der Infektion zu einem positiven Nachweis. Abbildung 60 zeigt eine Übersicht über die empfohlene Vorgehensweise zur Diagnostik von *Aphanomyces astaci*.

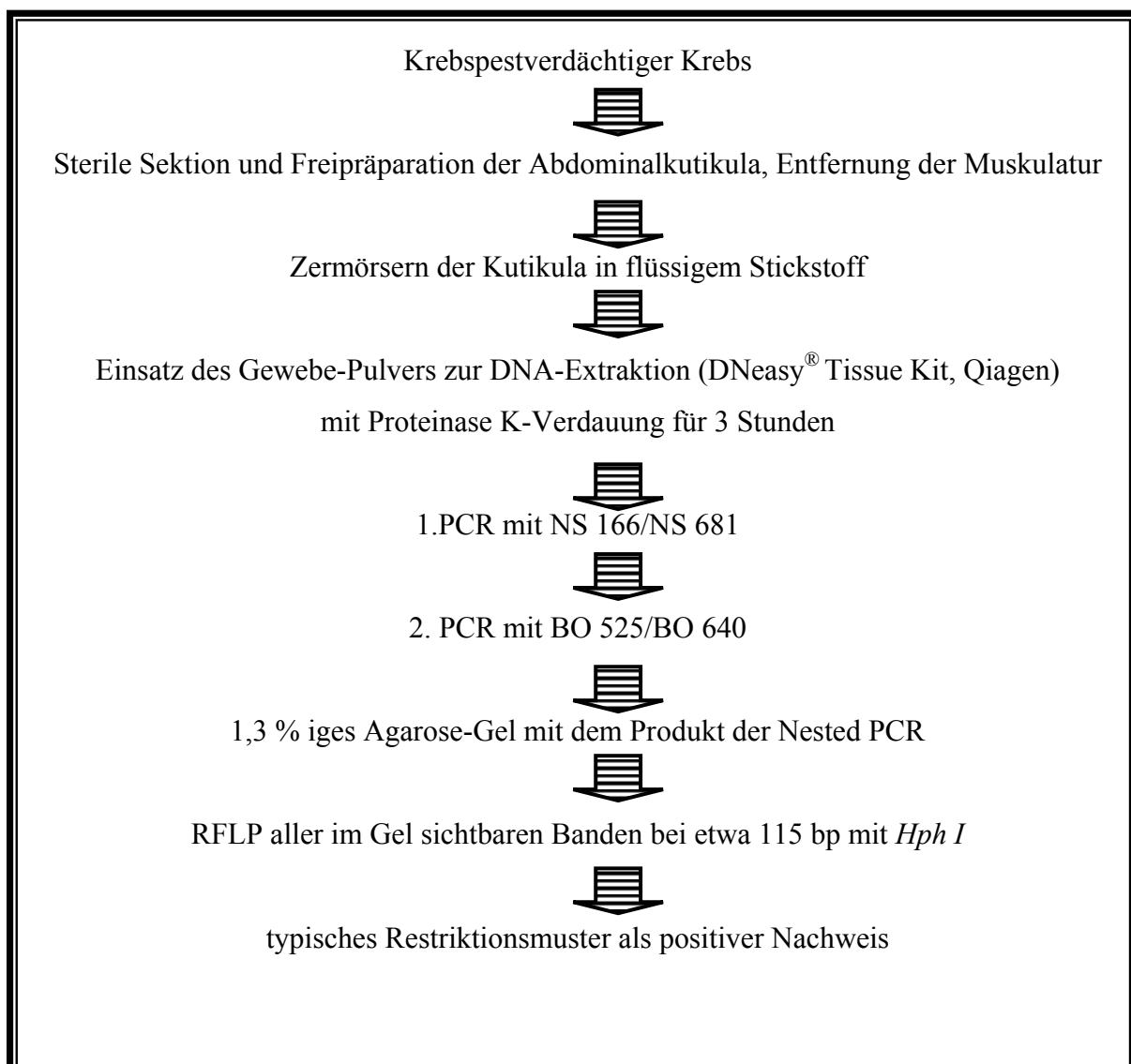


Abbildung 60: Schematische Übersicht über die empfohlene Vorgehensweise zur Diagnose der Krebspest aus Krebsgewebe

5. Ausblick

Die in diesem Projekt entwickelte molekularbiologische Methode bietet die Möglichkeit des zuverlässigen und frühzeitigen Nachweises der Krebspest direkt aus Krebsgewebe. Dabei wurden umfangreiche Untersuchungen bezüglich der Spezifität durchgeführt, wobei von besonderer Bedeutung war, dass die verwendeten Primer keine Homologie zu Krebs-DNA aufweisen.

Die Untersuchungen wurden an Edelkrebse (*Astacus astacus*), die zu den in Deutschland gefährdeten Arten gehören, durchgeführt. Da das Vorkommen von Melanin den Ausgang der PCR im Sinne einer Inhibition nicht stark beeinflusste, wie in den durchgeführten Infektionsversuchen gezeigt wurde, ist es sehr wahrscheinlich, dass diese Methode ebenso erfolgreich bei den amerikanischen Trägern angewendet werden kann. Bei zwei Feldproben (Signalkrebs 2935/00, Kamberkreb 177/02-2) wurde dies bereits bewiesen.

Desweiteren wurde gezeigt, dass bis zu 1 Spore in Suspension detektiert werden kann, was die Möglichkeit bietet, durch Anlockung von Zoosporen im Wasser (unspezifische Chemotaxis), diese direkt nachzuweisen. Untersuchungen in diesem Zusammenhang finden derzeit statt.

Durch die EU-Richtlinie 91/67/EWG besteht die Möglichkeit, für bestimmte Gebiete mit günstigem tierseuchenrechtlichen Status Bedingungen festzulegen, die das Verbringen von Tieren der Aquakultur aus anderen Gebieten in diese Regionen regeln, um dort die Gesundheit der jeweiligen Tierart zu schützen. Im Anhang A dieser Rechtsakte ist die Aphanomykose als Bedrohung für einheimische Krebsarten aufgelistet, so dass die Grundvoraussetzung zur Errichtung einer „Krebspest-freien Zone“ gegeben ist. Als Bedingung dafür sind hohe Untersuchungsfrequenzen vorgeschrieben, die nur dann durchgeführt werden können, wenn geeignete, schnelle und zuverlässige Diagnosemethoden zur Verfügung stehen. Die in dieser Arbeit etablierte PCR-Technik erlaubt die wenig zeitaufwendige, zuverlässige und sensitive Untersuchung einer großen Anzahl an Proben. Zusätzlich ermöglicht sie den Nachweis in einem extrem frühen Stadium der Infektion und zwar direkt aus frischem oder in 70 %igem Alkohol fixiertem Krebsgewebe und stellt somit ein großes Potential dar, in Programmen zur Seuchenbekämpfung eingesetzt zu werden. Wird diese Methode als offizielles Diagnoseverfahren zugelassen, wäre es möglich, die Krebspest

in das Tierseuchengesetz aufzunehmen und den Import von als Vektoren fungierenden Dekapoden zu überwachen. Durch Aufnahme in das „O.I.E. Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases“ könnte die Nested PCR auch international herkömmliche Methoden ersetzen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Im Literaturüberblick der vorliegenden Arbeit wird besonders auf die ökonomische und ökologische Bedeutung der Flusskrebse, den derzeitigen Stand der Forschung die Krebspest betreffend und die aktuelle taxonomische Klassifikation des Krebspesterregers, *Aphanomyces astaci*, eingegangen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine zuverlässige und schnelle Methode zum spezifischen und sensitiven Nachweis von *Aphanomyces astaci* direkt aus Krebsgewebe zu entwickeln. Zu diesem Zweck wurde zunächst ein kommerzielles Fertigkit (DNeasy[®] Tissue Kit, Qiagen) als geeignete DNA-Extraktionsmethode ausgewählt. Als Untersuchungsmaterial wurde die Abdominalkutikula von Edelkrebsen (*Astacus astacus*) eingesetzt. Anhand von Genomanalysen der ITS-Regionen (Genabschnitte, die zwischen den die ribosomale RNA kodierenden Genen liegen) verschiedener Oomycota wurden Oligonukleotid-Primer konstruiert, optimiert und auf ihre Eignung überprüft. Ausgehend von diesen Untersuchungen wurden zwei PCR-Protokolle etabliert: eine Semi-Nested und eine Nested PCR.

Die Semi-Nested PCR, die sich für die Routinediagnostik von *Aphanomyces astaci* als wenig geeignet erwiesen hat, bietet das Potential, als Grundlage für weiterführende Studien an anderen Arten der Gattung *Aphanomyces* zu dienen.

Die Nested PCR mit den äußeren Primern NS 166/NS 681 und den inneren Primern BO 525/BO 640 ergab mit allen 20 untersuchten *Aphanomyces astaci*-Stämmen ein PCR-Produkt von etwa 115 bp, das mit einer anschließenden Restriktionsenzym-Analyse mit der Endonuklease *Hph I* verifiziert werden konnte.

Die Nested PCR zeigte sich hochspezifisch gegenüber *Aphanomyces astaci*, während die DNA von anderen bei Krebsen und im Wasser vorkommenden Krankheitserregern und die DNA von Wirtsgewebe nicht amplifiziert wurde, was Grundvoraussetzung für den Einsatz dieser PCR als Standardmethode ist.

Die Nachweisgrenze der Nested PCR lag bei Verwendung von Plasmid-DNA bei 1,9 genomischen Einheiten und bei Einsatz von genomischer DNA aus Pilzmyzel bei 1 ag. Als

Aphanomyces astaci-Sporen in die DNA-Extraktion eingesetzt wurden, lag die Nachweisgrenze bei 1 Spore.

Zusätzlich wurden Infektionsversuche durchgeführt, bei denen Edelkrebse mit 10, 100 und 1000 *Aphanomyces astaci*-Zoosporen/ml infiziert wurden. Ein positives PCR-Ergebnis konnte ab Tag 2 post expositionem (entspricht dem Tag der ersten Probenentnahme) mit der beschriebenen Methode bei allen untersuchten Tieren beobachtet werden.

Schließlich wurde eine Validierung der entwickelten Nested PCR unter Einsatz von Wirtskutikula anhand 19 diagnostischer Proben unterschiedlicher Herkunft innerhalb Europas (aus Deutschland, der Schweiz, Österreich, Schweden und England) durchgeführt und die Ergebnisse mittels RFLP verifiziert.

Mit der in der vorliegenden Arbeit entwickelten molekularbiologischen Nachweismethode steht ein Verfahren zur Verfügung, das eine zuverlässige Diagnose von *Aphanomyces astaci* bereits im Anfangsstadium der Infektion direkt aus Krebsgewebe ermöglicht und innerhalb von 12 bis 15 Stunden (Sektion, DNA-Extraktion, Nested PCR, Agarosegel-Elektrophorese und bestätigende Restriktionsenzym-Analyse) durchführbar ist. Diese Methode ist somit ein geeignetes und zuverlässiges Mittel, um in Programmen zur Seuchenbekämpfung der Krebspest (*Aphanomyces astaci*) eingesetzt zu werden.

SUMMARY

Development of a molecular method for the detection of the causative agent of crayfish plague, *Aphanomyces astaci* SCHIKORA (Oomycota), from crayfish tissue (*Astacus astacus*)

The literature review of this doctoral thesis focuses on the economical and ecological significance of crayfish, the latest developments in research concerning crayfish plague, and the current taxonomic classification of the causative agent of crayfish plague, *Aphanomyces astaci*.

The objective of the present study was to develop a reliable and fast method for the specific and sensitive detection of *Aphanomyces astaci* directly from crayfish tissue. For this purpose, a commercial DNA Kit (DNeasy[®] Tissue Kit, Qiagen) was chosen and found suitable to extract DNA. Abdominal cuticle from noble crayfish (*Astacus astacus*) was used as diagnostic material. Based on genetic analysis of the ITS-region (genomic sites located between genes which code for ribosomal RNA) of diverse Oomycota species, oligonucleotide-primers were designed, optimised and tested for their suitability, which resulted in the establishment of two PCR protocols: a semi-nested and a nested PCR.

The semi-nested PCR proved to be little suited as a routine diagnostic method for the detection of *Aphanomyces astaci*, but it provides the potential to serve as a fundamental basis for further relevant studies on other *Aphanomyces* species.

The nested PCR using the outer primers NS 166/NS 681 and the inner primers BO 525/ BO 640 generated a PCR-product of 115 bp for all 20 *Aphanomyces astaci* strains tested. The result was verified by restriction enzyme analysis with the endonuclease *Hph I*.

The nested PCR proved to be highly specific for *Aphanomyces astaci*. Accordingly, the DNA of other pathogens found in crayfish and water, and of host tissue was not amplified, which is the fundamental requirement for this PCR to be utilised as a standard method.

The detection limit of the nested PCR was 1.9 genomic units using plasmid DNA and 1 ag using genomic DNA isolated from mycelium. When *Aphanomyces astaci*-spores were submitted to DNA extracion the detection limit was 1 spore.

In addition, infection experiments were performed in which noble crayfish were exposed to 10, 100, and 1000 *Aphanomyces astaci*-spores/ml. A positive PCR result was detectable on day 2 post-exposure (equivalent to the first day of sampling) with the method described above.

Finally, the nested PCR was evaluated on host cuticle of samples from different European locations (Germany, Switzerland, Austria, Sweden and England), and the results were verified using RFLP.

This thesis describes a molecular diagnostic method which ensures a reliable detection of *Aphanomyces astaci* directly from crayfish tissue, even in the initial stage of infection. This method can be conducted within 12 to 15 hours (post mortem examination, DNA extraction, nested PCR, agarose gel electrophoresis and confirming restriction enzyme analysis) and is an appropriate and powerful tool to be used in programmes for epidemic control of crayfish plague (*Aphanomyces astaci*).

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. Literaturangaben

- Ackefors, H.** (1989): Intensification of European freshwater crayfish culture in Europe. In: Special session on crayfish culture of Aquaculture 1989. World Aquaculture Society: Los Angeles
- Ackefors, H.** (1999): The positive effect of established crayfish introductions in Europe. In: Crayfish in Europe as alien species. How to make the best of a bad situation?. (Eds. F. Gherardi und D. M. Holdich). 49-61. A. A. Balkema: Rotterdam
- Ackefors, H.** (2000): Freshwater crayfish farming technology in the 1990s: a European and global perspective. *Fish and Fisheries* **1**, 337-359
- Ahne, W., Liebich, H.-G., Stohrer, M., und Wolf, E.** (2000). Zoologie - Lehrbuch für Studierende der Veterinärmedizin und Agrarwissenschaften. F. K. Schattauer VerlagsGmbH: Stuttgart
- Ainsworth, G. C., Sparrow, F. K., und Sussman, A. S.** (1973): The Fungi, Volume IV.B: A taxonomic review with keys: Basidiomycetes and lower fungi. Academic Press: New York, London
- Alderman, D. J.** (1993): Crayfish plague in Britain, the first twelve years. *Freshwater Crayfish* **IX**, 266-272
- Alderman, D. J.** (1996): Geographical spread of bacterial and fungal diseases of crustaceans. In: Preventing the spread of aquatic animal diseases. *Revue Scientifique et Technique de l'Office international des Épizooties* **15**, 603-632
- Alderman, D. J., Holdich, D. M., und Reeve, I. D.** (1990): Signal crayfish as a vector in crayfish plague in Britain. *Aquaculture* **86**, 3-6
- Alderman, D. J. und Polglase, J. L.** (1984): A comparative investigation of the effects of fungicides on *Saprolegnia parasitica* and *Aphanomyces astaci*. *Transactions of the British Mycological Society* **83**, 313-318
- Alderman, D. J. und Polglase, J. L.** (1986): *Aphanomyces astaci*: isolation and culture. *Journal of Fish Diseases* **9**, 367-379
- Alderman, D. J. und Polglase, J. L.** (1988): Pathogens, parasites and commensals. In: Freshwater Crayfish: Biology, management and exploitation. (Eds. D. M. Holdich und R. S. Lowery). 167-212. Croom Helm Ltd.: London

- Alderman, D. J., Polglase, J. L., und Frayling, M.** (1987): *Aphanomyces astaci*: pathogenicity under laboratory and field conditions. *Journal of Fish Diseases* **10**, 385-393
- Alderman, D. J., Polglase, J. L., Frayling, M., und Hogger, J.** (1984): Crayfish plague in Britain. *Journal of Fish Diseases* **7**, 401-405
- Bainbridge, B. W., Spreadbury, C. L., Scalise, F. G., und Cohen, J.** (1990): Improved methods for the preparation of high molecular weight DNA from large and small scale cultures of filamentous fungi. *FEMS Microbiology Letters* **66**, 113-118
- Baran, I. und Soylu, E.** (1989): Crayfish plague in Turkey. *Journal of Fish Diseases* **12**, 193-197
- Barton Rogers, B., Alpert, L. C., Hine, E. A. S., und Buffone, G. J.** (1990): Analysis of DNA in fresh and fixed tissue by the polymerase chain reaction. *American Journal of Pathology* **136**, 541-548
- Bausewein, S.** (1999): Etablierung einer molekularen Nachweismethode von *Aphanomyces astaci* (Oomycetes). Diss. med. vet., LMU München
- Belkhiri, A. und Dick, M. W.** (1988): Comparative studies on the DNA of *Pythium* species and some possibly related taxa. *Journal of General Microbiology* **134**, 2673-2683
- Bohl, E.** (1989): Comparative studies on crayfish broods in Bavaria (*Astacus astacus* L., *Austropotamobius torrentium* Schr.). *Freshwater Crayfish* **VII**, 287-294
- Bohl, E.** (1992): Rote Liste der Großkrebse. Beiträge zum Artenschutz. 15. Schriftenreihe des Bayerischen Landesamtes für Umweltschutz **11**, 69
- Bohl, E.** (1999): Crayfish stock situation in Bavaria (Germany) - attributes, threats and chances. *Freshwater Crayfish* **XII**, 765-777
- Borgia, P. T., Eagleton, L. E., und Miao, Y.** (1994): DNA preparations from *Aspergillus* and other filamentous fungi. *BioTechniques* **17**, 431-432
- Borneman, J. und Hartin, R. J.** (2000): PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 4356-4360
- Briard, M., Dutertre, M., Rouxel, F., und Brygoo, Y.** (1995): Ribosomal RNA sequence divergence within the Pythiaceae. *Mycological Research* **99**, 1119-1127
- Bridge, P. D., Arora, D. K., Reddy, C. A., und Elander, R. P.** (1998): Applications of PCR in Mycology. CAB International: Oxon, New York
- Brown, T. A.** (1996): Gentechnologie für Einsteiger. 2. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, Berlin, Oxford

- Caetano-Anollés, G., Bassam, B. J., und Gresshoff, P. M.** (1991): DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology* **9**, 553-557
- Cavalier-Smith, T.** (1981): Eukaryote kingdoms: seven or nine? *BioSystems* **14**, 461-481
- Cavalier-Smith, T.** (1985): The evolution of genome size. John Wiley & Sons Ltd.: London
- Cavalier-Smith, T.** (1986): The kingdom Chromista: origin and systematics. In: Progress on Phycological Research, Vol. 4. (Eds. F. E. Round und D. J. Chapman). 309-347. Biopress: Bristol
- Cerenius, L.** (1985): Morphology and physiology of the differentiation process in aquatic fungus, *Aphanomyces astaci*. *Acta Universitatis Upsaliensis* No. **783**
- Cerenius, L., Henttonen, P., Lindquist, O. V., und Söderhäll, K.** (1991): The crayfish pathogen, *Psorospermium haeckeli* activates the prophenoloxidase activating system of freshwater crayfish *in vitro*. *Aquaculture* **99**, 225-233
- Cerenius, L., Olsen, L. W., Lange, L., und Söderhäll, K.** (1984): The secondary zoospore of *Aphanomyces astaci* and *A. laevis* (Oomycetes, Saprolegniales). *Nordic Journal of Botany* **4**, 697-706
- Cerenius, L., Rufelt, S., und Söderhäll, K.** (1992): Effects of Ampropylfos ((RS)-1-aminopropylphosphoric acid) on zoospore formation, repeated zoospore emergence and oospore formation in *Aphanomyces* spp. *Pesticide Science* **36**, 189-194
- Cerenius, L. und Söderhäll, K.** (1984a): Repeated zoospore emergence from isolated spore cysts of *Aphanomyces astaci*. *Experimental Mycology* **8**, 370-377
- Cerenius, L. und Söderhäll, K.** (1984b): Chemotaxis in *Aphanomyces astaci* - an arthropod-parasitic fungus. *Journal of Invertebrate Pathology* **42**, 278-281
- Cerenius, L. und Söderhäll, K.** (1985): Repeated zoospore emergence as a possible adaptation to parasitism in *Aphanomyces*. *Experimental Mycology* **9**, 259-263
- Cerenius, L. und Söderhäll, K.** (1992): Crayfish diseases and crayfish as a vector for important diseases. *Finnish Fisheries Research* **14**, 125-133
- Cerenius, L., Söderhäll, K., Persson, M., und Ajaxon, R.** (1984): The crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci* - diagnosis, isolation and pathobiology. *Freshwater Crayfish* **VI**, 131-144
- Chen, W. und Hoy, J. W.** (1993): Molecular and morphological comparison of *Pythium arrhenomanes* and *P. graminicola*. *Mycological Research* **97**, 1371-1378
- Coen, D. M.** (1991): Enzymatic amplification of DNA by PCR: Standard procedures and optimization. *Current Protocols of Molecular Biology Supplements* **16**, 15.1.1-15.1.7

- Coker, W. C. und Matthews, V. D.** (1937): Saprolegniales. *North American Flora* **2**, 15-76
- Cooke, D. E. L., Drenth, A., Duncan, J. M., Wagels, G., und Brasier, C. M.** (2000): A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. *Fungal Genetics and Biology* **30**, 17-32
- Cooke, D. E. L. und Duncan, J. M.** (1997): Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on ITS1 and ITS2 sequences of the ribosomal RNA gene repeat. *Mycological Research* **101**, 667-677
- Copeland, H. F.** (1956): Classification of the lower organisms. Pacific Books: Palo Alto
- Corliss, J. O.** (1990): Towards a nomenclatural protist perspective. In: Handbook of Protoctista. (Eds. L. Margulis, J. O. Corliss, M. Melkonian und D. J. Chapman). XXV-XXX. Jones and Bartlett Publishers: Boston
- Crawford, A. R., Bassam, B. J., Drenth, A., Maclean, D. J., und Irwin, J. A. G.** (1996): Evolutionary relationships among *Phytophthora* species deduced from rDNA sequence analysis. *Mycological Research* **100**, 437-443
- Cummings, B. und Wood, T.** (1989): A simple and efficient method for isolating genomic DNA from endomycorrhizal spores. *Gene Analytical Techniques* **6**, 89-92
- Dahle, J.** (1982): Mykosen bei Krebsen - Eine Literaturübersicht. *Deutsche tierärztliche Wochenschrift* **89**, 46-50
- Daugherty, J., Evans, T. M., Skillom, T., Watson, L. E., und Money, N. P.** (1998): Evolution of spore release mechanisms in the Saprolegniaceae (Oomycetes): evidence from a phylogenetic analysis of internal transcribed spacer sequences. *Fungal Genetics and Biology* **24**, 354-363
- De Bary, A. und Woronin, M.** (1881): Untersuchungen über Peronosporen und Saprolegnien und die Grundlagen eines natürlichen Systems der Pilze. *Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Pilze* **4**, 1-145
- De Bary, A.** (1888): Species der Saprolegnien. *Botanische Zeitung* **46**, 599-610, 613-621, 629-636, 645-653
- Dehus, P.** (1990): Die Verbreitung der Flusskrebse (Decapoda; Astacidae, Cambaridae) in Schleswig-Holstein. *Faunistisch-ökologische Mitteilungen* **6**, 95-105
- Dehus, P.** (1997): Flusskrebse in Baden-Württemberg: Gefährdung und Schutz. Broschüre der Staatlichen Lehr- und Versuchsanstalt Aulendorf, Fischereiforschungsstelle Baden-Württemberg

- Dehus, P., Phillipson, S., Bohl, E., Oidtmann, B., Keller, M., und Lechleiter, S.** (1999): German conservation strategies for native crayfish species with regard to alien species. In: Crayfish in Europe as alien species. (Eds. F. Gherardi und D. M. Holdich). 149-159. A. A. Balkema: Rotterdam
- Dick, M. W.** (1969): Morphology and taxonomy of the Oomycetes, with special reference to Saprolegniaceae, Leptomitaceae and Pythiaceae. I. Sexual reproduction. *New Phytology* **68**, 751-775
- Dick, M. W.** (1972): Morphology and taxonomy of the Oomycetes, with special reference to Saprolegniaceae, Leptomitaceae and Pythiaceae. II. Cytogenetic systems. *New Phytology* **71**, 1151-1159
- Dick, M. W.** (1973): Saprolegniales and Leptomitales. In: The fungi - an advanced treatise, vol IV B. (Eds. F. K. Sparrow., G. C. Ainsworth und A. S. Sussman). 113-58. Academic Press: New York, San Francisco, London
- Dick, M. W.** (1990): Phylum Oomycota. In: Handbook of Protoctista. (Eds. L. Margulis, J. O. Corliss, M. Melkonian und D. J. Chapman). 661-85. Jones and Bartlett Publishers: Boston
- Dieffenbach, C. W., Lowe, T. M. J., und Dekslar, G. S.** (1993): General concepts for PCR primer design. *PCR Methods and Applications* **3**, 30-37
- Diéguez-Uribeondo, J., Huang, T.-S., Cerenius, L., und Söderhäll, K.** (1995): Physiological adaptation of an *Aphanomyces astaci* strain isolated from the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. *Mycological Research* **99**, 574-578
- Diéguez, U., Huang, T.-S., Cerenius, L., und Söderhäll, K.** (1997): The swamp crayfish *Procambarus clarkii* as a carrier of a *Aphanomyces astaci* strain physiologically adapted to warm temperatures. In: The introduction of alien species of crayfish in Europe. How to make the best of a bad situation? An international workshop. Abstract volume. (Eds. D. M. Holdich und M. Vannini). 46. Consiglio Nazionale delle Ricerche, Area della Ricerca di Firenze: Florenz
- Diéguez-Uribeondo, J. und Söderhäll, K.** (1993): *Procambarus clarkii* Girard as a vector for the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci* Schikora. *Aquaculture and Fisheries Management* **24**, 761-765
- Dimopoulos, G., Richman, A., Müller, H.-M., und Kafatos, F. C.** (1997): Molecular immune responses of the mosquito *Anopheles gambiae* to bacteria and malaria parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 11508-11513
- Dussling, U. und Hoffmann, C.** (1998): First discovery of a population of *Orconectes immunis* in Germany. *I.A.A. Newsletter* **20**, 5

- Duvic, B. und Söderhäll, K.** (1990): Purification and characterisation of a β -1,3-glucan binding protein from plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 9327-9332
- Duvic, B. und Söderhäll, K.** (1992): Purification and partial characterisation of a β -1,3-glucan binding protein membrane receptor from blood cells of the crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. *European Journal of Biochemistry* **207**, 223-228
- Duvic, B. und Söderhäll, K.** (1993): β -1,3-glucan binding protein from the plasma of the freshwater crayfish *Astacus astacus* and *Procambarus clarkii*. *Journal of Crustacean Biology* **13**, 403-408
- Edel, V.** (1998): Polymerase chain reaction in Mycology: an overview. In: Applications of PCR in Mycology. (Eds. P. D. Bridge, D. K. Arora, C. A. Reddy und R. P. Elander). 1-20. CAB International: Oxon, New York
- Eder, E. und Hödl, W.** (1998): Flusskrebse Österreichs. Gutenberg: Linz
- Eichert, R. und Wetzlar, H.** (1988): Die zehnfüßigen Süßwasserkrebse Mitteleuropas. Regierungspräsidium Tübingen
- Einsele, H., Hebart, H., Roller, G., Loeffler, J., Rothenhöfer, I., Müller, C. A., Bowden, R. A., Van Burik, J.-A., Engelhard, D., Kanz, L., und Schumacher, U.** (1997): Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *Journal of Clinical Microbiology* **35**, 1353-1360
- Ekman, S.** (1999): PCR optimization and troubleshooting, with special reference to the amplification of ribosomal DNA in lichenized fungi. *Lichenologist* **31**, 517-531
- Feller, C.** (2002): Entwicklung eines molekularbiologischen Verfahrens zur Diagnostik der Porzellankrankheit der Flusskrebse. Diss. med. vet., LMU München
- Finckh, U. und Rolfs, A.** (1998): PCR optimization strategies. *Roche Molecular Biochemicals*. http://206.53.227.20/prod_inf/manuals/pcr_man/pcr_toc.htm
- Förster, H. und Coffey, M. D.** (1993): Molecular taxonomy of *Phytophthora megasperma* based on mitochondrial and nuclear DNA polymorphisms. *Mycological Research* **97**, 1101-1112
- Förster, H., Coffey, M. D., Elwood, J. H., und Sogin, M. L.** (1990): Sequence analysis of the small subunit ribosomal RNAs of three zoosporic fungi and implications for fungal evolution. *Mycologia* **82**, 306-312
- Förster, H., Oudemans, P., und Coffey, M. D.** (1990): Mitochondrial and nuclear DNA diversity within six species of *Phytophthora*. *Experimental Mycology* **14**, 18-31
- Francis, K. P. und Stewart, G. S. A. B.** (1997): Detection and speciation of bacteria through PCR using universal major cold-shock protein primer oligomers. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **19**, 286-293

- Fuller, M. S. und Jaworski, A. E.** (1987): Zoospore fungi in teaching and research. Southeastern Publishing Cooperation: Athen
- Garber, R. C. und Yoder, O. C.** (1983): Isolation of DNA from filamentous fungi and separation into nuclear, mitochondrial, ribosomal, and plasmid components. *Analytical Biochemistry* **135**, 416-422
- Gedek, B.** (1980): Kompendium der medizinischen Mykologie. Paul Parey Verlag: Berlin, Hamburg
- Golbang, N., Burnie, J. P., und Matthews, R. C.** (1999): A polymerase chain reaction enzyme immunoassay for diagnosing infection caused by *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Pathology* **52**, 419-423
- Goodwin, D. C. und Lee, S. B.** (1993): Microwave miniprep of total genomic DNA from fungi, plants, protists and animals for PCR. *BioTechniques* **15**, 438-444
- Griffith, G. W. und Shaw, D. S.** (1998): Polymorphisms in *Phytophthora infestans*: Four mitochondrial haplotypes are detected after PCR amplification of DNA from pure cultures or from host lesions. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 4007-4014
- Hager, J.** (1996): Edelkrebse, Biologie - Zucht - Bewirtschaftung. Leopold Stocker Verlag: Graz
- Halder, M. und Ahne, W.** (1988): Virologische und mykologische Untersuchung an Krebspestbeständen verschiedener Herkunft. Bayrische Landesanstalt für Wasserforschung: München
- Halder, M., Ahne, W., und Thomson, I.** (1989): Die Krebspest: Diagnose und Isolierung des Erregers *Aphanomyces astaci*. *Tierärztliche Umschau* **44**, 79-82
- Hall, M., Van Heusden, M. C., und Söderhäll, K.** (1995): Identification of the major lipoproteins in crayfish hemolymph as proteins involved in immune recognition and clotting. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **216**, 939-946
- Haseton, A.** (2000):
<http://www.bio.umass.edu/biology/conn.river/protoc.html>
- Hastein, T. und Gladhaug, O.** (1972): The occurrence of the crayfish plague in Norway and attempts to prevent further spread of the disease. *Freshwater Crayfish* **I**, 181-184
- Hawksworth, D. L., Kirk, P. M., Sutton, B. C., und Pegler, D. N.** (1995): Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi. 8th Edn. CAB International: Cambridge
- Häll, L. und Unestam, T.** (1980): The effect of fungicides on the survival of the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*, Oomycetes, growing on fish scales. *Mycopathologia* **72**, 131-134

- He, Q., Marjamaki, M., Soini, H., Mertsola, J., und Viljanen, M. K.** (1994): Primers are decisive for sensitivity of PCR. *BioTechniques* **17**, 82-87
- Hendolin, P. H., Paulin, L., Koukila-Kähkölä, P., Anttila, V.-J., Malmberg, H., Richardson, M., und Ylikoski, J.** (2000): Panfungal PCR and multiplex liquid hybridization for detection of fungi in tissue specimens. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 4186-4192
- Hilgendorf und Magnus** (1884) zitiert bei SCHIKORA (1906): Die Krebspest. *Fischerei-Zeitung* **9**, 529-530
- Hofer, B.** (1898): Über die Krebspest. *Allgemeine Fischerei-Zeitung* **17**, 293-316
- Hofer, B.** (1906): Handbuch der Fischkrankheiten. Schweizerbartsche Verlag: Stuttgart
- Hogg, J.** (1861): On the distinction between a plant and an animal, and on a fourth kingdom of nature. *The Edinburgh New Philosophical Journal (new series)* **12**, 216-225
- Holdich, D. M.** (1988): The dangers of introducing alien animals, with particular reference to crayfish. *Freshwater Crayfish* **VII**, XV-XXX
- Holdich, D. M.** (2001): The native crayfish and threats to its existence. *British Wildlife* **2**, 141-143
- Holdich, D. M.** (2002): Biology of Freshwater Crayfish. Blackwell Science Ltd.: Oxon
- Holdich, D. M. und Lowery, R. S.** (1988): Freshwater crayfish - biology, management and exploitation. Croom Helm Ltd.: London
- Holdich, D. M. und Reeve, I. D.** (1988): Functional Morphology and Anatomy. In: Freshwater crayfish - biology, management and exploitation. (Eds. D. M. Holdich und R. S. Lowery). Croom Helm Ltd.: London
- Holthuis, L. B.** (1978): Decapoda. In: Limnofauna Europaea: Eine Zusammenstellung aller die europäischen Binnengewässer bewohnenden mehrzelligen Tierarten, mit Angaben über ihre Verbreitung und Ökologie. (Ed. J. Illies). 231-233. Gustav Fischer Verlag: Stuttgart
- Höhnk, W.** (1933): Polyplanetism and zoospore germination in Saprolegniaceae and Pythium. *American Journal of Botany* **20**, 45-62
- Huang, T.-S., Cerenius, L., und Söderhäll, K.** (1994): Analysis of genetic diversity in the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*, by random amplification of polymorphic DNA. *Aquaculture* **126**, 1-10
- Huner, J. V.** (1994): Freshwater Crayfish Aquaculture in North America, Europe, and Australia: Families Astacidae, Cambaridae, and Parastacidae. Haworth Press, Inc.: New York

- Innis, M. A. und Gelfand, D. H.** (1990): Optimization of PCRs. In: PCR protocols: a guide to methods and applications. (Eds. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky und T. J. White). 3-12. Academic Press: San Diego
- Järvenpää, T., Nylund, V., Railo, E., und Westman, K.** (1987): The effects of the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci* on the haemolymph of *Astacus astacus* and *Pacifastacus leniusculus*. *Freshwater Crayfish VII*, 223-233
- Johansson, M. W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K., und Söderhäll, K.** (2000): Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture* **191**, 45-52
- Johansson, M. W. und Söderhäll, K.** (1985): Exocytosis of the prophenoloxidase activating system from crayfish haemocytes. *Journal of Comparative Physiology* **156**, 175-181
- Johansson, M. W. und Söderhäll, K.** (1988): Isolation and purification of a cell adhesion factor from crayfish blood cells. *Journal of Cell Biology* **106**, 1795-1803
- Judelson, H. S.** (1997): Review: The genetics and biology of *Phytophthora infestans*: modern approaches to a historical challenge. *Fungal Genetics and Biology* **22**, 65-76
- Judelson, H. S. und Fabritius, A. L.** (2000): A linear RNA replicon from the oomycete *Phytophthora infestans*. *Molecular and General Genetics* **263**, 395-403
- Kageyama, K.** (1997): Detection of *Pythium ultimum* using polymerase chain reaction with species-specific primers. *Plant Disease* **81**, 1155-1160
- Kang, D., Liu, G., Lundstrom, A., Gelius, E., und Steiner, H.** (1998): A peptidoglycan recognition protein in innate immunity conserved from insects to humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 10078-10082
- Keller, M.** (1993): Development of a *Astacus astacus* population in Lake Bronnen - a small gravel lake in Bavaria, Germany. *Freshwater Crayfish IX*, 97-100
- Keller, M.** (1997): Amerikanische Flusskrebse - eine tödliche Gefahr für unsere heimischen Arten. *Fischer und Teichwirt* **2**, 58-62
- Keller, M.** (1999): 10 years of trapping *Astacus astacus* for restocking in Lake Bronnen, a Bavarian gravel lake. In: *Freshwater Crayfish XII*, 518-28
- Kendrick, B.** (1985): The fifth kingdom. Mycologue Publications: Waterloo, Ontario
- Klärding, K.** (2001): Morphologische Untersuchungen zur Krebspest (Erreger: *Aphanomyces astaci*, Oomycetes) bei Edelkrebsen (*Astacus astacus*). Diss. med. vet., LMU München
- Kwok, S., White, T. J., und Taylor, J. W.** (1986): Evolutionary relationships between fungi, red algae, and other simple eukaryotes inferred from total DNA hybridizations to a cloned Basidiomycete ribosomal DNA. *Experimental Mycology* **10**, 196-204

- Laurent, P. J. und Forest, J.** (1979): Données sur les écrevisses qu'on peut rencontrer en France. *La Pisciculture Francaise* **15**, 25-37
- Lecellier, G. und Silar, P.** (1994): Rapid methods for nucleic acids extraction from Petri dish-grown mycelia. *Current Genetics* **25**, 122-123
- Leclerc, M. C., Guillot, J., und Deville, M.** (2000): Taxonomic and phylogenetic analysis of Saprolegniaceae (Oomycetes) inferred from LSU rDNA and ITS sequence comparisons. *Antonie Van Leeuwenhoek* **77**, 369-377
- Lee, S. B., Milgroom, M. G., und Taylor, J. W.** (1988): A rapid, high yield mini-prep method for isolation of total genomic DNA from fungi. *Fungal Genetics Newsletter* **35**, 23-24
- Lee, S. B. und Taylor, J. W.** (1990): Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In: PCR protocols: a guide to methods and applications. (Eds. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky und T. J. White). 282-287. Academic Press: San Diego
- Lee, S. B. und Taylor, J. W.** (1992): Phylogeny of five fungus-like protocistan *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Molecular Biology and Evolution* **9**, 636-653
- Leedale, G. F.** (1974): How many are the kingdoms of organisms? *Taxon* **23**, 67-89
- Lehnen, L. P. und Powell, M. J.** (1989): The role of kinetosome-associated organelles in the attachment of encysting secondary zoospores of *Saprolegnia ferax* to substrates. *Protoplasma* **149**, 163-174
- Leipe, D. D., Wainright, P. O., Gunderson, J. H., Porter, D., Patterson, D. J., Valois, F., Himmerich, S., und Sogin, M. L.** (1994): The Stramenopiles from a molecular perspective: 16S-like rRNA sequences from *Labyrinthuloides minuta* and *Cafeteria roenbergensis*. *Phycologia* **33**, 369-377
- Lilley, J. H., Cerenius, L., und Söderhäll, K.** (1997): RAPD evidence for the origin of crayfish plague outbreaks in Britain. *Aquaculture* **157**, 181-185
- Lilley, J. H. und Inglis, V.** (1997): Comparative effects of various antibiotics, fungicides and disinfectants on *Aphanomyces invaderis* and other saprolegniaceous fungi. *Aquaculture Research* **28**, 461-469
- Linz, U. und Degenhardt, H.** (1990): Die Polymerase-Kettenreaktion. *Naturwissenschaften* **77**, 515-530
- Lipcomb, D. L.** (1985): The eukaryotic kingdoms. *Cladistics* **1**, 127-140
- Lipcomb, D. L., Farris, J. S., Källersjö, M., und Tehler, A.** (1998): Support, ribosomal sequences and the phylogeny of the eukaryotes. *Cladistics* **14**, 303-338

- Lo, C.-F., Ho, C.-H., Peng, S.-E., Chen, C.-H., Hsu, H.-C., Chiu, Y.-L., Chang, C.-F., Liu, K.-F., Su, M.-S., Wang, C.-H., und Kou, G.-H.** (1996): White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimps, crabs and other arthropods. *Diseases of Aquatic Organisms* **27**, 215-225
- Lo, C.-F., Hsu, H.-C., Tsai, M.-F., Ho, C.-H., Peng, S. E., Kou, G.-H., und Lightner, D. V.** (1999): Specific genomic DNA fragment analysis of different geographical clinical samples of shrimp white spot syndrome virus. *Diseases of Aquatic Organisms* **35**, 175-185
- Lo, C.-F., Leu, J.-H., Ho, C.-H., Chen, C.-H., Peng, S.-E., Chen, Y.-T., Chou, C.-M., Yeh, P.-Y., Huang, C.-J., Chou, H.-Y., Wang, C.-H., und Kou, G.-H.** (1996): Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms* **25**, 133-141
- Loeffler, J., Hebart, H., Schumacher, U., Reitze, H., und Einsele, H.** (1997): Comparison of different methods for extraction of DNA of fungal pathogens from cultures and blood. *Journal of Clinical Microbiology* **35**, 3311-3312
- Macalacinski, G. M. und Freifelder, D.** (1998): Essentials of molecular biology. 3rd Edn. Jones and Bartlett Publishers Inc.: London
- Mannsfeld, W.** (1942): Die Krebspest im Generalbezirk Lettland in den Jahren 1924 - 1938. *Zeitschrift für Fischerei* **40**, 395-417
- Mao, Y. und Tylor, B. M.** (1991): Genome organization of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Experimental Mycology* **15**, 283-291
- Margulis, L., Corliss, J. O., Melkonian, M., und Chapman, D. J.** (1990): Handbook of Protoctista. Jones and Bartlett Publishers: Boston
- Margulis, L. und Schwartz, K. V.** (1988): The five kingdoms: an illustrated guide to the phyla of life on Earth. 2nd Edn. W. H. Freeman: San Francisco
- Martin, F. N. und Kistler, H. C.** (1990): Species-specific banding patterns of restriction endonuclease-digested mitochondrial DNA from genus *Pythium*. *Experimental Mycology* **14**, 32-46
- Martin, M. P. und Winka, K.** (2000): Alternative methods of extracting and amplifying DNA from lichens. *Lichenologist* **32**, 189-196
- Matthews, M. und Reynolds, J. D.** (1990): Laboratory investigations of the pathogenicity of *Aphanomyces astaci* for Irish freshwater crayfish. *Hydrobiologia* **203**, 121-126
- Matthews, M. und Reynolds, J. D.** (1992): Ecological impact of crayfish plague in Ireland. *Hydrobiologia* **234**, 1-6

- Min, J., Arganoza, M. T., Ohrnberger, J., Xu, C., und Akins, R. A.** (1994): Alternative methods of preparing whole-cell DNA from fungi for dot-blot, restriction analysis, and colony filter hybridization. *Analytical Biochemistry* **225**, 94-100
- Molina, F. I., Jong, S. C., und Ma, G.** (1995): Molecular characterization and identification of *Saprolegnia* by restriction analysis of genes coding for ribosomal RNA. *Antonie Van Leeuwenhoek* **68**, 65-74
- Mort-Bontemps, M. und Fèvre, M.** (1995) Electrophoretic karyotype of *Saprolegnia monoica*. *FEMS Microbiology Letters* **131**, 325-328
- Möller, E. M., Bahnweg, G., Sandermann, H., und Geiger, H. H.** (1994): A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research* **22**, 6115-6116
- Mullis, K. B. und Faloona, F. A.** (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **51**, 263-273
- Mullis, K. B. und Faloona, F. A.** (1987): Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* **155**, 335-350
- Müller, E. und Löffler, W.** (1992): Mykologie - Grundriß für Naturwissenschaftler und Mediziner. Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York
- NCBI GENBANK:**
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Newton, C. R. und Graham, A.** (1994): PCR. Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, Oxford
- Ninni, A. P.** (1865): Sulla mortalita dei gambari (*Astacus fluviatilis* L.) nel veneto e piu particolarmente nella provincia trevigiana. *Atti Istituto Veneto* **3**, 1203-1209
- Nybelin, O.** (1934). Nya undersokningar över kraftpestens orsak. *Ny Svensk Fiskeritidskrift* (1934), 110-114.
- Nybelin, O.** (1936): Untersuchungen über die Ursache der in Schweden gegenwärtig vorkommenden Krebspest. *Mitteilungen der Anstalt für Binnenfischerei* **9**, 3-29. Drottningholm, Stockholm.
- Nyhlén, L. und Unestam, T.** (1975): Ultrastructure of the penetration of the crayfish integument by the fungal parasite, *Aphanomyces astaci*, Oomycetes. *Journal of Invertebrate Pathology* **26**, 353-366
- Nyhlén, L. und Unestam, T.** (1978) Cyst and germ tube wall structure in *Aphanomyces astaci*, Oomycetes. *Canadian Journal of Microbiology* **24**, 1296-1299

- Nyhlén, L. und Unestam, T.** (1980): Wound reactions and *Aphanomyces astaci* growth in crayfish cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology* **36**, 187-197
- O.I.E.** (Office International des Epizooties) (2001):
<http://www.oie.int/>
- Oidtmann, B., Bausewein, S., Hölzle, L., Hoffmann, R., und Wittenbrink, M.** (2002): Identification of the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci* by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *Veterinary Microbiology* **85**, 183-194
- Oidtmann, B., Cerenius, L., Schmidt, I., Hoffmann, R., und Söderhäll, K.** (1999): Crayfish plague epizootics in Germany - classification of two German isolates of the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci* by random amplification of polymorphic DNA. *Diseases of Aquatic Organisms* **35**, 235-23
- Oidtmann, B., El-Matbouli, M., Fischer, H., Hoffmann, R. W., und Schmidt, R.** (1997): Light microscopy of physiological conditions in noble crayfish (*Astacus astacus* L.) and selected pathological conditions. *Freshwater Crayfish* **XI**, 465-480
- Oidtmann, B., Heitz, E., und Hoffmann, R. W.** (2001): Zur Bedeutung von Fischen bei der Übertragung der Krebspest (*Aphanomyces astaci*, Oomycetes). In: *Fischkrankheiten. EAFF-Schrift zur VIII. Tagung der Deutschen Sektion der European Association of Fish Pathologists (EAFF) am 19.-21. September 2000 in Potsdam, Brandenburg.* 119-122
- Oidtmann, B. und Hoffmann, R. W.** (1998): Die Krebspest. In: *Flusskrebse Österreichs.* (Eds. E. Eder und W. Hödl). 187-195. Gutenberg: Linz
- Oidtmann, B., Klärding, K., und Hoffmann, R. W.** (1996): Pathologie und Diagnose der Krebspest. In: *Berichte der Tagung der Fachgruppe für Fischkrankheiten der DVG.* 252-258
- Oidtmann, B., Schmid, I., Rogers, D., und Hoffmann, R. W.** (1999): An improved isolation method for the cultivation of the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*. *Freshwater Crayfish* **XII**, 303-312
- Olson, L. W., Cerenius, L., Lange, L., und Söderhäll, K.** (1984): The primary and secondary spore cyst of *Aphanomyces* (Oomycetes, Saprolegniales). *Nordic Journal of Botany* **4**, 681-696
- Patterson, D. J.** (1989): Stramenopiles: chromophytes from a protistan perspective. In: *The chromophyte algae problems and perspectives.* (Eds. J. C. Green, B. S. C. Leadbeater und W. L. Diver). 357-379. Clarendon Press: Oxford
- Patterson, D.J. und Sogin, M.L.** (2000):
<http://phylogeny.arizona.edu/tree/eukaryotes/eukaryotes.html>

- Pääbo, S.** (1990): Amplifying ancient DNA. In: PCR protocols: a guide to methods and applications. (Eds. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky und T. J. White). 159-166. Academic Press: San Diego
- Pekny, R. und Pöckl, M.** (2000): Flusskrebse und Süßwassergarnelen (*Decapoda, Mysidacea*). In: Rote Liste ausgewählter Tiergruppen Niederösterreichs. 34-76. Amt der Niederösterreichischen Landesregierung: St. Pölten
- Persson, M., Häll, L., und Söderhäll, K.** (1984): Comparison of peptidase activities in some fungi pathogenic to arthropods. *Journal of Invertebrate Pathology* **44**, 342, 347-348
- Persson, M. und Söderhäll, K.** (1986): CaCl₂-induced germination and peptidase secretion in *Aphanomyces astaci*. *Experimental Mycology* **10**, 205-213
- Phillipson, S.** (2000). Flußkrebse in Baden-Württemberg: Verbreitung, Gefährdung, Schutz. Langanargen, Fischereiforschungsstelle Baden-Württemberg.
- Porteous, L. A., Armstrong, J. L., Seidler, R. J., and Watrud, L. S.** (1994): An effective method to extract DNA from environmental samples for polymerase chain reaction amplification and DNA fingerprint analysis. *Current Microbiology* **29**, 301-307
- Pöckl, M.** (1998): Funktionelle Morphologie und Anatomie der Flusskrebse. In: Flusskrebse Österreichs. (Eds. E. Eder und W. Hödl). Stapfia 58, zugleich Kataloge des Österreichischen Landesmuseums: Gutenberg, Linz
- Radford, A. und Parish, J. H.** (1997): The genome and genes of *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* **21**, 258-266
- Rantamäki, J., Cerenius, L., und Söderhäll, K.** (1992): Prevention of transmission of the crayfish plague fungus (*Aphanomyces astaci*) to the freshwater crayfish *Astacus astacus* by treatment with MgCl₂. *Aquaculture* **104**, 11-18
- Rasmussen, R. und Reed, G.** (1992): Optimizing rapid cycle DNA amplification reactions. *Rapid Cyclist* **1**, 1-8
- Renner, M.** (1989): Kükenthals Leitfaden für das zoologische Praktikum. Gustav Fischer Verlag: Stuttgart
- Rennerfelt, E.** (1936): Untersuchungen über die Entwicklung und Biologie des Krebspestpilzes *Aphanomyces astaci* Schikora. *Mitteilungen der Anstalt für Binnenfischerei* **10**, 1-21. Drottningholm, Stockholm
- Riethmüller, A., Weiß, M., und Oberwinkler, F.** (1999): Phylogenetic studies of Saprolegniomycetidae and related groups based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Canadian Journal of Botany* **77**, 1790-1800
- Rolfs, M., Schuller, I., Finckh, U., und Weber-Rolfs, I.** (1992): PCR: Clinical diagnostics and research. Springer Verlag: Berlin, Heidelberg, New York

- Ross, I.** (1995): Non-grinding method of DNA isolation from human pathogenic filamentous fungi using Xanthogenates. *BioTechniques* **18**, 828-830
- Roux, K. H.** (1995): Optimization and troubleshooting in PCR. *PCR Methods and Applications* **4**, 185-194
- Rozman, D. und Komel, R.** (1994): Isolation of genomic DNA from filamentous fungi with high glucan level. *BioTechniques* **16**, 382-384
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., und Erlich, H. A.** (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., und Arnheim, N.** (1985): Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., und Maniatis, T. E.** (1989): Molecular cloning - a laboratory manual. 2nd Edn. Cold Spring Harbour Laboratory Press: New York
- Sandhu, G. S., Kline, B. C., Stockman, L., und Roberts, G. D.** (1995): Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *Journal of Clinical Microbiology* **33**, 2913-2919
- Schäperclaus, W.** (1928): Wieder ein pestartiges Krebssterben in der Mark. *Mitteilungen der Fischerei-Vereine für die Provinz Brandenburg* **20**, 76-78
- Schäperclaus, W.** (1935): Die Ursache des pestartigen Krebssterben. *Zeitschrift für Fischerei und deren Hilfswissenschaften* **33**, 343-366
- Schäperclaus, W.** (1991): Fish Diseases (Fischkrankheiten), Volume 2. 5th Edn. Amerind Publishing Co. Pvt. Ltd.: New Delhi
- Schikora, F.** (1903): Über die Krebspest und ihren Erreger. *Allgemeine Fischerei-Zeitung* **6**, 353-355
- Schikora, F.** (1906): Die Krebspest. *Fischerei-Zeitung* **9**, 529-532, 549-553, 561-566, 581-583
- Schilling, A. G., Moller, E. M., und Geiger, H. H.** (1996): Polymerase chain reaction-based assays for species-specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* and *F. avenaceum*. *Phytopathology* **86**, 515-522
- Schmid, I.** (1998): Untersuchungen zur Diagnose und Differentialdiagnose des Krebspesterregers *Aphanomyces astaci* (Oomycetes) bei Edelkrebsen (*Astacus astacus* L.). Diss. med. vet., LMU München
- Scholtz, G.** (1999): Freshwater crayfish evolution. *Freshwater Crayfish* **XII**, 37-48

- Schubert, R., Bahnweg, G., Nechwatal, J., Jung, T., Cooke, D. E. L., Duncan, J. M., Müller-Starck, G., Langebartels, C., und Sandermann Jr., H.** (1999): Detection and quantification of *Phytophthora* species which are associated with root-rot diseases in European deciduous forests by species-specific polymerase chain reaction. *European Journal of Forest Pathology* **29**, 169-188
- Schweng, E.** (1973): *Orconectes limosus* in Deutschland. *Freshwater Crayfish I*, 79-87
- Scott, W. W.** (1961): A monograph of the genus *Aphanomyces*. Virginia Agricultural Experimental Station Technical Bulletin **151**, 1-95. Virginia Agricultural Experimental Station, Blacksburgh
- Seegert, A.** (1997): Krankheiten der Flußkrebse - Eine Literaturstudie. Diss. med. vet., LMU München
- Skurdal, J., Qvenild, T., Taugbøl, T., und Gamas, E.** (1993): Long term study of exploitation, yield and stock structure of noble crayfish *Astacus astacus* in Lake Steinsfjorden, S.E. Norway. *Freshwater Crayfish IX*, 118-133
- Smith, V. J. und Chisholm, J. R. S.** (1992): Review: Non-cellular immunity in crustaceans. *Fish and Shellfish Immunology* **2**, 1-31
- Smith, V. J. und Söderhäll, K.** (1984): Crayfish pathology: an overview. *Freshwater Crayfish VI*, 199-211
- Sogin, M. L.** (1989): Evolution of eukaryotic microorganisms and their small subunit RNAs. *American Zoologist* **29**, 487-499
- Sommer, R. und Tautz, T.** (1989): Minimal homology requirements for PCR primers. *Nucleic Acids Research* **17**, 6749.
- Söderhäll, K.** (1981): Fungal cell wall β -1,3 -glucan induce clotting and phenoloxidase attachment to foreign surfaces of crayfish haemocyte lysate. *Developmental and Comparative Immunology* **5**, 565-573
- Söderhäll, K.** (1988): Fungal parasites and other diseases on freshwater crayfish. In: Rapautlous 222. Keskis-Soumen Kalastuspiirin Kalastumoimisto Tiedros nro. 5. (Eds. J. Kovanen und R. Lappalainen). 23-46. Jyväskylä, Finland
- Söderhäll, K. und Cerenius, L.** (1983): Protein and nucleic acid synthesis during germination of the asexual spores of the aquatic fungus, *Aphanomyces astaci*. *Physiologia Plantarum* **58**, 13-17
- Söderhäll, K. und Cerenius, L.** (1987): Controlled growth and development in filamentous Oomycetes with special emphasis on *Aphanomyces* spp. In: Zoosporic Fungi in Teaching and Research. (Eds. M. S. Fuller und A. Jaworski). South Eastern Publishing Corp.: Athens

- Söderhäll, K. und Cerenius, L.** (1992): Crustacean immunity. *Annual Review of Fish Diseases* **2**, 3-23
- Söderhäll, K. und Cerenius, L.** (1998): Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology* **10**, 23-28
- Söderhäll, K. und Cerenius, L.** (1999): The Crayfish Plague Fungus: History and Recent Advances. *Freshwater Crayfish* **XII**, 11-35
- Söderhäll, K., Cerenius, L., und Johansson, M. W.** (1994): The prophenoloxidase activating system and its role in invertebrate defence. *Annals of the New York Academy of Sciences* **712**, 155-161
- Söderhäll, K. und Häll, L.** (1984): Lipopolysaccharide - induced activation of prophenoloxidase activation system in crayfish haemocyte lysate. *Biochemical and Biophysical Acta* **797**, 99-104
- Söderhäll, K., Johansson, M. W., und Smith, V. J.** (1988): Internal Defence Mechanisms. In: *Freshwater crayfish - biology, management and exploitation.* (Eds. D. M. Holdich und R. S. Lowery). 213-35. Croom Helm Ltd.: London
- Söderhäll, K., Svensson, E., und Unestam, T.** (1978): Chitinase and protease activities in germinating zoospore cysts of a parasitic fungus, *Aphanomyces astaci*, Oomycetes. *Mycopathologia* **64**, 9-11
- Söderhäll, K. und Unestam, T.** (1975): Properties of extracellular enzymes from *Aphanomyces astaci* and their relevance in the penetration process of crayfish cuticle. *Physiologia Plantarum* **35**, 140-146
- Söderhäll, K., Wingren, A., Johansson, M. W., und Bertheussen, K.** (1985): The cytotoxic reaction from the freshwater crayfish, *Astacus astacus*. *Cellular Immunology* **94**, 326-348
- Sritunyalucksana, K. und Söderhäll, K.** (2000): The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture* **191**, 53-69
- Streißl, F., Chovanec, A., und Käfel, G.** (1998): Flußkrebse als Bioindikatoren? In: *Flußkrebse Österreichs - Stapfia 58.* (Eds. E.Eder und W.Hödl). 225-32
- Stryer, L.** (1996): *Biochemie.* 4. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag GmbH: Heidelberg, Berlin, New York
- Svensson, E. und Unestam, T.** (1975): Differential induction of zoospore encystment and germination in *Aphanomyces astaci*, Oomycetes. *Physiologia Plantarum* **35**, 210-216
- Thiele, D.** (1991): Die "Polymerase Chain Reaction" (PCR) und ihre Anwendungsmöglichkeiten. *Immunität und Infektion* **19**, 138-142

- Tooley, P. W., Bunyard, B. A., Carras, M. M., und Hatziloukas, E.** (1997): Development of PCR primers from internal transcribed spacer region 2 for detection of *Phytophthora* species infecting potatoes. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 1467-1475
- Tooley, P. W. und Carras, M. M.** (1992): Separation of chromosomes of *Phytophthora* species using CHEF gel electrophoresis. *Experimental Mycology* **16**, 188-196
- Tooley, P. W., Carras, M. M., und Falkenstein, K. F.** (1996): Relationships among group IV *Phytophthora* species inferred by restriction analysis of the ITS2 region. *Journal of Phytopathology* **144**, 363-369
- Troschel, H. J.** (1997): In Deutschland vorkommende Flusskrebse: Biologie, Verbreitung und Bestimmungsmerkmale. *Fischer und Teichwirt* **9**, 370-376
- Tuusti, J., Paaver, T., und Reier, A.** (1993): Status of the noble crayfish (*Astacus astacus*) stocks in Estonia. *Freshwater Crayfish* **IX**, 163-169
- Unestam, T.** (1965): Studies on the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci*: I. Some factors affecting growth in vitro. *Physiologia Plantarum* **18**, 483-505
- Unestam, T.** (1966a): Studies on the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci*: II. Factors affecting zoospores and zoospore production. *Physiologia Plantarum* **19**, 1110-1119
- Unestam, T.** (1966b): Chitinolytic, cellulolytic, and pectinolytic activity in vitro of some parasitic and saprophytic oomycetes. *Physiologia Plantarum* **19**, 15-30
- Unestam, T.** (1969a): On the adaptation of *Aphanomyces astaci* as a parasite. *Physiologia Plantarum* **22**, 221-235
- Unestam, T.** (1969b): On the physiology of zoospore production in *Aphanomyces astaci*. *Physiologia Plantarum* **22**, 236-245
- Unestam, T.** (1969c): Resistance to the crayfish plague fungus in some American, Japanese and European crayfish. *Reports from the Institute of Freshwater Research Drottningholm* **49**, 202-209
- Unestam, T.** (1972): On the host range and origin of the crayfish plague fungus. *Reports from the Institute of Freshwater Research Drottningholm* **52**, 192-198
- Unestam, T.** (1973): Significance of diseases on freshwater crayfish. *Freshwater Crayfish* **I**, 136-150
- Unestam, T.** (1975): Defence reactions in and susceptibility of Australian and New Guinean freshwater crayfish to European-crayfish-plague fungus. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science* **53**, 349-359

- Unestam, T.** (1981): Fungal diseases of freshwater and terrestrial crustacea. In: Pathogenesis of invertebrate microbial diseases. (Ed. E. W. Davidson). 485-507 Allanheld, Osmun & Co: New Jersey
- Unestam, T. und Ajaxon, R.** (1978): The crayfish plague fungus, the ecological niche of a specialized fungus and the fate of the fungus in the crayfish host (16 mm Film, sound 35 min). *Freshwater Crayfish IV*, 399-402
- Unestam, T. und Weiss, D. W.** (1970): The host-parasite relationship between freshwater crayfish and the crayfish disease fungus *Aphanomyces astaci*: Responses to infection by a susceptible and a resistant species. *Journal of General Microbiology* **60**, 77-90
- Van de Peer, Y. und De Wachter, R.** (1997): Evolutionary relationships among the eukaryotic crown taxa taking into account site-to-site rate variation in 18S rRNA. *Journal of Molecular Evolution* **45**, 619-630
<http://www-rrna.uia.ac.be/trees/>
- Van de Peer, Y., van der Auwera, G., und De Wachter, R.** (1996): The evolution of Stramenopiles und Alveolates as derived by "substitution rate calibration" of small ribosomal subunit RNA. *Journal of Molecular Evolution* **42**, 201-210
- Van der Auwera, G., Chapelle, S., und De Wachter, R.** (1994): Structure of the large ribosomal subunit RNA of *Phytophthora megasperma*, and phylogeny of the Oomycetes. *FEBS Letters* **338**, 133-136
- Vennerström, P., Söderhäll, K., und Cerenius, L.** (1998): The origin of two crayfish plague (*Aphanomyces astaci*) epizootics in Finland on noble crayfish, *Astacus astacus*. *Annales Zoologici Fennici* **35**, 43-46
- Voglmayr, H. und Greilhuber, J.** (1998): Genome size and determination in Peronosporales (Oomycota) by Feulgen Image Analysis. *Fungal Genetics and Biology* **25**, 181-195
- Von Lukowicz, M.** (1999): Freshwater crayfish in the fishery legislation of the federal states (Bundesländer) of Germany. *Freshwater Crayfish XII*, 890-898
- Waggoner, B. und Speer, B. R.** (1999):
<http://www.ucmp.berkeley.edu/chromista/chromistasy.html>
- Walker, W. F. und Doolittle, W. F.** (1982): Nucleotide sequences of 5S ribosomal RNA from four oomycete and chytrid water molds. *Nucleic Acids Research* **10**, 5717-5721
- Webster, J.** (1980): Introduction to fungi. 2nd Edn. Cambridge University Press: London, New York
- Weiland, J. J. und Sundsbak, J. L.** (2000): Differentiation and detection of sugar beet fungal pathogens using PCR amplification of actin coding sequences and the ITS region of the rRNA gene. *Plant Disease* **84**, 475-482

- Welsh, J. und McClelland, M.** (1990): Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* **18**, 7213-7218
- Westman, K.** (1991): The crayfish fishery in Finland: its past, present and future. *Finnish Fisheries Research* **12**, 187-216
- Westman, K. und Nylund, V.** (1979): Crayfish plague, *Aphanomyces astaci*, observed in the European crayfish, *Astacus astacus*, in Pihlajavesi waterway in Finland. A case study on the spread of the plague fungus. *Freshwater Crayfish IV*, 419-26
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. B., und Taylor, J. W.** (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols: a guide to methods and applications. (Eds. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky und T. J. White). 315-22. Academic Press: San Diego, CA
- Whittaker, R. H.** (1959): On the broad classification of organisms. *Quarterly Review of Biology* **34**, 210-226
- Whittaker, R. H.** (1969): New concepts of kingdoms of organisms. *Science* **163**, 150-160
- Williams, J. F.** (1989): Optimization strategies for the Polymerase Chain Reaction. *BioTechniques* **7**, 762-768
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., und Tingey, S. V.** (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18**, 6531-6535
- Wu, D. Y., Ugozzoli, L., Pal, B. K., Qian, J., und Wallace, R. B.** (1991): The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA and Cell Biology* **10**, 233-238
- Zhang, D., Yang, Y., Castlebury, L. A., und Cerniglia, C. E.** (1996): A method for the large scale isolation of high transformation efficiency fungal genomic DNA. *FEMS Microbiology Letters* **145**, 261-265
- Zhu, H., Qu, F., und Zhu, L.-H.** (1993): Isolation of genomic DNA from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. *Nucleic Acids Research* **21**, 5279-5280

2. Rechtsvorschriften

EU Richtlinie 91/67/EWG vom 28. Januar 1991 bezüglich der tierseuchenrechtlichen Vorschriften für die Vermarktung von Tieren und anderen Erzeugnissen der Aquakultur

Fischereigesetz für Bayern (FiG), vom 19. August 1908 (BayRS 793-1-E), zuletzt geändert durch Gesetz vom 24. Juli 1998 (GVBl S. 470). 1998

Gesetz über Naturschutz und Landschaftspflege (Bundesnaturschutzgesetz - BNatSchG), Fassung vom 21. September 1998, BGBl S. 2994. 1998

Verordnung zur Ausführung des Fischereigesetzes für Bayern (AVFiG), vom 4. November 1987 (GVBl S. 404, BayRS 793-3-E), zuletzt geändert durch Verordnung vom 3. Dezember 1998 (GVBl S. 982). 1998

Verordnung zum Schutz gegen Süßwasserfischseuchen, Muschelkrankheiten und zur Schaffung seuchenfreier Fischhaltungsbetriebe und Gebiete (Fischseuchenverordnung) Fassung vom 17. August 1998, BGBl I S. 2175. 1998

Verordnung zum Schutz wildlebender Tier- und Pflanzenarten (Bundesartenschutzverordnung - BArtSchV) vom 19. Dezember 1986, BGBl I S. 2705, zuletzt geändert durch Verordnung vom 6. Juni 1997, BGBl I S. 1327. 1997

VII. Anhang**Abbildung 61: Alignment zur Konstruktion der Primer**

Die nicht kodierenden Regionen ITS 1 und ITS 2 sind mit Kleinbuchstaben, der kodierende 5.8S-Bereich mit Großbuchstaben dargestellt. Das Alignment beginnt mit der ersten Base der ITS-Region. Die zum Primer-Design berücksichtigten Aphanomyces-Sequenzen sind markiert (hellgrau unterlegt bzw. **fettgedruckt**).

Die Benennung der neu konstruierten Primer (NS) Primer erfolgte nach der Lage ihres 3'-Endes innerhalb der ITS-Region. Die Nummerierung der Basen bezieht sich auf den Referenzstamm M96/1.

	1	43
<i>Aph. astaci</i> M96/1	ccacaccaaaaaaac.tatccacgtgaa.tgtatt..ctt.tataag.....gc	
<i>Aph. astaci</i> FDL457	ccacaccaaaaaaac.tatccacgtgaa.tgtatt..ctt.tataag.....gc	
<i>Aph. astaci</i> Li	ccacaccaaaaaaac.tatccacgtgaa.tgtatt..ctt.tataag.....gc	
<i>Aph. laevis</i>	ccacaccaaaaaaaaatataccacgtgaa.ggtatt..ctt.tatgaa.....gc	
<i>Aph. helicoides</i>	ccacaccaaaaaaaaatataccacgtgaa.ggtatt..ctt.tatgaa.....gc	
<i>Aph. stellatus</i>	ccacaccaaaaaaaat.atccacgtgaa.tgtact..ctt.tatgaa.....g.	
<i>Sapr. parasitica</i>	ccacaccaataaact.atccacgtgaa.cgtata..ctt.tatgaa.....g.	
<i>Sapr. litoralis</i>	ccacaccaaaaaaaca.cccacgtgaa.tgtact..ctt.tatgaa.....g.	
<i>Leptolegnia</i> sp.	ccacaccaaaaaaaca.cccacgtgaa.cgtata..ctt.tatgaa.....g.	
<i>Achlya bisex</i> . AF218151	ccacaccaaaaaaatatcc.acgtgaa.tgtatt..ctt.tatgaa.....gc	
<i>Achlya dubia</i> AF218155	ccacaccaaaaaaatatcc.acgtgaa.tgtatt..ctt.tatgaa.....gc	
<i>Achlya klebsi</i> . AF218156	ccacaccaaaaaaatatccacgtgaa.tgtata..ctt.tatgaa.....gc	
<i>Achlya prolif</i> . AF218154	ccacaccaaaaaaatatcc.acgtgaa.tgtatt..ctt.tatgaa.....gc	
<i>Peronospora sparsa</i> AF266783	ccacacctaataaaactttccacgtgaaaccgtatcaaccaacataa.ttgagggt.ttat	
<i>Phytoph. drechsl</i> . AF266798	ccacacctaataaaactt.cacgtgaaaccgtatcaacctttttaaattgggggctt...	
<i>Phytoph. infes</i> . AF266779	ccacacctaataaaa.ctttccacgtgaaaccgtttcaacca.atag.ttgagggtcttac	
<i>Phytoph. sp.</i> AF087474	ccacacctaataaaactttccacgtgaaaccgtatcaaccaagt...agtgggggctgct	
<i>Pythium grami</i> . AF271229	ccacaccataaaa.ctttccacgtgaaaccgt.....tacaattatggt	
<i>Pythium porph</i> . AB043506	ccacaccaaaaaaactttccacgtgaaaccgt.....tgaaaatggtt	
<i>Pythium undul</i> . AF271230	ccacacc..aaaaaactttccacgtgaaactgt.....cattg.catggt	
	44	73
<i>Aph. astaci</i> M96/1	ttgtgct.....tgaggat....gttctt.....cgggacgaccc.....	
<i>Aph. astaci</i> FDL457	ttgtgct.....tg.ggat....gttctt.....cgggacgaccc.....	
<i>Aph. astaci</i> Li	ttgtgct.....tg.ggat....gttctt.....cgggacgaccc.....	
<i>Aph. laevis</i>	c.acgt.....caag.....ctt.....tgacctg...c.....	
<i>Aph. helicoides</i>	c.acgt.....caag.....ctt.....tgacctg...c.....	
<i>Aph. stellatus</i>	...gt.....ttgtgctt...gctctt.....c.ggag...t.....	
<i>Sapr. parasitica</i>	...gt.....ttgtgctt...gctctt.....c.ggag...t.....	
<i>Sapr. litoralis</i>	...gc.....ttgagct...gacctt.....gtg...g...c.....	
<i>Leptolegnia</i> sp.	...gt.....tcgagct...gacctt.....gtg...g...c.....	
<i>Achlya bisex</i> . AF218151	tt.cgt.....gct....acctt.....gtgt.agct.....	
<i>Achlya dubia</i> AF218155	tt.gct.....gctt...gacctt.....gtgctgggct.....	
<i>Achlya klebsi</i> . AF218156	tt.gct.....gctt...gacctt.....gtgctgggct.....	
<i>Achlya prolif</i> . AF218154	tt.cgt.....gct....acctt.....gtgt.agct.....	
<i>Peronospora sparsa</i> AF266783	ttg.gcgcc.ggctgctggcatttt.gtgct.ggctggctgctactgggcaagccctatc	
<i>Phytoph. drechsl</i> . AF266798	ccgtctggccggcccg.....gttctcggtggctgg...gtggcg.cctctatc	
<i>Phytoph. infes</i> . AF266779	ttg.gcgcc.ggctgctggcatttt.tgc.tggc.ggctactgctggcgagccctatc	
<i>Phytoph. sp.</i> AF087474	ctgtgtggctgtctgtcgatgtcaaagtcgctggctggctgtgtggcgggctctatc	
<i>Pythium grami</i> . AF271229	ctgt...gctgtctctcgggat.....ggctgaaacg...aaggtggc.tgca	
<i>Pythium porph</i> . AB043506	ctgt...gct.cctctcgggg.....agctgaaacg...aaggtgagc.tgct	
<i>Pythium undul</i> . AF271230	ttgt...gaccttaattagg.....ctaacg...aaggtcg...a	

74 123

Aph. astaci M96/1
Aph. astaci FDL457
Aph. astaci Li
Aph. laevis
Aph. helicoides
Aph. stellatus
Sapr. parasitica
Sapr. litoralis
Leptolegnia sp.
Achlya bisex. AF218151
Achlya dubia AF218155
Achlya klebsi. AF218156
Achlya prolif. AF218154
Peronospora sparsa AF266783
Phytoph. drechsl. AF266798
Phytoph. infes. AF266779
Phytoph. sp. AF087474
Pythium grami. AF271229
Pythium porph. AB043506
Pythium undul. AF271230

124 NS 166 NS 170 171

Aph. astaci M96/1
Aph. astaci FDL457
Aph. astaci Li
Aph. laevis
Aph. helicoides
Aph. stellatus
Sapr. parasitica
Sapr. litoralis
Leptolegnia sp.
Achlya bisex. AF218151
Achlya dubia AF218155
Achlya klebsi. AF218156
Achlya prolif. AF218154
Peronospora sparsa AF266783
Phytoph. drechsl. AF266798
Phytoph. infes. AF266779
Phytoph. sp. AF087474
Pythium grami. AF271229
Pythium porph. AB043506
Pythium undul. AF271230

172 231

Aph. astaci M96/1
Aph. astaci FDL457
Aph. astaci Li
Aph. laevis
Aph. helicoides
Aph. stellatus
Sapr. parasitica
Sapr. litoralis
Leptolegnia sp.
Achlya bisex. AF218151
Achlya dubia AF218155
Achlya klebsi. AF218156
Achlya prolif. AF218154
Peronospora sparsa AF266783
Phytoph. drechsl. AF266798
Phytoph. infes. AF266779
Phytoph. sp. AF087474
Pythium grami. AF271229
Pythium porph. AB043506
Pythium undul. AF271230

	531		579
<i>Aph. astaci</i> M96/1	.cggcacgggt...gaacaacat.at.tgcttt...ttagtgcgtctggaagaggttt		
<i>Aph. astaci</i> FDL457	.cggcacgggt...gaacaacat.at.tgcttt...ttagtgcgtctggaagaggttt		
<i>Aph. astaci</i> Li	.cggcacgggt...gaacaacat.at.tgcttt...ttagtgcgtctggaagaggttt		
<i>Aph. laevis</i>	.cggcacgggt...ggaca.tgt.at.tgcatt...tgaattcagagtgaggattttt		
<i>Aph. helicoides</i>	.cggcacgggt...ggaca.tgt.at.tgcatt...tgaattcagagtgaggattttt		
<i>Aph. stellatus</i>	.cggtacaggt...gaacaacat.at.tgcttt...ttgtttt.tttggaagggttg.		
<i>Sapr. parasitica</i>	.cggtgacaggt...gaactcgtgttat.tgcttt...ttgttct.tttggaaggcccc		
<i>Sapr. litoralis</i>	.cggtacaggt...ggac.acat.at.tgcttt...ttgtgat.ttctgcgagctctgt		
<i>Leptolegnia</i> sp.	.cggtacaggt...agac.atat.at.tgcttt...ttgtgat.ctcggcgagctctgt		
<i>Achlya bisex</i> AF218151	...gtacaggt...gaacaatat.at.tgcttt...ttgttttact..gtagatgtgt		
<i>Achlya dubia</i> AF218155	...gtacaagt...gaacaatat.at.tgcttt...ttgttttact..gtagatgtgt		
<i>Achlya klebsi</i> AF218156	...gtacaagt...gaacaatat.at.tgcttt...ttgttttact..gtagatgtgt		
<i>Achlya prolif.</i> AF218154	...gtacaggt...gaacaatat.at.tgcttt...ttgttttact..gtagatgtgt		
<i>Peronospora sparsa</i> AF266783	acag.gc.gcttattggagctt.ctttctgctatggc...ggatggactgatgaaccgt		
<i>Phytoph. drechsl.</i> AF266798	acag.ac.gcttattgggtgct.tttctgctgctggc...ggatggactggatgaaccgt		
<i>Phytoph. infes.</i> AF266779	acaatgc.gcttattgggtgat.tttctgctgctggc...gtgatggactggatgaaccat		
<i>Phytoph. sp.</i> AF087474	acaatgc.gcttattggatgct.tttctgctgctggc...ggatggactggatgaaccgt		
<i>Pythium grami</i> AF271229	actttgcagctgacagtgctgattttctgttctttcttgaggtgacactgt...ttgt		
<i>Pythium porph.</i> AB043506	actttgcagctgacagtgctgattttctgttctttcttgaggtgacactgaaaatagt		
<i>Pythium undul.</i> AF271230	acaatgttgccttattgtgcgttggt.ctgtttttactcttgaggtta...ccattatttgt		
	BO 640		
	580		630
<i>Aph. astaci</i> M96/1	gta.g.ttgaaggcagaatgcccagtcgg...atagtatg.gt.ctggtgtgctt..gtg		
<i>Aph. astaci</i> FDL457	gtaag.ttgaaggcagaatgcccagtcgg...atagtatg.gt.ctggtgtgctt..gtg		
<i>Aph. astaci</i> Li	gta.g.ttgaaggcagaatgcccagtcgg...atagtatg.gt.ctggtgtgctt..gtg		
<i>Aph. laevis</i>	gtga..ttgtggatgaaata.ggagcaag...agagggcagct.ctggtgtattctaattg		
<i>Aph. helicoides</i>	gtga..ttgtggatgaaata.ggagcaag...agagggcagct.ctggtgtattctaattg		
<i>Aph. stellatus</i>	gtac..tagaagacagaatgctgtttaa...ataatatatg..ctggtgc.atttcttg		
<i>Sapr. parasitica</i>	gtgt..ttgatcgctggattcaatttctga...gttgtacgta..ctggtgc.atttcttg		
<i>Sapr. litoralis</i>	.tgt..ttaagcacaggacacgtaaggag...agtgagtatg..ctggtgctatttcttg		
<i>Leptolegnia</i> sp.	.tgt..ttaagcccaggcgcgtttctgag...agcttgcagc..ctggtgc.acttcttg		
<i>Achlya bisex</i> AF218151	gtat..tgaagataaagataaagaagtttat.aatggtatatac.tgggtttgtttctgta		
<i>Achlya dubia</i> AF218155	gtat..tgaagataaagataaagaagtttat.aatggtatatac.tgggtt.gtttctgta		
<i>Achlya klebsi</i> AF218156	gtat..tgaagataaagataaagaagtttat.aatggtatatac.tgggtt.gtttctgta		
<i>Achlya prolif.</i> AF218154	gtat..tgaagataaagataaagaagtttat.aatggtatatac.tgggtttgtttctgta		
<i>Peronospora sparsa</i> AF266783	a...gctatgctgtgact...tggcttttgaattg..gctttgctgttgccaagtagag		
<i>Phytoph. drechsl.</i> AF266798	a...gctgtgcta.ggct...tggcgtttgaaccg..gcccgtattgt.gccaagttaggg		
<i>Phytoph. infes.</i> AF266779	g...gct...ctttgct...tggcatttgaatcg..gctttgctgttgccaagtagag		
<i>Phytoph. sp.</i> AF087474	a...gctgtgca.ggct...tggcttttgaaccg..gcccgtgtgttgccaagtaggg		
<i>Pythium grami</i> AF271229	gtgaggcaatggtctagccaaatggttattgtgtagttaggtg.gttgctgctcttggcg		
<i>Pythium porph.</i> AB043506	gtgaggcaatggtctgggcaaatggttctgtgtagttagtag.gtcgctgctctggcagc		
<i>Pythium undul.</i> AF271230	gtgagatgtgtctaaggattgcttgcagtaagggtgtgacgcttgggtg		
	NS 681		
	631		686
<i>Aph. astaci</i> M96/1	tcta.tatggaagcaaatgggaaacaac..atccaatttggacc.tgatatcagacaag		
<i>Aph. astaci</i> FDL457	tcta.tatggaagcaaatgggaaacaac..atccaatttggaccatgatatcagacaag		
<i>Aph. astaci</i> Li	tcta.tatggaagcaaatgggaaacaac..atccaatttggacc.tgatatcagacaag		
<i>Aph. laevis</i>	acga.ggcgagaagtaaatgggaactaa...ttcaatttggacc.tgatatcagacaag		
<i>Aph. helicoides</i>	acga.ggcgagaagtaaatgggaactaa...ttcaatttggacc.tgatatcagacaag		
<i>Aph. stellatus</i>	atg..tatggaggaaaattgggaattat...atccaatttggacc.tgatatcaacaag		
<i>Sapr. parasitica</i>	gtg..tatggaggcaaatgggaaaca...atccaatttggacc.tgatatcaagcaag		
<i>Sapr. litoralis</i>	gctgctatggaggcaaatgggaattca...atccaatttggacc.tgatatcaacaag		
<i>Leptolegnia</i> sp.	cg..tacggaggcaaatgggaattca...atccaatttggacc.tgatatcaacaag		
<i>Achlya bisex</i> AF218151	gta..tatagaagcaaa.tgggaaat.at..atccaatttggacc.tgatatcaacaag		
<i>Achlya dubia</i> AF218155	gta..tatagaagcaaa.tgggaaat.at..atccaatttggacc.tgatatcaacaag		
<i>Achlya klebsi</i> AF218156	gta..tatagaagcaaa.tgggaaat.at..atccaatttggacc.tgatatcaacaag		
<i>Achlya prolif.</i> AF218154	gta..tatagaagcaaa.tgggaaat.at..atccaatttggacc.tgatatcaacaag		
<i>Peronospora sparsa</i> AF266783	tggcagtttcagct..gtcagaggt...cgaccatattgggaaattgtgctg...t		
<i>Phytoph. drechsl.</i> AF266798	tgtctgtctcggcgcaagctgggg...ggcgagggctcagccatttgggaaa.cgtt		
<i>Phytoph. infes.</i> AF266779	tggcggcttcgct..gcccaggg...cgatccat.ttgggaaa...tgttg...t		
<i>Phytoph. sp.</i> AF087474	tggcggcttcgct..gtcagaggt...cgatccatttgggaaactcgtgctgt.ctct		
<i>Pythium grami</i> AF271229	cctctc...gaggttaaagg..aggcaacac.caatttgggatttagtctgt..gga		
<i>Pythium porph.</i> AB043506	ctcttctc...gaggttaaagg..aggcaacac.caatttgggaccgtgatgctgggt		
<i>Pythium undul.</i> AF271230	ctgttttctggagcgggtgtgaggttagtgaaagcaaatgggaaatcttctgact		

Anhang

	687	NS 700	713
<i>Aph. astaci</i> M96/1	actaccgctg.	aatttaagcatatcaataagcgg	
<i>Aph. astaci</i> FDL457	actaccgctg.	aatttaagcatttcaa	
<i>Aph. astaci</i> Li	actaccgctg.	aatttaagcatatcaa	
<i>Aph. laevis</i>	actaccgctg.	aatttaagcatatcaa	
<i>Aph. helicoides</i>	actaccgctg.	aatttaagcatatcaa	
<i>Aph. stellatus</i>	actaccgctg.	aacttaagcatatcaa	
<i>Sapr. parasitica</i>	actaccgctg.	aacttaagcatatcaa	
<i>Sapr. litoralis</i>	actaccgctg.	aacttaagcatatcaa	
<i>Leptolegnia</i> sp.	actaccgctg.	aacttaagcatatcaa	
<i>Achlya</i> <i>bisex.</i> AF218151	attaccgc		
<i>Achlya</i> <i>dubia</i> AF218155	attac		
<i>Achlya</i> <i>klebsi.</i> AF218156	att		
<i>Achlya</i> <i>prolif.</i> AF218154			
<i>Peronospora</i> <i>sparsa</i> AF266783	gcggctt.	cggtcgtg.	tggcatctcaa
<i>Phytoph. drechsl.</i> AF266798	gtg.	tgcgcttcggcgt.	.gcacatctcaa
<i>Phytoph. infes.</i> AF266779	gta.	ctt.cgg.	. . . ta.tg.cacatctcaa
<i>Phytoph. sp.</i> AF087474	gcggcttgctgcggaggtggcatctcaa		
<i>Pythium</i> <i>grami.</i> AF271229	tttattcatgggcgc.	 ttttcaa.
<i>Pythium</i> <i>porph.</i> AB043506	tttactcagattgc.	att.	ctttcaat
<i>Pythium</i> <i>undul.</i> AF271230	gctatttttggttaattgtg.	tatctcaa	

Abbildung 62: Alignment aller bekannten Sequenzen der ITS-Region von *Aphanomyces astaci* (*A.a.*)-Stämmen (in Klammern Genotyp, OIDTMANN et al. 1999b) unter Kennzeichnung der Baseninsertionen (umrahmt) und der Primer NS 166, NS 170, BO 525, BO 640 und NS 681 (hellgrau unterlegt bzw. **fettgedruckt**); die Nummerierung bezieht sich auf den Referenzstamm M96/1.

	1		59	
<i>A.a.</i> Li (A)	CCACACCAAAAACTATCCACGTGAATGTATTCTTTATAAGGCTTGTGCTG . GGATGTT			
<i>A.a.</i> VL (A)	CCACACCAAAAA . CTATCCACGTGAATGTATTCTTTATAAGGCTTGTGCTG . GGATGTT			
<i>A.a.</i> Da (A)	AACTATCCACGTGAATGTATTCTTTATAAGGCTTGTGCTG . GGATGTT			
<i>A.a.</i> FDL457 (B)	CCACACCAAAAACTATCCACGTGAATGTATTCTTTATAAGGCTTGTGCTG . GGATGTT			
<i>A.a.</i> M96/1 (B)	CCACACCAAAAACTATCCACGTGAATGTATTCTTTATAAGGCTTGTGCTG AG GGATGTT			
<i>A.a.</i> Kv (C)	CCACACCAAAAA . CTATCCACGTGAATGTATTCTTTATAAGGCTTGTGCTG . GGATGTT			
<i>A.a.</i> Pc (D)	CCACACCAAAAACTATCCACGTGAATGTATTCTTTATAAGGCTTGTGCTG . GGATGTT			
<i>A.a.</i> E	CCACACCAAAAACTATCCACGTGAATGTATTCTTTATAAGGCTTGTGCTG . GGATGTT			
	60		119	
<i>A.a.</i> Li (A)	CTTCGGGACGACCCGGCTAGCAGAAGGTTTCG . CAAGAAGCCGATGTACTTTTAATCCCT			
<i>A.a.</i> VL (A)	CTTCGGGACGACCCGGCTAGCAGAAGGTTTCG . CAAGAAGCCGATGTACTTTTAATCCCT			
<i>A.a.</i> Da (A)	CTTCGGGACGACCCGGCTAGCAGAAGGTTTCG . CAAGAAGCCGATGTACTTTTAATCCCT			
<i>A.a.</i> FDL457 (B)	CTTCGGGACGACCCGGCTAGCAGAAGGTTTCG CA CAAGAAGCCGATGTACTTTTAATCCCT			
<i>A.a.</i> M96/1 (B)	CTTCGGGACGACCCGGCTAGCAGAAGGTTTCG . CAAGAAGCCGATGTACTTTTAATCCCT			
<i>A.a.</i> Kv (C)	CTTCGGGACGACCCGGCTAGCAGAAGGTTTCG . CAAGAAGCCGATGTACTTTTAATCCCT			
<i>A.a.</i> Pc (D)	CTTCGGGACGACCCGGCTAGCAGAAGGTTTCG . CAAGAAGCCGATGTACTTTTAATCCCT			
<i>A.a.</i> E	CTTCGGGACGACCCGGCTAGCAGAAGGTTTCG . CAAGAAGCCGATGTACTTTTAATCCCT			
	120	NS 166	NS 170	179
<i>A.a.</i> Li (A)	TCTTAAATAACATACTGATAAACTTAGCC CGTCAGAAATGATAGCTTGTAAATA AAAAATACAA			
<i>A.a.</i> VL (A)	TCTTAAATAACATACTGATAAACTTAGCC CGTCAGAAATGATAGCTTGTAAATA AAAAATACAA			
<i>A.a.</i> Da (A)	TCTTAAATAACATACTGATAAACTTAGCC CGTCAGAAATGATAGCTTGTAAATA AAAAATACAA			
<i>A.a.</i> FDL457 (B)	TCTTAAATAACATACTGATAAACTTAGCC CGTCAGAAATGATAGCTTGTAAATA AAAAATACAA			
<i>A.a.</i> M96/1 (B)	TCTTAAATAACATACTGATAAACTTAGCC CGTCAGAAATGATAGCTTGTAAATA AAAAATACAA			
<i>A.a.</i> Kv (C)	TCTTAAATAACATACTGATAAACTTAGCC CGTCAGAAATGATAGCTTGTAAATA AAAAATACAA			
<i>A.a.</i> Pc (D)	TCTTAAATAACATACTGATAAACTTAGCC CGTCAGAAATGATAGCTTGTAAATA AAAAATACAA			
<i>A.a.</i> E	TCTTAAATAACATACTGATAAACTTAGCC CGTCAGAAATGATAGCTTGTAAATA AAAAATACAA			
	180		239	
<i>A.a.</i> Li (A)	CTTTCAACAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACG			
<i>A.a.</i> VL (A)	CTTTCAACAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACG			
<i>A.a.</i> Da (A)	CTTTCAACAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACG			
<i>A.a.</i> FDL457 (B)	CTTTCAACAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACG			
<i>A.a.</i> M96/1 (B)	CTTTCAACAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACG			
<i>A.a.</i> Kv (C)	CTTTCAACAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACG			
<i>A.a.</i> Pc (D)	CTTTCAACAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACG			
<i>A.a.</i> E	CTTTCAACAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACG			

	240		299
<i>A.a.</i> Li (A)	TAATGCGAATTGCAGAATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTTTCGG		
<i>A.a.</i> VL (A)	TAATGCGAATTGCAGAATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTTTCGG		
<i>A.a.</i> Da (A)	TAATGCGAATTGCAGAATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTTTCGG		
<i>A.a.</i> FDL457 (B)	TAATGCGAATTGCAGAATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTTTCGG		
<i>A.a.</i> M96/1 (B)	TAATGCGAATTGCAGAATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTTTCGG		
<i>A.a.</i> Kv (C)	TAATGCGAATTGCAGAATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTTTCGG		
<i>A.a.</i> Pc (D)	TAATGCGAATTGCAGAATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTTTCGG		
<i>A.a.</i> E	TAATGCGAATTGCAGAATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTTTCGG		
	300		359
<i>A.a.</i> Li (A)	GTTAGTCCTGGAAGTATGTCTGTATCAGTGTCCGTTAATACAAAATTGTTTTGTCTTTGG		
<i>A.a.</i> VL (A)	GTTAGTCCTGGAAGTATGTCTGTATCAGTGTCCGTTAATACAAAATTGTTTTGTCTTTGG		
<i>A.a.</i> Da (A)	GTTAGTCCTGGAAGTATGTCTGTATCAGTGTCCGTTAATACAAAATTGTTTTGTCTTTGG		
<i>A.a.</i> FDL457 (B)	GTTAGTCCTGGAAGTATGTCTGTATCAGTGTCCGTTAATACAAAATTGTTTTGTCTTTGG		
<i>A.a.</i> M96/1 (B)	GTTAGTCCTGGAAGTATGTCTGTATCAGTGTCCGTTAATACAAAATTGTTTTGTCTTTGG		
<i>A.a.</i> Kv (C)	GTTAGTCCTGGAAGTATGTCTGTATCAGTGTCCGTTAATACAAAATTGTTTTGTCTTTGG		
<i>A.a.</i> Pc (D)	GTTAGTCCTGGAAGTATGTCTGTATCAGTGTCCGTTAATACAAAATTGTTTTGTCTTTGG		
<i>A.a.</i> E	GTTAGTCCTGGAAGTATGTCTGTATCAGTGTCCGTTAATACAAAATTGTTTTGTCTTTGG		
	360		419
<i>A.a.</i> Li (A)	ACGAAGCAGAATGTGAAGGTCTTGTTTCGACAAAGTCCTTTTAAATGACGGTCCCTGTAT		
<i>A.a.</i> VL (A)	ACGAAGCAGAATGTGAAGGTCTTGTTTCGACAAAGTCCTTTTAAATGACGGTCCCTGTAT		
<i>A.a.</i> Da (A)	ACGAAGCAGAATGTGAAGGTCTTGTTTCGACAAAGTCCTTTTAAATGACGGTCCCTGTAT		
<i>A.a.</i> FDL457 (B)	ACGAAGCAGAATGTGAAGGTCTTGTTTCGACAAAGTCCTTTTAAATGACGGTCCCTGTAT		
<i>A.a.</i> M96/1 (B)	ACGAAGCAGAATGTGAAGGTCTTGTTTCGACAAAGTCCTTTTAAATGACGGTCCCTGTAT		
<i>A.a.</i> Kv (C)	ACGAAGCAGAATGTGAAGGTCTTGTTTCGACAAAGTCCTTTTAAATGACGGTCCCTGTAT		
<i>A.a.</i> Pc (D)	ACGAAGCAGAATGTGAAGGTCTTGTTTCGACAAAGTCCTTTTAAATGACGGTCCCTGTAT		
<i>A.a.</i> E	ACGAAGCAGAATGTGAAGGTCTTGTTTCGACAAAGTCCTTTTAAATGACGGTCCCTGTAT		
	420		479
<i>A.a.</i> Li (A)	AGGTGTTCAAGTACATTATACAAAGGTCTATATGATTCTGATTTTGAATGTTTTGTGTTG		
<i>A.a.</i> VL (A)	AGCTGTTCAAGTACATTATACAAAGGTCTATATGATTCTGATTTTGAATGTTTTGTGTTG		
<i>A.a.</i> Da (A)	AGCTGTTCAAGTACATTATACAAAGGTCTATATGATTCTGATTTTGAATGTTTTGTGTTG		
<i>A.a.</i> FDL457 (B)	AGCTGTTCAAGTACATTATACAAAGGTCTATATGATTCTGATTTTGAATGTTTTGTGTTG		
<i>A.a.</i> M96/1 (B)	AGCTGTTCAAGTACATTATACAAAGGTCTATATGATTCTGATTTTGAATGTTTTGTGTTG		
<i>A.a.</i> Kv (C)	AGCTGTTCAAGTACATTATACAAAGGTCTATATGATTCTGATTTTGAATGTTTTGTGTTG		
<i>A.a.</i> Pc (D)	AGCTGTTCAAGTACATTATACAAAGGTCTATATGATTCTGATTTTGAATGTTTTGTGTTG		
<i>A.a.</i> E	AGCTGTTCAAGTACATTATACAAAGGTCTATATGATTCTGATTTTGAATGTTTTGTGTTG		
	BO 525		
	480		539
<i>A.a.</i> Li (A)	AAATTGCACAACCTTTTGAAGAAGGCTAAATTGCGGTAGTTTTGCTTGTGTTTCGGCACC		
<i>A.a.</i> VL (A)	AAATTGCACAACCTTTTGAAGAAGGCTAAATTGCGGTAGTTTTGCTTGTGTTTCGGCACC		
<i>A.a.</i> Da (A)	AAATTGCACAACCTTTTGAAGAAGGCTAAATTGCGGTAGTTTTGCTTGTGTTTCGGCACC		
<i>A.a.</i> FDL457 (B)	AAATTGCACAACCTTTTGAAGAAGGCTAAATTGCGGTAGTTTTGCTTGTGTTTCGGCACC		
<i>A.a.</i> M96/1 (B)	AAATTGCACAACCTTTTGAAGAAGGCTAAATTGCGGTAGTTTTGCTTGTGTTTCGGCACC		
<i>A.a.</i> Kv (C)	AAATTGCACAACCTTTTGAAGAAGGCTAAATTGCGGTAGTTTTGCTTGTGTTTCGGCACC		
<i>A.a.</i> Pc (D)	AAATTGCACAACCTTTTGAAGAAGGCTAAATTGCGGTAGTTTTGCTTGTGTTTCGGCACC		
<i>A.a.</i> E	AAATTGCACAACCTTTTGAAGAAGGCTAAATTGCGGTAGTTTTGCTTGTGTTTCGGCACC		

BO 640

540

599

A.a. Li (A) GGTGAACAACATATTGCTTTTTATGTCGTCTGGAAGAGGTTTGTA . GTTGAAGGCAGAAT
A.a. VL (A) GGTGAACAACATATTGCTTTTTATGTCGTCTGGAAGAGGTTTGTA . GTTGAAGGCAGAAT
A.a. Da (A) GGTGAACAACATATTGCTTTTTATGTCGTCTGGAAGAGGTTTGTA . GTTGAAGGCAGAAT
A.a. FDL457 (B) GGTGAACAACATATTGCTTTTTATGTCGTCTGGAAGAGGTTTGTA . GTTGAAGGCAGAAT
A.a. M96/1 (B) GGTGAACAACATATTGCTTTTTATGTCGTCTGGAAGAGGTTTGTA . GTTGAAGGCAGAAT
A.a. Kv (C) GGTGAACAACATATTGCTTTTTATGTCGTCTGGAAGAGGTTTGTA . GTTGAAGGCAGAAT
A.a. Pc (D) GGTGAACAACATATTGCTTTTTATGTCGTCTGGAAGAGGTTTGTA . GTTGAAGGCAGAAT
A.a. E GGTGAACAACATATTGCTTTTTATGTCGTCTGGAAGAGGTTTGTA . GTTGAAGGCAGAAT

600

659

A.a. Li (A) GCGGAGTCGGATAGTATGGTCTGGTGTGCTTGTGTCTATAT . . GGAAGCAAATTTGGGAAA
A.a. VL (A) GCGGAGTCGGATAGTATGGTCTGGTGTGCTTGTGTCTATAT . . GGAAGCAAATTTGGGAAA
A.a. Da (A) GCGGAGTCGGATAGTATGGTCTGGTGTGCTTGTGTCTATATA . . GGAAGCAAATTTGGGAAA
A.a. FDL457 (B) GCGGAGTCGGATAGTATGGTCTGGTGTGCTTGTGTCTATAT . . GGAAGCAAATTTGGGAAA
A.a. M96/1 (B) GCGGAGTCGGATAGTATGGTCTGGTGTGCTTGTGTCTATAT . . GGAAGCAAATTTGGGAAA
A.a. Kv (C) GCGGAGTCGGATAGTATGGTCTGGTGTGCTTGTGTCTATAT . . GGAAGCAAATTTGGGAAA
A.a. Pc (D) GCGGAGTCGGATAGTATGGTCTGGTGTGCTTGTGTCTATAT . . GGAAGC
A.a. E GCGGAGTCGGATAGTATGGTCTGGTGTGCTTGTGTCTATAT . . GG

NS 681

660

719

A.a. Li (A) CAACATCCAATTTGGACC . TGATATCAGACAAGACTACCCGCTGAAATTTAAGCATATCAA
A.a. VL (A) CAACATCCAATTTGGACC . TGATATCAGACAAGACTACCCGCTGAA
A.a. Da (A) CAACATCCAATTTGGACC . TGATATCAGACAAGACTACCCGCTGAA
A.a. FDL457 (B) CAACATCCAATTTGGACC . TGATATCAGACAAGACTACCCGCTGAAATTTAAGCATTTCAA
A.a. M96/1 (B) CAACATCCAATTTGGACC . TGATATCAGACAAGACTACCCGCTGAAATTTAAGCATATCAA
A.a. Kv (C) CAACATCCAATTTGGACC . TGATATCAGACAAGACTACCCGCTGAA
A.a. Pc (D) CAACATCCAATTTGGACC . TGATATCAGACAAGACTACCCGCTGAA
A.a. E CAACATCCAATTTGGACC . TGATATCAGACAAGACTACCCGCTGAA

Abbildung 63: Alignment der ITS-Region von *Aphanomyces brassicae* gegen den Referenzstamm *Aphanomyces astaci* M96/1 unter Kennzeichnung der Region der größten Homologie (unterstrichen) und der Primer NS 166, NS 170, BO 525, BO 640, NS 681 (grau unterlegt bzw. **fettgedruckt**)

	1	60
<i>Aph. ast.</i> M96/1	CCACACCAAAAACTATCCACGTGAATGTATTCTTTATAAGGCTTGTGCTGAGGATGTCC	
		120
<i>Aph. ast.</i> M96/1	ACACCAAAAACTATCCACGTGAATGTATTCTTTATAAGGCTTGTGCTGAGGATGTTCTT	
<i>Aph. brassicae</i>	ACGAGTTTTTAATTGTTAGATTAGAGTTGAGCTGGTTAACTTTGTAAAC	
		180
<i>Aph. ast.</i> M96/1	CGGGACGACCCGGCTAGCAGAAGTTTTCGCAAGAAGCCGATGTACTTTTAATCCCTTCTT	
<i>Aph. brassicae</i>	ATCAGTGCTCGCTTTAGTTGATACAAGTCCACTCATCATTTAACACTTGTGAACTTATTC	
	NS 166 NS 170	240
<i>Aph. ast.</i> M96/1	AAATAACATACTGATAAACTTAGCCGT CAGAAATGATAGCTTGTAAATA AAAAATACAACCTTT	
<i>Aph. brassicae</i>	ATTATAAACATTATCATTTTGTATTGGAACGTTTTGAATTATAACAAGTTAAATACAACCTTT	
		300
<i>Aph. ast.</i> M96/1	CAACAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAAT	
<i>Aph. brassicae</i>	<u>CAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGAGCGAAATGCGATAAGTAAT</u>	
		360
<i>Aph. ast.</i> M96/1	GCGAATTGCAGAATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTTTCGGGTTA	
<i>Aph. brassicae</i>	<u>GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTTCGCTCCCTGGTAT</u>	
		420
<i>Aph. ast.</i> M96/1	GTCCTGGAAGTATGTCTGTATCAGTGTCCGTTAATACAAAATTGTTTTGTCTTTGGACGA	
<i>Aph. brassicae</i>	TCCGGGGAGCATGCCTGTTTGTAGTGTGCGTAAATCATCATGGTCATGATCTTTAATTAAT	
		480
<i>Aph. ast.</i> M96/1	AGCAGAATGTGAAGGTCTTGTTCGACAAGTCCTTTTAAATGACGGTCCCTGTATAGCTG	
<i>Aph. brassicae</i>	CATGGCTTGGTTTTGGAGGTTATGTTGGCTTTTTTATTAAGTTGACTCCTCTTAAATACAT	
		540
<i>Aph. ast.</i> M96/1	TTCAAGTACATTATACAAAGGTCTATATGATTCTGATTTTGAATGTTTTGTGTTGAAATT	
<i>Aph. brassicae</i>	TAGCTCAGTGTTTAATGCTTAGAGCGGTTACGGTGTGATAATTATCTACACTTCAACCA	
	BO 525	600
<i>Aph. ast.</i> M96/1	GCACAACCTTTTGA AAGAAGGCTAAATTGCGGTA GTTTTGCTTGTGTTTCGGCACGGGTGA	
<i>Aph. brassicae</i>	ATTTAAGTTAGCTGGCTTCTAATCGATCCTTAGTGATCACTTTGTGTATTTGACCTCAA	
		660
<i>Aph. ast.</i> M96/1	ACAACATATTGCTTTTTATGTCGTCTGGAAGAGGTTTGTAGTTGAAGG CAGAATGCGGAG	
<i>Aph. brassicae</i>	TCAGGTAGGACTACCCGCTGAA	
		720
<i>Aph. ast.</i> M96/1	TCGGATAG TATGGTCTGGTGTGCTTGTGTCTATATGGAAGCAAATTGGGAAACAACATCC	
	NS 681	771
<i>Aph. ast.</i> M96/1	AATTTGGACCTGATATCAG ACAAGACTACCCGCTGAA TTTAAGCATATCAA	

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Dr. habil. R. Hoffmann danke ich besonders für die Überlassung des Dissertationsthemas, die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung und für seine konstruktiven Ratschläge, insbesondere bei der eingehenden Korrektur dieser Arbeit.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. B. Oidtmann als jederzeit präsent Ansprechpartnerin für ihre engagierte und freundschaftliche Betreuung sowie ihre überaus große Diskussionsbereitschaft.

Mein aufrichtiger Dank geht auch an Herrn Dr. Dr. habil. H. Rinder aus der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der Medizinischen Klinik Innenstadt der LMU München für seine große Hilfsbereitschaft und die zahlreichen Anregungen, die mit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten der LMU München danke ich sehr für die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung und die gute Zusammenarbeit. Ganz besonders bedanken möchte ich mich in diesem Zusammenhang bei Andreas Schott, Christine Kühnhauser-Vogt, Noppadon Sukranchana, Dr. Sascha Hallett und Stephen Atkinson.

Allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und mich immer wieder aufgemuntert haben, möchte ich herzlich danken; ganz besonders Tanja Dresel für ihre tatkräftige Unterstützung.

Mein herzlichster und aufrichtiger Dank gilt meinen Eltern, deren Unterstützung in jeglicher Art die Anfertigung dieser Arbeit erst ermöglicht hat.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Name: Nicole Yvonne Schaefers
Geburtsdatum: 13. Juli 1972
Geburtsort: Saarbrücken
Eltern: Rolf Schaefers
Hede Schaefers, geb. Pfohe

Schulbildung:

1979 – 1981: Linden-Grundschule, Riegelsberg
1981 – 1983: Bernhard-Rößner-Schule, Gröbenzell
1983 – 1992: Gymnasium Gröbenzell
08.07.1992: Allgemeine Hochschulreife

Studium:

1992 – 1999: Studium der Veterinärmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität München

SS 1998: fakultative Auslandspraktika:
-Park East Animal Hospital, New York
-Animal Emergency Clinic, Vancouver

04.08.1999: Staatsexamen
20.10.1999: Approbation
seit November 1999: Anfertigung der vorliegenden Dissertation
im Institut für Zoologie, Fischereibiologie
und Fischkrankheiten der LMU München