

**Entwicklung einer molekularbiologischen Methode zum Nachweis
des Krebspesterreger *Aphanomyces astaci* SCHIKORA in
nordamerikanischen Flusskrebse (*Pacifastacus leniusculus*;
Orconectes limosus; *Procambarus clarkii*)**

Annabelle Culas

München 2003

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 Krebspesterreger *Aphanomyces astaci* SCHIKORA in
nordamerikanischen Flusskrebsen (*Pacifastacus leniusculus*;
Orconectes limosus; *Procambarus clarkii*)**

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

von Annabelle Culas
aus
Baden-Baden

München 2003

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. R. Stolla

Referent: Univ.-Prof. Dr. R. Hoffmann

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. K. Pfister

Tag der Promotion: 18. Juli 2003

Meinen Eltern,

in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG.....	6
II. LITERATURÜBERSICHT	8
1. Allgemeines zu Flusskrebsen.....	8
1.1 Wirtschaftliche Bedeutung der Flusskrebse.....	8
1.2 Ökologie der Flusskrebse	9
1.3 Verschiedene Arten von Süßwasserkrebsen	10
1.4 Anatomie der Flusskrebse	14
1.5 Lebensweise von Flusskrebsen	16
2. Entwicklung und Auswirkung der Krebspest in Europa	17
2.1 Geschichtliche Entwicklung und Verbreitung der Krebspest	17
2.2 Auswirkungen der Krebspest	19
3. Taxonomie des Pilzes <i>Aphanomyces astaci</i>	19
4. Übertragungswege und Infektion der Krebse	21
5. Symptome und Pathologie der Krebspest bei empfänglichen Spezies	24
5.1 Klinische Symptome	24
5.2 Pathologisch-anatomische Veränderungen	26
5.3 Mikroskopische Veränderungen	27
6. Diagnosemöglichkeiten der Krebspest	28
6.1 Frühere Methode: Sporenanzucht, Neu-Infektion.....	28
6.2 Mittels Polymerasekettenreaktion (PCR).....	29
7. Immunologische Unterschiede zwischen Edelkrebsen und Signal-/Kamberkrebsen	31
7.1 Das Immunsystem der Süßwasserkrebse	31
7.2 Immunologische Unterschiede zwischen Edelkrebsen und Signalkrebsen.....	37
8. Bekämpfung und Prävention	39

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	43
A. MATERIAL	43
1. Versuchstiere	43
1.1 Herkunft der nordamerikanischen Flusskrebse	44
1.2 Herkunft der Edelkrebse.....	44
2. Molekularbiologische Reagenzien und Kits.....	45
2.1 DNA-Extraktion	45
2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)	45
2.3 Gelelektrophorese.....	45
2.4 Aufreinigung	46
2.5 Restriktionsfragmentlängen – Polymorphismus (RFLP)	46
2.6 Sequenzierung	46
3. Geräte	46
4. Rezepturen für selbsthergestellte Puffer, Lösungen und Anzuchtmedien.....	47
4.1 RGY-Agar (River-Glukose-Yeast-Agar)	47
4.2 PG ₁ -Medium und Agar.....	48
4.3 TAE-Puffer 50 x.....	48
4.4 dNTP-Mix für die PCR	49
5. Oligonukleotid-Primer	49

B. METHODEN.....	50
1. Entwicklung einer Methode zur Testung nordamerikanischer Flusskrebse auf ihren Carrier-Status	50
1.1 Sektion der verendeten Krebse.....	50
1.2 DNA-Extraktion aus Krebsgewebe mittels DNeasy® Tissue Kit (Qiagen)	52
1.3 Gewählte Primer.....	53
1.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)	54
1.5 Optimierung des PCR-Protokolls.....	55
1.6 Aufreinigung der PCR-Produkte.....	59
1.7 Restriktionsfragmentlängen – Polymorphismus (RFLP)	59
1.8 Sensitivitätsbestimmung.....	60
1.9 Agarosegel-Elektrophorese	61
1.10 Verschiedene Panzerregionen nordamerikanischer Flusskrebse.....	62
2. Testung der Methoden an Krebsen aus 8 verschiedenen Populationen nordamerikanischer Flusskrebse.....	67
2.1 Herkunft der Krebse	67
2.2 Bestimmung des Carrier-Status der nordamerikanischen Flusskrebse durch Kontaktversuche (Versuchsaufbau)	67
2.3 Bestimmung des Carrier-Status durch PCR.....	68
3. Gewinnung von Zoosporen.....	69

C. ERGEBNISSE	70
1. Anwendung der bereits für Edelkrebse entwickelten Methode zum Nachweis der Krebspest (OIDTMANN et al. 2002) beim nordamerikanischen Flusskrebs (<i>Orconectes limosus</i>, <i>Pacifastacus leniusculus</i>).....	70
1.1 Methode um die Krebspest im nordamerikanischen Flusskrebs nachzuweisen	70
1.2 Wahl der Primer	71
1.3 Optimierung der PCR-Protokolle.....	72
1.3.1 Optimierung der MgCl ₂ -Konzentration	72
1.3.2 Optimierung der Annealing-Temperatur und Zyklenzahl.....	74
1.3.3 Zyklenzahl-Optimierung	75
1.3.4 Optimierung der dNTP-Menge	76
1.3.5 Optimierung der Primer-Konzentration	77
1.3.6 Optimierung der Taq-Menge.....	78
1.4 Spezifität der Primer und Restriktionsenzym-Analyse	79
1.4.1 Restriktionsenzym-Analyse	81
1.4.2 Testung der Spezifität der Primer.....	82
1.4.3 PCR mit spezifischen Dekapoden-Primer 143/145.....	83
1.5 Sensitivitätsbestimmung der PCR.....	84
2. Auswertung der Versuchsgruppen	86
2.1 Auswertung der Versuchsgruppen 1-8 (Sektion, lichtmikroskopische Untersuchung und DNA-Extraktion)	87
3. Vergleich 6 verschiedener Krebsbereiche, um die für den Pilznachweis am besten geeigneten herauszufinden	100
3.1 Vergleich 6 verschiedener Stellen bei einer hochgradig infizierten Gruppe.....	100
3.2 Vergleich 6 verschiedener Stellen bei einer mittelgradig infizierten Gruppe	105
3.3 Vergleich 6 verschiedener Stellen bei einer geringgradig infizierten Gruppe	109
3.4 Vergleich 9 verschiedener Stellen beim Roten amerikanischen Sumpfkrebs (<i>Procambarus clarkii</i>).....	111

4. Anwendung der neu entwickelten Methode bei eingesandten Krebsen.....	113
4.1 Untersuchung von 20 eingesandten Signalkrebsen.....	113
4.2 Untersuchung einer weiteren Gruppe von eingesandten Signalkrebsen.....	116
4.3 Untersuchung von Marmorkrebsen.....	116
5. Zusammenfassung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.....	117
IV. DISKUSSION.....	118
1. Entwicklung einer molekularbiologischen Methode zum Nachweis des Krebspesterregers <i>Aphanomyces astaci</i> in nordamerikanischen Flusskrebse...	118
2. Geeignete Entnahmestellen zum Nachweis von <i>Aphanomyces astaci</i>.....	123
3. Zusammenhang zwischen Melanisierungen und der Krebspest.....	125
4. Eine einfache und kostengünstige Nachweismethode für die Krebspest?	127
5. Marmorkrebse.....	130
V. ZUSAMMENFASSUNG.....	131
VI. SUMMARY.....	133
VII. LITERATURVERZEICHNIS.....	135
IIIX. ANHANG.....	151
IX. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	152
X. DANKSAGUNG	
XI. LEBENS LAUF	

I. EINLEITUNG

Bei der Krebspest handelt es sich um eine hochinfektiöse Pilzerkrankung, die durch den Pilz *Aphanomyces astaci* SCHIKORA (1906) hervorgerufen wird.

Die Erkrankung ist zum ersten Mal Mitte des 19. Jahrhunderts in Europa aufgetreten (HOFER 1906), nachdem nordamerikanische Flusskrebsspezies nach Europa importiert wurden. Die heimischen Flusskrebsspezies Edelkrebs (*Astacus astacus*) und Steinkrebs (*Austropotamobius torrentium*) sind äußerst empfänglich für den Erreger. Die Erkrankung verläuft beim Edelkrebs (*Astacus astacus*) in der Regel akut und geht mit 100%iger Mortalität einher (UNESTAM 1969 a). Die nordamerikanischen Arten Signalkrebs (*Pacifastacus leniuculus*), Kamberkrebs (*Orconectes limosus*) und roter, amerikanischer Sumpfkrebs (*Procambarus clarkii*) sind dagegen lediglich Träger des Pilzes, so genannte „Carrier-Krebse“. Sie selbst erkranken aufgrund eines angepassten Immunsystems nur unter Stress an der Krebspest. Seit Auftreten der nordamerikanischen Krebse in europäischen Gewässern besteht somit die Gefahr der Verdrängung einheimischer Arten nicht nur durch interspezifische Konkurrenz, sondern vor allem durch die Krebspest.

Es wurden regelrechte Seuchenzüge der Krankheit in Europa beobachtet, die ganze Krebspopulationen vernichteten; hieraus ergab sich der Name „Krebspest“. Das Krebssterben hatte seinen Ursprung 1859 in Italien; im folgenden Jahrhundert dehnte es sich bis nach Schweden, nach Großbritannien und in die Türkei aus und führte überall zu großen wirtschaftlichen Einbußen.

Die wirtschaftliche Bedeutung europäischer Flusskrebse beläuft sich jährlich auf einen Gesamtertrag zwischen 7000-8000t (LAUBIER u. LINQUIST 1990, WESTMAN et al. 1990), wobei diese Zahlen annualen Schwankungen unterliegen, bei einem Preis von ca. 50 € pro Kilo lebender Krebse.

Daher ist die Bekämpfung der Krebspest von internationalem Interesse.

Bis vor kurzem dauerte der Nachweis von *Aphanomyces astaci* mindestens 2 Wochen, da zuerst Sporen des Pilzes angezüchtet werden mussten und im Anschluss daran ein Infektionsversuch bei empfänglichen Arten durchgeführt wurde (ALDERMAN und POLGLASE 1986, CERENIUS et al. 1988).

Doch wurde bereits eine Methode ausgearbeitet um mittels PCR die Krebspest bei heimischen Flusskrebsspezies (Edelkrebs, Steinkrebs) nachzuweisen (OIDTMANN et al. 2002, OIDTMANN, SCHAEFERS, HOFFMANN unveröffentlicht 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde nun eine Methode entwickelt, die den Nachweis von *Aphanomyces astaci* in nordamerikanischen Flusskrebsspezies zulässt. Zu diesem Zweck wurden speziell neue Primer entwickelt, die für diesen Pilz spezifisch sind.

So kann ein „scheinbar“ gesunder, jedoch latent infizierter nordamerikanischer Flusskrebs als Träger der Krebspest identifiziert werden.

Zwar wird es unmöglich sein die nordamerikanischen Spezies aus Europa zu verdrängen, aber Ziel ist es die Erkrankung soweit als möglich zu bekämpfen und zurückzudrängen.

II. LITERATUR

1. Allgemeines zu Flusskrebse

1.1 Wirtschaftliche Bedeutung der Flusskrebse

Die Krebspest ist weltweit die bedeutendste Erkrankung der Süßwasserkrebse und ruft enorme wirtschaftliche Einbußen hervor.

Krebsfleisch gilt seit Jahrhunderten als Delikatesse. Bereits im Spätmittelalter stellten Flusskrebse ein beliebtes Fangobjekt dar (HOLTHUIS 1978, HAGER 1996, PEKNY und PÖCKL 2000). Heutzutage ist das zarte, aromatische Muskelfleisch bei Feinschmeckern sehr beliebt. Der Edelkrebs (*Astacus astacus*) wird aufgrund seiner breiten Scheren und seiner gut ausgeprägten Schwanzmuskulatur den anderen Arten vorgezogen. Er erreicht eine Länge von bis zu 18 cm und ein Gewicht bis max. 370g. Der Preis für ein Kilo Flusskrebse liegt heute zwischen 30-80 Euro.

Weltweit am häufigsten gefangen (70-80% aller Krebsfänge) wird der rote nordamerikanische Sumpfkrebs (*Procambarus clarkii*) (HUNER 1994), welcher vor allem im Bundesstaat Louisiana/USA gezüchtet wird.

Im 19. Jahrhundert wurden Flusskrebse in Gesamteuropa importiert und exportiert, wobei alleine Deutschland einen Export von 600t jährlich ins europäische Ausland aufweisen konnte (DEHUS et al. 1999).

Der Hauptproduzent und Exporteur in den 80er Jahren war die Türkei. Sie exportierte damals 6000-7000t jährlich hauptsächlich nach Frankreich und Schweden. 1985 führte ein Krebspestausbuch in der Türkei fast zum vollständigen Erliegen des Krebsfanges des dort heimischen Galizierkrebses (*Astacus leptodactylus*) (ACKEFORS 1999, HOLDICH 2002).

Seit Ausbruch der Seuche 1859 in Europa/Italien wurden zahlreiche Bestände durch die Krankheit vernichtet und der Export ging rapide zurück. Die einst reich gefüllten europäischen Gewässer waren in wenigen Jahrzehnten fast leer.

Heutzutage müssen Flusskrebse importiert werden um die Nachfrage in Europa zu decken.

Von großer wirtschaftlicher und kultureller Bedeutung sind die Krebse insbesondere für die Länder Schweden und Finnland (UNESTAM 1965). In Finnland liegen die Verluste, die durch Ausbruch der Krebspest entstehen, auch heute noch in den zweistelligen Millionen Finnmark (WESTMAN 1991) (6 Finnmark = 1 €).

Nachdem unzählige Edelkrebse verendet waren und die Krebszüchter ihre Gewässer wiederbesiedeln wollten, führte Schweden im Jahr 1969 etwa 100 000 Signalkrebse aus Kalifornien/USA ein. Es wurde damals vermutet, dass diese aus Amerika stammende Art immun gegen die Krebspest war. Es war jedoch noch nicht bekannt, dass die äußerlich gesund erscheinenden Tiere Träger des hochinfektiösen Pilzes (*Aphanomyces astaci*) sein konnten und somit die Krebspest auf Edelkrebse übertragen konnten. Nachzuchten der importierten Signalkrebse wurden ab 1970 nach ganz Europa verkauft (ACKEFORS 2000). Dies führte zu einem neuen Seuchenzug durch Europa und hatte für die Edelkrebsebestände verheerende Folgen.

Die europäische Imbalance zwischen Import und Export lag nach Statistiken der Food and Agricultural Organisation (FAO) bei 3767 Tonnen Importüberschuss und einem Wert von US \$ 30 Millionen im Jahr 1990 (HUNER 1994). Italien lag beim Import mit 2170 Tonnen Flusskrebsen an der europäischen Spitze, gefolgt von Schweden mit einer Einfuhr von 1943 Tonnen. Spanien dagegen exportierte 867 Tonnen.

1.2 Ökologie der Flusskrebse

Flusskrebse sind ein bedeutender Bestandteil des Ökosystems. Sie sorgen für ein stabiles Gleichgewicht in den Gewässern.

Süßwasserkrebse sind nicht ausschließlich Carnivoren (Insekten, Schnecken, tote Fische), sondern auch Herbivoren und Detritivoren (UNESTAM 1973, MATTHEWS und REYNOLDS 1992) und spielen damit eine wichtige Rolle bei der Gewässerreinigung.

Sie selbst werden von Fischen, vor allem Raubfischen, und Wasservögeln gefressen.

Das Massensterben der Krebse Ende des 19. Jahrhunderts hatte für die Umwelt erhebliche Auswirkungen. Es kam zu Überwucherungen von Seen mit Algen (ABRAHAMSSON 1966, UNESTAM 1973a), zu einem geringeren Wachstum an Fischbeständen und zu einer ansteigenden Bakterien- und Pilzkonzentration in Gewässern.

Früher galten Flusskrebse als Indikatoren für gesunde Flüsse (Bioindikatoren). Man glaubte, dass sie nur in sehr sauberen Gewässern überleben konnten. Doch diese Aussage ist nur bedingt richtig, da Untersuchungen gezeigt haben, dass die Krebse eine relativ hohe Toleranz gegenüber pH-Werten, Nitrat, Phosphat und anderen Parametern aufweisen (BOHL 1989).

Jedoch können durch ihr Vorkommen in Seen Rückschlüsse über die strukturelle Beschaffenheit des Bodens und der Uferbeschaffenheit gemacht werden.

Der Rückgang der Flusskrebsbestände beruht nicht ausschließlich auf der Verbreitung der Krebspest, sondern ist auch Folge von Umweltfaktoren wie Wasserverschmutzung (Chemikalien, etc.), Biotopzerstörung oder Flussbegradigung.

1.3 Verschiedene Arten von Süßwasserkrebsen

Flusskrebse sind weltweit verbreitet und kommen auf allen Kontinenten vor, ausgenommen Afrika. Es wird angenommen, dass es etwa 550 Krebsarten gibt (ACKEFORS 2000). Diese lassen sich einteilen in die Astacoidea (Überfamilie), die auf der Nordhalbkugel vorkommen, und die Parastacoidea (Überfamilie) auf der Südhalbkugel (SCHOLTZ 1999) (siehe **Tabelle 1**).

Zu den Astacoidea zählen die 3 Gattungen der Astacidae (Familie), die unter anderem die Arten Edelkrebs (*Astacus astacus*), Steinkrebs (*Austropotamobius torrentium*) und Signalkrebs (*Pacifastacus leniusculus*) umfassen. Außerdem gehören die 12 Gattungen der Cambaridae (Familie) mit den Vertretern Kamberkrebs (*Orconectes limosus*) und Roter nordamerikanischer Sumpfkrebs (*Procambarus clarkii*) dazu. Jede Gattung umfasst wiederum zahlreiche Arten.

Zu den auf der Südhalbkugel vorkommenden Parastacoidea gehören die 14 Gattungen der Parastacidae (Familie), die 129 Arten beinhalten. Von diesen auf der südlichen Hemisphäre vorkommenden Krebsen kommt den hauptsächlich in Australien heimischen 38 Arten der Gattung *Cherax* die bedeutendste Rolle zu. Der bekannteste Vertreter dieser Art ist *C. quadricarius* („Redclaw“) (HAGER 1996).

In der Literatur werden unterschiedliche taxonomische Einteilungen vorgenommen. Dies beruht auf den Differenzen in der Zuteilung zu Über- und Untereinheiten von Stamm und Klasse der internationalen Crustaceensystematiker (EICHERT und WETZLAR 1988, AHNE et al. 2000, FETZNER 1999, SCHOLTZ 1999, NCBI Genbank: Taxonomy Browser 2001).

Deshalb wurde 1998 von EDER und HÖLD eine tabellarische Klassifikation vorgenommen, die heutzutage weitgehend anerkannt ist.

Tabelle 1: Systematische Stellung der Flusskrebse (modifiziert nach EDER u. HÖDL 1998)

Unterreich:	Mehrzeller	<i>(Metazoa)</i>	
Reich:	Tierreich	<i>(Regnum animalium)</i>	
Stammgruppe:	Gliedertier	<i>(Articulata)</i>	
Stamm:	Gliederfüßer	<i>(Arthropoda)</i>	
Abteilung:	Mandibelträger	<i>(Mandibulata)</i>	
Unterstamm:	Krebse (Kiemenatmer)	<i>(Crustacea)</i> <i>(Branchiata, Diantennata)</i>	
Klasse:	Höher entwickelte Krebse	<i>(Malacostraca)</i>	
Unterklasse:	Das 7. Pleomer ist mit dem 6. vereint <i>(Eumalacostraca)</i>		
Überordnung:	Der Carapax ist mit 7 Thorakomeren verschmolzen	<i>(Eucarida)</i>	
Ordnung:	Zehnfüßkrebse	<i>(Decapoda)</i>	
Unterordnung:	Kriecher	<i>(Reptantia)</i>	
	Echte Hummer und Krebse	<i>(Astacidea)</i> (LATREILLE 1802-1803)	
Überfamilien:	FLUSSKREBSE		
	Astacoidea (DE HAAN 1841)		Parastacoidea (HUXLEY 1879)
Familien:	Astacidae (LATREILLE 1802-1803)	Cambaridae (HOBBS 1942)	Parastacidae (HUXLEY 1879)
Wirtschaftlich bedeutende Arten:	Edelkrebs <i>(Astacus astacus)</i> (LINNAEUS 1756)	Kamberkrebs <i>(Orconectes limosus)</i> (RAFINESQUE 1817)	Yabby <i>(Cherax destructor)</i> (CLARK 1936)
	Galizierkrebs <i>(Astacus leptodactylus)</i> (ESCHSCHOLTZ 1852)	Roter nordamerikanischer Flusskrebs <i>(Procambarus clarkii)</i> (GIRARD 1852)	Marron <i>(Cherax tenuimanus)</i> (SMITH 1912)
	Steinkrebs <i>(Austropotamobius torrentium)</i> (SCHRANK 1803)		Red Claw <i>(Cherax quadricarinatus)</i> (VON MARTENS 1868)
	Dohlenkrebs <i>(Austropotamobius pallipes)</i> (LEREBoullet 1858)		
Signalkrebs <i>(Pacifastacus leniusculus)</i> (DANA 1852)			

In den letzten Jahren haben sich die nordamerikanischen Flusskrebsspezies in den deutschen Gewässern stark vermehrt. In Deutschland unterliegt die Erfassung der Verbreitung von Flusskrebsarten als wirtschaftlich bedeutende Wasserbewohner dem Fischereigesetz der einzelnen Bundesländern. In Bayern (BOHL 1989, BOHL 1999), Baden-Württemberg (DEHUS 1997) und Schleswig-Holstein (DEHUS 1990) verläuft diese wissenschaftliche Registrierung sehr präzise. Zu den in Deutschland heimischen Arten zählen der Edelkrebs (*Astacus astacus*), der Steinkrebs (*Austropotamobius torrentium*) und der Dohlenkrebs (*Austropotamobius pallipes*). Zu den importierten Arten gehören zum einen die aus der Türkei stammenden Galizierkrebse (*Astacus leptodactylus*) und zum anderen die Kamberkrebse (*Orconectes limosus*), die Signalkrebse (*Pacifastacus leniusculus*) und die Roten amerikanischen Sumpfkrebse (*Procambarus clarkii*), die aus den USA eingeführt wurden. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten nordamerikanischen Kamber- und Signalkrebse stammten aus der Schweiz; auch hier ist eine Zunahme dieser Arten zu verzeichnen. Ebenfalls von diesem Problem betroffen ist Österreich.

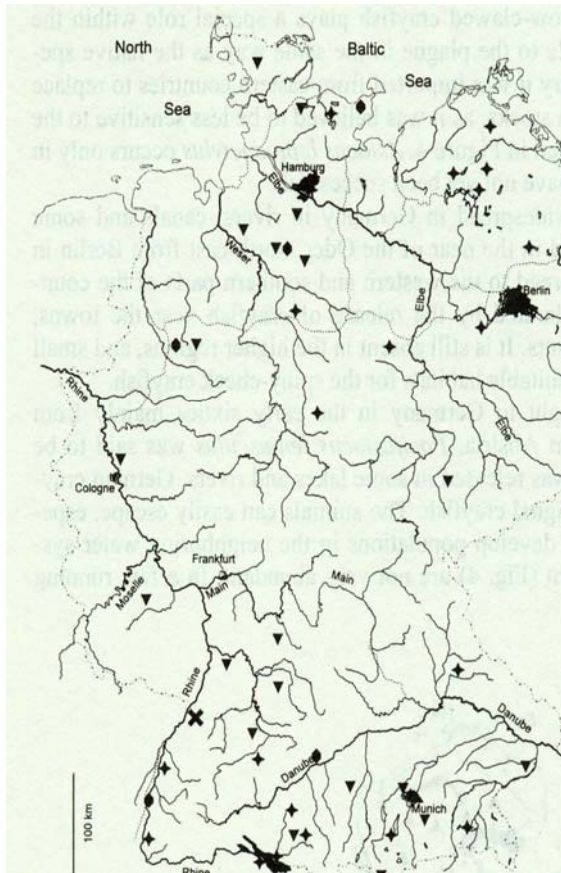


Abbildung 1: Verbreitung des Signalkrebses (*Pacifastacus leniusculus*) ▼, Roten amerik. Sumpfkrebses (*Procambarus clarkii*) ◆, Galizierkrebsses (*Astacus leptodactylus*) ✚, Kalikokrebsses (*Orconectes immunis*) x in Deutschland (nach DEHUS et al. 1999)

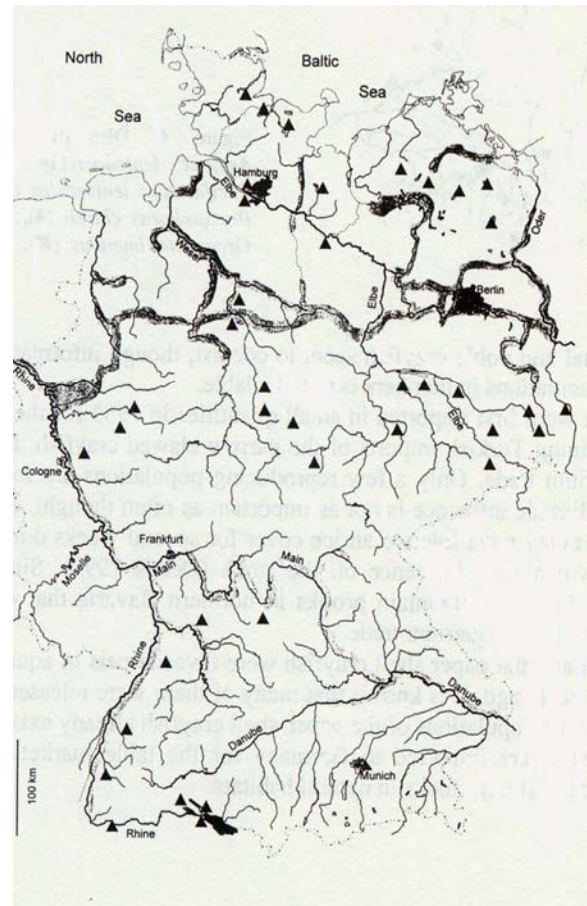


Abbildung 2: Verbreitung des Kamberkrebsses (*Orconectes limosus*) ▲ in Deutschland (nach DEHUS et al. 1999)

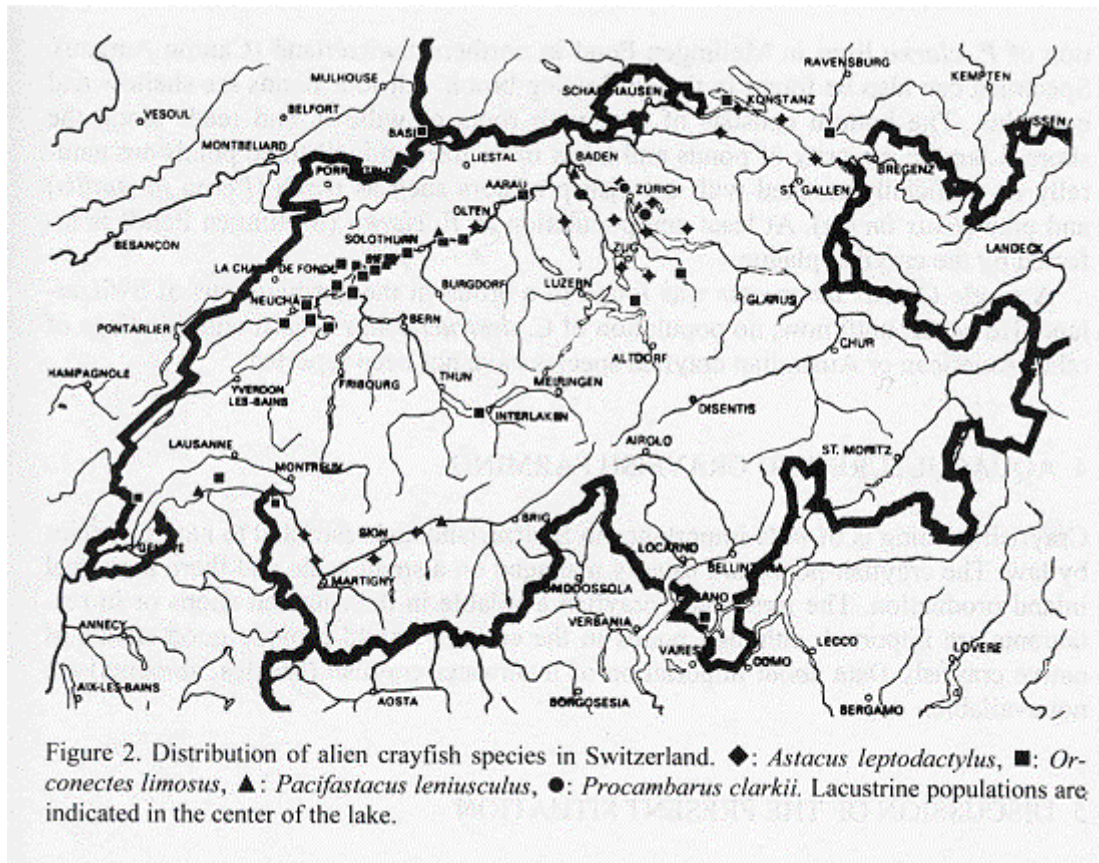


Abbildung 3: Die Schweiz und ihre nordamerikanischen Flusskrebspopulationen
(nach STUCKI und STAUB 1999)

1.4 Anatomie der Flusskrebse

Süßwasserkrebse besitzen ein Exoskelett, welches aus einer Chitin-Arthropodin-Kutikula gebildet wird, die kalkimprägniert ist.

Der Körper des Flusskrebses lässt sich in 2 Hauptabschnitte einteilen: kranial Cephalothorax und kaudal Abdomen. An der Körperunterseite am Cephalothorax sind 5 Paar Schreitfüße angelegt, wobei das erste Paar zu großen Scheren umgewandelt ist. Am ventralen Abdomen befinden sich 5 Pleopodenpaare (= Schwimmbeinchen).

Genauere Angaben zur Anatomie der Flusskrebse finden sich in der Fachliteratur (HOLDICH 1988, RENNER 1989, PÖCKL 1998, HOLDICH 2002) und in den Abbildungen 4 und 5 auf der nächsten Seite.

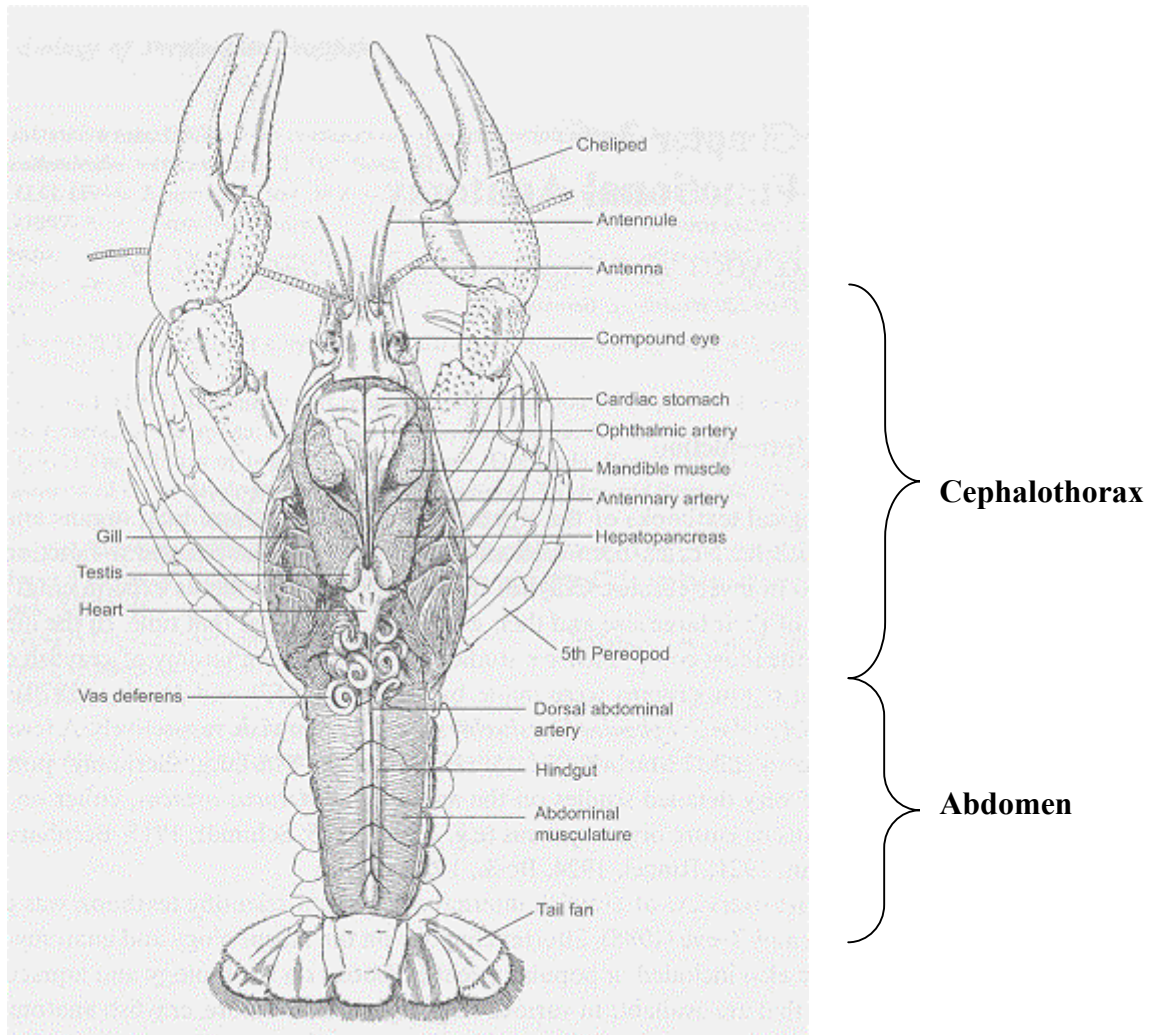


Abbildung 4: Anatomie eines männlichen Edelkrebse (*Astacus astacus*),
Dorsalansicht nach Entfernung des Panzers
(aus HOLDICH 2002, nach STORCH & WELSCH 1999)

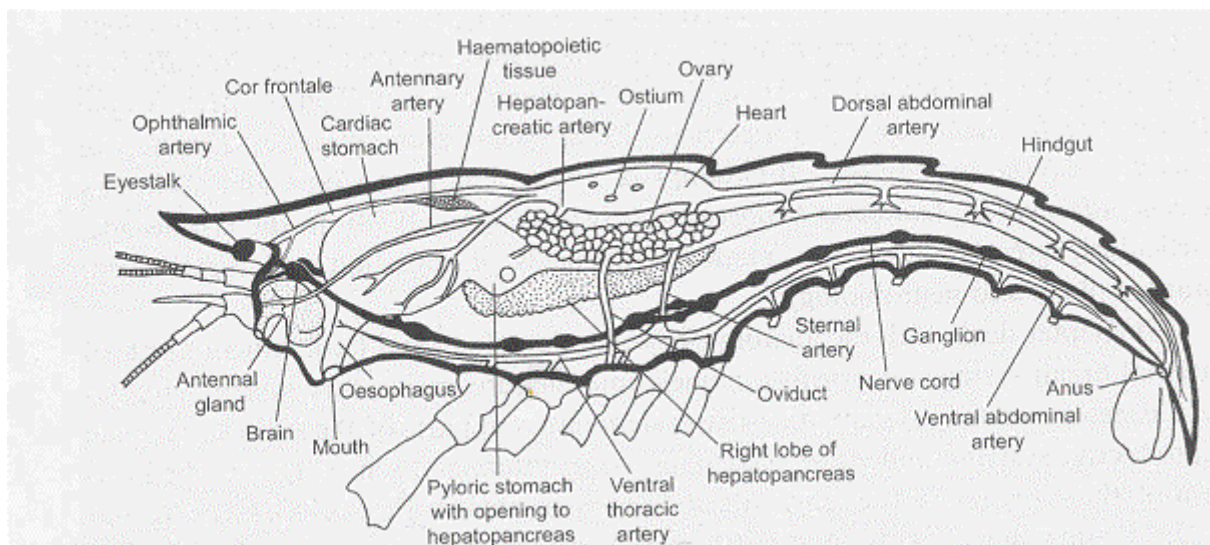


Abbildung 5: Längsschnitt eines Flusskrebseweibchen: wichtigste Organe, ohne Muskulatur
und endokrines System (nach HOLDICH & REEVE 1988)

1.5 Lebensweise und Fortpflanzung von Flusskrebse

Edelkrebse (*Astacus astacus*) leben bevorzugt in klaren, langsam fließenden, sauberen Gewässern.

Der pH-Wert sollte zwischen pH 6,0-8,7 liegen. Die Wassertemperatur ist bei 15-20°C im Sommer optimal. Die Tiere sind nachtaktiv. Sie schreiten über den Boden des Flusses auf Nahrungssuche und können sich bei Gefahr blitzartig durch einen Schlag mit ihrer kräftigen Schwanzmuskulatur zurückziehen (HOFMANN 1980).

Das Wachstum der Krebse ist nur durch Häutung möglich, wobei für die Geschwindigkeit dieser Entwicklung sowohl die Wassertemperatur als auch das Nahrungsangebot entscheidend sind. Bei frisch geschlüpften Krebsen erfolgt die Häutung sehr häufig. Adulte Tiere häuten sich in den hiesigen Breitengraden nur 1-2-mal im Jahr. In den Subtropen dagegen finden Häutungen das ganze Jahr über statt (HOLDICH 2002). Weibchen sind normalerweise kleiner als Männchen, da sie sich in den Monaten in denen sie die Eier am Abdomen tragen nicht häuten können. Edelkrebs-Männchen häuten sich zweimal jährlich, z.B. in Schweden im Juni und August, wogegen die Weibchen sich hier nur im Monat August häuten (ACKEFORS 1999). Nach der Häutung sind die so genannten Butterkrebse ungeschützt und eine leichte Beute, da es einige Tage dauert bis der Chitinpanzer aushärtet.

Die Geschlechtsreife tritt bei Edelkrebsen größenabhängig im Alter von zwei und sechs Jahren ein (durchschnittlich 3 Jahre) (HOFMANN 1980, BOHL et al. 1989).

Die Begattung findet in den Monaten Oktober und November statt. Das Männchen dreht das Weibchen auf den Rücken und hält sie mit seinen Scheren fest. Mit Hilfe der Gonopoden klebt das Männchen ihr die Spermatophoren äußerlich an den Unterleib. Die Befruchtung selbst findet erst einige Wochen später statt, wenn das Weibchen einige hundert Eier aus der Legeöffnung am 2.Schreitfußpaar abgibt. Die Eier sind von einer Schleimhülle umgeben, deren Substanzen die Spermien aktivieren.

Die befruchteten Eier werden in den folgenden Monaten geschützt am Hinterleib getragen.

Edelkrebs-Weibchen können bis zu 350 Eier legen. Im Mai und Juni schlüpfen die etwa 10 mm großen Larven und verbleiben bis zur ersten Häutung noch an der Mutter. In den folgenden Monaten häuten sie sich 5-6-mal, so dass sie im Spätherbst eine Körperlänge von 2-4 cm erreichen.

Der Kamberkrebs (*Orconectes limosus*) ist die Wasserqualität betreffend weniger anspruchsvoll als der Edelkrebs.

Noch widerstandsfähiger gegenüber äußeren Einflüssen ist der Signalkrebs (*Pacifastacus leniusculus*). Er kann sogar in eutrophen Gewässern überleben. Deshalb wurde er in den 60 er Jahren nach Schweden importiert und anschließend dort gezüchtet.

2. Entwicklung und Auswirkung der Krebspest in Europa

2.1 Geschichtliche Entwicklung und Verbreitung der Krebspest

Die Krebspest trat zum ersten Mal im Jahre 1859 in Norditalien auf (NINNI 1865, HOFER 1906, ACKEFORS 1999).

Die Erkrankung breitete sich durch den Speisekrebshandel in ganz Europa aus und erreichte im Jahr 1870 Deutschland (ALDERMAN 1996).

Der Verlauf der Verbreitung der Krebspest wird in **Tabelle 2** dargestellt.

Tabelle 2: Krebspestausbreitung in Europa

Jahr	Land	Literatur
1860	Italien, Lombardei, Po-Tal	NINNI 1865, SELIGO 1895
1870	Südliches Frankreich	DAHLE 1982
1878-1880	Östliches Frankreich	SELIGO 1895
1880	Bayern	HOFMANN 1980
1881	Schweiz	SELIGO 1895
Ende 19. und Anfang 20. Jahrhundert	Niederlande, Belgien, Dänemark, Polen, Österreich, Balkan, Ungarn, Bulgarien, Rumänien	ALDERMAN und POLGLASE 1988
1890	Ostpreußen	DAHLE 1982
1893	Finnland	NYLUND et al. 1993
1907	Schweden	UNESTAM 1965
1971	Norwegen	UNESTAM 1973a
1978	Spanien	CUELLAR und COLL 1987
1980	Großbritannien	ALDERMAN 1993
1984	Türkei	BARAN und SOYLU 1989
1987	Irland	MATTHEWS und REYNOLDS 1990

Bisher ist in Europa nur Portugal von der Krebspest verschont geblieben (ALDERMAN und POLGASE 1988).

Hinsichtlich der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Krebspest konnten unterschiedliche Beobachtungen durchgeführt werden. So beschrieb MANNSFELD 1942 eine Ausbreitung der Krebspest stromaufwärts von 20-25 km pro Jahr. ALDERMAN und POLGASE 1988 dagegen beobachten ein Fortschreiten der Seuche flussaufwärts um 8 km in 2 Jahren. Andere Autoren sprechen von 1,5 km monatlich (HASTEIN und GLADHAUG 1972) oder aber nur von 3 km jährlich (WESTMAN und NYLUND 1979).

2.2 Auswirkungen der Krebspest

Die Krebspest führte zu regelrechten Seuchenzügen in Europa und hatte bedeutende ökonomische und ökologische Folgen (siehe **Kapitel II.1.1** und **1.2**).

Auch heute noch stellt die Krebspest die gravierendste Erkrankung bei Flusskrebsen dar. Betroffene Länder in Europa, wie Deutschland, Österreich, Schweden und England versuchen sich einen Überblick über die Krebsbestände (Monitoring) zu verschaffen. Zudem verfolgen sie die Entwicklung der Krebsbestände und entwerfen Managementpläne um Kontrolle über die Erkrankung und ihre Ausbreitung zu erlangen (ALDERMAN 1993, 1996, HOLDICH 2002).

3. Taxonomie des Pilzes *Aphanomyces astaci*

Pilze lassen sich unterteilen in die Abteilung der Schleimpilze (Myxomycota) und die Abteilung der Echten Pilze (Eumycota).

Die echten Pilze lassen sich wiederum aufteilen in die höheren und niederen Pilze. Zu den letztgenannten zählen auch die Algenpilze (Phycomycota), zu deren Gattung der Krebspesterreger *Aphanomyces astaci* zählt. Dieser wird außerdem der Unterabteilung der Mastigomycotina zugeordnet, welche sich durch einen schlauchförmigen und querwandlosen Thallus (Hyphen oder Sprosszellen) auszeichnen (GEDEK 1980). Die Bildung begeißelter Zoosporen, anhand deren Anzahl, Typ und Insertion sie unterschieden werden können ist charakteristisch für die Mastigomycotina (WEBSTER 1980, FULLER und JAWORSKI 1987). Innerhalb der Klasse der Oomyceten gehört *Aphanomyces astaci* in die Ordnung der Saprolegniales (siehe **Tabelle 3**).

Oomyceten leben ursprünglicherweise im Wasser als Saprophyten oder Parasiten von Algen und niederen Wassertieren. Einige wenige Oomyceten zeigen bereits eine Anpassung an das Landleben. Zu den bekannten Vertreter zählen Arten der Ordnung Peronosporales, die als Verursacher des falschen Mehltaus der Weinreben gelten und der Pilz *Phytophthora infestans*, der die Kraut- und Knollenseuche bei Kartoffeln auslöst (AINSWORTH et al. 1973, GEDEK 1980).

Krankheitserreger für die im Wasser lebenden Tiere sind Vertreter der Gattungen *Saprolegnia*, *Aphanomyces*, *Dictyuchus* und *Achlya*. Diese Erreger führen beim Wirt zu Läsionen oder können zum Teil auch mit einer hohen Mortalität einhergehen (SEEGERT 1997, HOLDICH 2002).

Tabelle 3: Pilzsystematik (GEDEK 1980) mit Einteilung der für die Krebspestdiagnostik entscheidenden Wasserpilze Mastigomycotina (AINSWORTH et al. 1973).

I. Abteilung: Myxomycota (Schleimpilze)

II. Abteilung: Eumycota (Echten Pilze)

	Unterabteilung	Klasse	Ordnung	Gattung
Höhere Pilze	Ascomycotina (Schlauchpilze)			
	Basidiomycotina (Ständerpilze)			
	Deuteromycotina (Funghi imperfecti)	Blastomycetes	Cryptococcales	Trichosporon Cryptococcus
		Hyphomycetes	Moniliales	Fusarium Ramularia Cephalosporium Didymaria
Niedere Pilze	Mastigomycotina	Coelomycetes		
		Plasmodiophoromycetes		
		Chytridiomycetes		
		Hyphochytridiomycetes		
		Labyrinthulomycetes (FULLER und JAWORSKI 1987)		
		Oomyceten	Lagenidiales	Lagenidium
		Saprolegniales	Achlya Aphanomyces Leptolegnia Saprolegnia Dictyuchus	
		Leptomitales		
	Perenosporales	Phytium		
Zygomycotina	Trichomycetes			

4. Übertragungswege der Krebspest und Infektion der Krebse mit *Aphanomyces astaci*

Die Freisetzung einer großen Anzahl von *Aphanomyces astaci*-Sporen erfolgt bei der Auswachsung des Mycels aus der Kutikula. Bei einem infizierten, für die Krebspest empfänglichen Flusskrebse ist dies bei schwerer Erkrankung oder im Sterben der Fall. Bei den nordamerikanischen Spezies werden Zoosporen nur zum Zeitpunkt der Häutung oder nach deren Tod freigesetzt (OIDTMANN et al. 2002). Laboruntersuchungen haben gezeigt, dass die Zoosporen im Wasser bei 10°C etwa 3-14 Tage überleben können (UNESTAM 1969b, SVENSSON und UNESTAM 1975, MATTHEWS und REYNOLDS 1990, OIDTMANN und HOFFMANN 1998), im Schlamm ebenfalls bis zu 2 Wochen (RENNERFELT 1936).

Die Zoosporen von erkrankten Krebsen oder nordamerikanischen „Carrier“-Krebsen infizieren in Flüssen vor allem flussabwärts lebende Krebspopulationen. Es kann aber auch eine Infektion stromaufwärts erfolgen, wobei hier eine Fortbewegung der infizierten Krebse gegen den Strom erfolgen muss (NYLUND et al. 1993) oder der Erreger wird durch Fische (Forellen, Flussbarsche, Aale und Karpfen), die infizierte Krebse gefressen haben, weiterverbreitet (OIDTMANN et al. 2002).

Häufig ist der Mensch für die Übertragung der Krebspest verantwortlich. Durch den Gebrauch von Netzen, Geräten oder Transportkisten werden Zoosporen verschleppt (RENNERFELT 1936, ALDERMAN et al. 1987).

Vermutlich können Fische nach Sporenkontakt ebenfalls gesunde Flusskrebse infizieren. Es konnte sogar eine Weiterentwicklung von *Aphanomyces astaci* auf Schuppen von Salmoniden *in vitro* beobachtet werden (HÄLL und UNESTAM 1980, HALDER und AHNE 1988).

Zudem konnte nachgewiesen werden, dass Fische (Forellen, Flussbarsche, Aale und Karpfen) nach oraler Aufnahme von infiziertem Krebsgewebe kontaminierten Kot ausscheiden und somit ebenfalls Überträger der Krebspest sein können (OIDTMANN et al. 2002).

Auch die Übertragung durch krebsfressende Wasservögel und Säugetiere könnte somit denkbar sein (SCHÄPERCLAUS 1935). UNESTAM (1973 a) hält eine solche Übertragung für eher unwahrscheinlich. Er konnte beobachten, dass bei Seen, die nur durch Tierfluktuation in Kontakt miteinander standen, keine Übertragung des Erregers durch Wasservögel und Säugetiere stattfand. Auch OIDTMANN et al. (2002) halten diesen Übertragungsweg für unwahrscheinlich. Sie konnten nachweisen, dass bei 37°C nach 12 Stunden keine infektiösen Zoosporen von *Aphanomyces astaci* mehr aufzufinden waren.

Die größte Gefahr geht von ausgesetzten Krebsen aus. Dabei sind an der Verbreitung der Krebspest sowohl infizierte heimische Arten sowie wenig empfängliche nordamerikanische Flusskrebsspezies beteiligt. Die nordamerikanischen Arten sind häufig lebenslang mit dem Krebspesterreger latent infiziert. Die Erkrankung bricht bei ihnen erst aus, wenn die Tiere unter Stress stehen und ihr Immunsystem geschwächt wird. Dies wird beispielsweise durch eine experimentelle Verringerung der zirkulierenden Blutzellen mittels β -1,3-Glukan- oder Zymosaninjektion hervorgerufen (SÖDERHÄLL et al. 1988).

Auch ohne klinische Anzeichen einer Erkrankung können diese Spezies Pilzsporen ausscheiden und somit den Erreger weiterverbreiten (UNESTAM 1973b, VEY et al. 1987).

Die infektiöse Einheit der Krebspest stellt die biflagellate Zoospore von *Aphanomyces astaci* dar. Es wurden Untersuchungen zum asexuellen Entwicklungszyklus von *Aphanomyces astaci in vitro* vorgenommen (CERENIUS und SÖDERHÄLL 1984b, SÖDERHÄLL und CERENIUS 1987). Dabei wurde festgestellt, dass das Vorhandensein von Ca-Ionen für die Entwicklung und Freisetzung motiler Sporen notwendig ist, wogegen Mg^{2+} diese Vorgänge hemmt (CERENIUS und SÖDERHÄLL 1984a).

In Teichen mit 25 mM MgCl-Konzentration im Wasser wurde keine Zoosporenfreisetzung beobachtet (RANTAMÄKI et al. 1992).

Zoosporen weisen eine starke Chemotaxis gegenüber der Hämolymphe von Krebsen auf (UNESTAM 1969a, CERENIUS und SÖDERHÄLL 1984b). Sie dringen bevorzugt an Gelenken und Schreitbeinen in den Krebs ein, da an diesen Stellen die Kutikula sehr dünn und nicht verkalkt ist. Häufig finden sich hier auch kleine Läsionen der Epikutikula, so dass für den Erreger eine weitere Eintrittspforte gegeben ist (UNESTAM 1969c).

Der Prozess der Penetration verläuft folgendermaßen: Die Zoosporen treffen auf die Kutikula, enzystieren sich und bilden nach 1-2 Stunden den Keimschlauch (penetration peg) aus (SVENSSON und UNESTAM 1975). Dieser durchdringt die Epikutikula zunächst überwiegend mechanisch. Dafür eignen sich vor allem die weiche Kutikula am ventralen Abdomen, die Gelenke, die Körperöffnungen und eventuelle Wunden. Die pilzeigenen Enzyme Chitinase und Proteinase sind ebenfalls an der Penetration beteiligt, da die Kutikula aus einer Lipidschicht besteht, deren Hauptbestandteile Chitine und Proteine sind (UNESTAM 1966b, UNESTAM und WEISS 1970, NYHLÉN und UNESTAM 1980, PERSSON et al. 1984, PERSSON und SÖDERHÄLL 1986). Anschließend dringt der Pilz auch in die Leibeshöhle ein, breitet sich entlang des Strickleiternnervensystems aus und durchdringt die Epikutikula auch von innen nach außen (UNESTAM und WEISS 1970).

Sobald ein infizierter Krebs sich häutet oder verendet, müssen sich die Zoosporen von *Aphanomyces astaci* einen neuen Wirt suchen.

Falls die Zoosporen keinen Wirt finden, bilden sich vorübergehend Zysten, die aber nicht in der Lage sind zu keimen. Deshalb entwickeln sich aus ihnen nach einigen Stunden wiederum Zoosporen, die erneut einen Krebs als Wirt suchen. DieserENZYSTISIERUNGsvorgang kann sich mindestens dreimal wiederholen und dadurch die Überlebensdauer der Zoosporen außerhalb des Wirtes auf bis zu 2 Wochen verlängern (UNESTAM 1969a, CERENIUS und SÖDERHÄLL 1984a, CERENIUS und SÖDERHÄLL 1985).

5. Symptome und Pathologie der Krebspest

5.1 Klinische Symptome

Nach Infektion der Krebse folgt zunächst eine Inkubationszeit von ca. 10 Tagen, in der das Verhalten der Tiere weitgehend normal ist. Die Zeitspanne bis zum Auftreten der ersten Symptome ist hierbei sowohl von der Sporendosis als auch von der Umgebungstemperatur abhängig (SCHÄPERCLAUS 1935; ALDERMAN et al. 1987).

Die Autoren MATTHEWS und REYNOLDS (1990) haben den Verlauf der Krebspest in 7 Phasen unterteilt:

1. Phase: Gesunde Tiere

Die Krebse sind nachtaktiv. Bei drohender Gefahr können sie sich durch einen Schlag mit ihrer kräftigen Abdominalmuskulatur blitzartig in einen schützenden Unterschlupf zurückziehen („Fluchtreflex“). Werden die Tiere auf den Rücken gelegt, so können sie sich innerhalb weniger Sekunden wieder aufrichten. Beim Handling drohen sie mit ihren Scheren. Die Antennen sind ständig in Bewegung.

2. Phase: Lethargischer Krebs

Bei Gefahr suchen sie nur langsam Zuflucht. Ihre ganzen Bewegungen laufen verzögert ab. Das Umdrehen vom Rücken auf die Beine dauert länger als 5 Sekunden.

3. Phase: Schwache Tiere

Die Krebse bewegen sich nur wenn sie angetippt werden und dann sind ihre Bewegungen auch nur sehr langsam. Der Schwanzreflex ist nur sehr schwach ausgeprägt. Die Antennen bewegen sich nur geringfügig.

Die Tiere kommen bei Tageslicht aus ihren Verstecken.

4. Phase: Torkelnde Tiere

Dieses Verhalten ist typisch für das Endstadium der Krebspest.

Die Krebse fallen um und richten sich danach wieder auf. Sie haben Probleme bei der Koordination und der Balance.

Die Gliedmaßen und Scheren kratzen sich gegenseitig und kneifen in Beine und Schwanzfächer.

5. Phase: Erschöpfte Tiere

Die Krebse liegen auf dem Rücken oder auf der Seite und haben nicht die Kraft sich aufzurichten. Sie sind zu schwach um sich zu kratzen oder zu kneifen. Die sporadisch auftretenden Bewegungen gleichen „Winkbewegungen“. Es treten Lähmungen einzelner Gliedmaßen auf.

6. Phase: Naher Tod

Die Tiere sind außerordentlich schwach. Beim Hochheben der Krebse hängen ihre Extremitäten schlaff herunter. Selbst wenn die Tiere angestupst werden zeigen sie keine Reaktion.

7. Phase: Tod

Verendete Krebse werden häufig in Rückenlage aufgefunden.

Im Verlauf der Erkrankung kann ein Abfallen einzelner Glieder von Extremitäten beobachtet werden. Ursache hierfür sind die von den Pilzhyphen angegriffenen Gelenke und nicht, wie ursprünglich angenommen, ein Schutzmechanismus der Krebse sich infizierter Gliedmaßen zu entledigen (NYBELIN 1936, MANNSFELD 1942, SCHÄPERCLAUS 1979).

Der Fluchtreflex ist aufgrund der Paralyse des Abdomens nicht mehr auslösbar (UNESTAM und WEISS 1970, ALDERMAN et al. 1984, HALDER et al. 1989).

Die zum Teil auftretenden tetanischen Zuckungen und klonischen Krämpfe sind durch Sekundärinfektionen bedingt (MANNSFELD 1942, SCHÄPERCLAUS 1991).

Die am Ende der Erkrankung scheinbar toten Krebse weisen aber oft noch eine Herztätigkeit auf (BARAN und SOYLU 1989).

Die Inkubationszeit beträgt normalerweise um die 10 Tage. In dieser Zeit sind die Krebse im Verhalten unauffällig oder ein wenig lethargisch. In den darauf folgenden 5-6 Tagen ändert sich dies zusehends und das oben beschriebene charakteristische Torkeln und der häufige Juckreiz lassen sich beobachten. Der Zustand der Krebse verschlechtert sich rapide und meistens verenden die Tiere nach zwei weiteren Tagen (MATTHEWS und REYNOLDS 1990).

5.2 Pathologisch-anatomische Veränderungen

Bei der näheren Untersuchung verendeter oder getöteter Flusskrebse sind gelegentlich bräunliche Flecken in der weichen Kutikula des Abdomens und an den Gelenken erkennbar. Diese Verfärbungen beruhen auf den Melanisierungen der Pilzhyphen (SCHÄPERCLAUS 1935, NYBELIN 1936, MANNSFELD 1942, UNESTAM und WEISS 1970, ALDERMAN et al. 1984, BARAN und SOYLU 1989, MATTHEWS und REYNOLDS 1990).

Zu Melanisierungen kommt es bei pestkranken, empfänglichen Spezies, wenn diese nur mit schwach virulenten *Aphanomyces astaci*-Stämmen infiziert sind (UNESTAM 1981) oder die Infektion nur mit einer geringen Sporendosis erfolgt ist (OIDTMANN, persönliche Mitteilung).

Teilweise können an der weichen Abdominalkutikula, selten an Gelenken, weiße Stellen beobachtet werden, wobei es sich wahrscheinlich um nekrotische Vorgänge der darunter liegenden, normalerweise transparenten, Muskulatur handelt (ALDERMAN et al. 1984, 1987, 1990). Meistens befinden sich in der darüber liegenden Kutikula Pilzhyphen (OIDTMANN und HOFFMANN 1998).

Kurz vor oder nach dem Tod infizierter Krebse kann es zur Ausbildung eines mit bloßem Auge erkennbaren Pilzrasens kommen, der sich über das gesamte Auge zieht oder an der weichen Kutikula gefunden werden kann (MANNSFELD 1942, ALDERMAN et al. 1984, 1987, MATTHEWS und REYNOLDS 1990).

Bei den nordamerikanischen Krebsarten treten die klinischen Symptome und die pathologisch-anatomischen Veränderungen deutlich seltener auf. Häufig sind außer bräunlichen Flecken in der weichen Kutikula keine Hinweise auf eine Infektion gegeben (ALDERMAN et al. 1990).

Werden diese Tiere jedoch Stress ausgesetzt (oder wird ihr Immunsystem supprimiert, so treten bei ihnen ähnliche Veränderungen wie bei den empfänglichen Arten (z.B. Edelkrebs) auf.

5.3 Mikroskopische Veränderungen

Die ersten Hinweise einer Pilzinfektion bei verendeten oder getöteten Krebsen können am einfachsten mit Hilfe einer mikroskopischen Betrachtung der weichen Kutikula des Abdomens oder der Gelenke entnommen werden. Dabei sollten die Präparate möglichst kurzfristig nach dem Verenden entnommen werden. Im Lichtmikroskop können einzelne Pilzhyphen oder bei fortgeschrittenen Infektionen verzweigte Mycele nachgewiesen werden.

Nachdem der Erreger die Epikutikula mittels des Keimschlauches penetriert hat, breiten sich die Hyphen zunächst parallel zu dieser aus. Später dringen sie in tiefere Schichten und sind als dreidimensionales Geflecht im Mikroskop sichtbar (SCHÄPERCLAUS 1935, NYHLÉN und UNESTAM 1975, 1980, HALDER et al. 1989). Sobald die Epidermis von den Hyphen erreicht wird, versuchen Blutzellen diese weitgehend einzukapseln und so ihr Wachstum zu bremsen (UNESTAM 1981, KLÄRDING 2001). Dadurch kann die Invasion in das Hämözöl solange verhindert werden, bis die Tiere kurz vor dem Tod stehen. Dann ist die Immunabwehr durch das enorme Pilzwachstum so geschwächt, dass die Hyphen in das Hämözöl eindringen können (UNESTAM und AJAXON 1978).

NYBELIN (1936) untersuchte verschiedene Krebsorgane mittels methylenblau-gefärbter Quetschpräparate. Er entdeckte Mycel im Nervengewebe, zum Teil auch in der Muskulatur der Krebse und wies Fälle nach, bei denen in der Kutikula keine Pilzhyphen sichtbar waren.

In der Literatur findet man unterschiedliche Angaben hinsichtlich befallener Gewebe. Jedoch sind die Autoren sich einig, dass Nervengewebe und Kutikula am häufigsten von Hyphen durchzogen sind (SCHÄPERCLAUS 1935, RENNERFELT 1936, UNESTAM 1965, 1973, UNESTAM und WEISS 1970, HALDER et al. 1989).

KLÄRDING (2001) hat eine Einteilung vorgenommen um die Befallsstärke der einzelnen Segmente der weichen Abdominalkutikula bei der mikroskopischen Betrachtung abschätzen zu können.

6. Diagnosemöglichkeiten der Krebspest

6.1 Frühe Methode: Pilzanzucht, Sporengewinnung, Neu-Infektion

Das erste Mal wurde der Erreger der Krebspest, *Aphanomyces astaci* im Jahre 1903 von SCHIKORA beschrieben. In den darauf folgenden Jahren konnte diese Entdeckung bestätigt werden (SCHIKORA 1906, NYBELIN 1934).

Heutzutage muss bei einem plötzlichen Massensterben von Krebsen, bei dem die Fauna des Gewässers unverändert ist, als mögliche Ursache immer die Krebspest in Betracht gezogen werden (OIDTMANN und HOFFMANN 1998). Der Verdacht wird erhärtet, wenn zusätzlich die im Kapitel 5.1 aufgeführten Symptome auftreten.

Um eine genaue Diagnose stellen zu können müssen jedoch weiterführende Untersuchungen vorgenommen werden.

Jahrzehntelang wurde ein aufwendiges Nachweisverfahren praktiziert, welches im folgenden Abschnitt detailliert beschrieben werden soll.

Zunächst wird bei einem frisch verendeten Flusskrebs die weiche Abdominalkutikula steril präpariert und die einzelnen Segmente im Lichtmikroskop auf charakteristische Hyphen von *Aphanomyces astaci* untersucht (SCHÄPERCLAUS 1991). Diese haben einen Durchmesser von 6-8 µm, sind unseptiert, haben kein Protoplasma und die Hyphenspitzen sind abgerundet. Jedoch ist dies alleine nicht ausreichend um eine 100% igen Nachweis des Erregers zu gewährleisten. Zusätzlich muss eine Isolierung und Identifikation des Pilzes erfolgen (HALDER et al. 1989, OIDTMANN und HOFFMANN 1998).

Dazu werden die verdächtigen Kutikulastücke auf spezielle Nährböden verbracht und dort der Pilz angezchtet. Zur Anzucht von *Aphanomyces astaci* eignet sich sowohl Pepton-Glukose-1 Agar (PG1; CERENIUS et al. 1984) als auch „River-Glukose-Yeast“ Nährböden (RGY; ALDERMAN und POLGLASE 1986).

In den letzten Jahrzehnten wurden zahlreiche Kultivierungsverfahren von verschiedenen Wissenschaftlern entwickelt (NYBELIN 1934, RENNERFELT 1936, UNESTAM 1965, CERENIUS et al. 1984a, ALDERMAN und POLGLASE 1986, SCHMID 1998, OIDTMANN et al. 1999a).

Eine Erregerisolierung ist nur aus frischem Material möglich. Dafür sollte das Krebsgewebe direkt nach dem Verenden bis spätestens 24 Stunden postmortem gewonnen werden (ALDERMAN und POLGLASE 1986, HALDER und AHNE 1988).

Aus einem latent infizierten nordamerikanischen Flusskrebs konnte auf diese Art der Erreger bislang noch nicht isoliert werden (OIDTMANN, persönliche Mitteilung). Um endgültig die Krebspest nachweisen zu können, müssen die zu untersuchenden Tiere entweder mit gesunden Edelkrebsen zusammengesetzt oder den in-vitro gewonnenen Sporen ausgesetzt werden. Bei einer Mortalität der Edelkrebse von 100 % gilt die Krebspest als bestätigt (OIDTMANN und HOFFMANN 1998, SCHMID 1998).

Dieses Verfahren ist mit einer Dauer von mindestens zwei Wochen langwierig und aufwendig; um schnellere und einfachere Diagnoseverfahren zu finden bedurfte es weiterer Forschungsarbeit.

6.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) eignet sich zum Nachweis reiner Pilzisolat (BAUSEWEIN 1999). Zu diesem Zweck mussten zunächst spezifische Primer entwickelt werden um die DNA des Krebspesterregers *Aphanomyces astaci* zu charakterisieren. Diese neu entwickelten Primer amplifizieren ein 1050 bp Produkt der 28 SrDNA-Region von Pilzen. Zusätzlich müssen Restriktionsenzyme im Anschluss an die PCR hinzu gegeben werden um *Aphanomyces astaci* von den 12 weiteren Pilzen der Ordnung Saprolegniales und den 5 entfernter verwandten Pilzen unterscheiden zu können (OIDTMANN et al. 2002).

Um eine Abgrenzung von *Aphanomyces astaci* gegenüber den anderen *Aphanomyces*-Arten zu gewährleisten, ist ebenfalls eine Restriktionsenzym-Analyse im Anschluss an die PCR notwendig. Zunächst wurden spezifische Primer ausgetestet, die nur die DNA von *Aphanomyces astaci* amplifizieren sollten (SCHAEFERS 2002). Diese Primer wurden mit verschiedenen Pilzen, Hefen, Bakterien, Parasiten sowie mit *Fusarium solani* und *Trichosporon beigelii* überprüft. Man wollte somit einen falsch positiven Krebspestnachweis ausschließen.

SCHAEFERS konnte 2002 den Krebspesterreger (*Aphanomyces astaci*) mit zwei aufeinander folgenden PCRs nachweisen.

In die PCR mit den äußeren Primern wurde ein Aliquot der aus Krebsgewebe isolierten DNA eingesetzt. Im Anschluss daran wurde eine Nested-PCR („verschachtelte PCR“) durchgeführt, bei der eine geringe Menge des erhaltenen PCR-Produkts eingesetzt wurde.

Es wurde angenommen, dass die Primer der Nested-PCR spezifisch für *Aphanomyces astaci* seien. In zahlreichen Versuchsreihen konnte diese Annahme nahezu bestätigt werden.

Außer *Aphanomyces astaci* amplifizieren diese Primern noch die nah verwandte *Aphanomyces*-Art *Aphanomyces invadans*. In einer anschließenden Restriktionsenzym-Analyse können diese beiden Arten unterschieden werden. Bei *Aphanomyces astaci* ist das Produkt nach dem Verdau mit einem Restriktionsenzym in ein kürzeres Fragment gespalten. Dagegen erfolgt bei *Aphanomyces invadans* keine Aufspaltung des Produktes (SCHAEFERS 2002).

Die in die PCR eingesetzte DNA wurde ebenfalls aus der weichen Abdominalkutikula von Edelkrebsen isoliert.

Zur Amplifizierung der meistens Pilze eignen sich die Primer ITS 1 und ITS 4 (WHITE et al. 1990).

Um in einem Flusskrebs den Krebspesterreger nachzuweisen, ist die PCR somit eine zuverlässige und wesentlich schnellere Methode als frühere Untersuchungsverfahren.

7. Immunologische Unterschiede zwischen Edelkrebsen und Signal-/Kambergreben

7.1 Das Immunsystem der Süßwasserkrebse

Crustaceen verfügen über eine Reihe von effektiven Abwehrmechanismen, die zur Abwehr eindringender obligat oder fakultativ pathogener Organismen beitragen.

Die erste mechanische und chemische Barriere stellt das Exoskelett dar (Abbildung 6).

Es schützt teilweise vor pathogenen Eindringlingen sowie vor Flüssigkeitsverlust (SÖDERHÄLL und CERENIUS 1992).

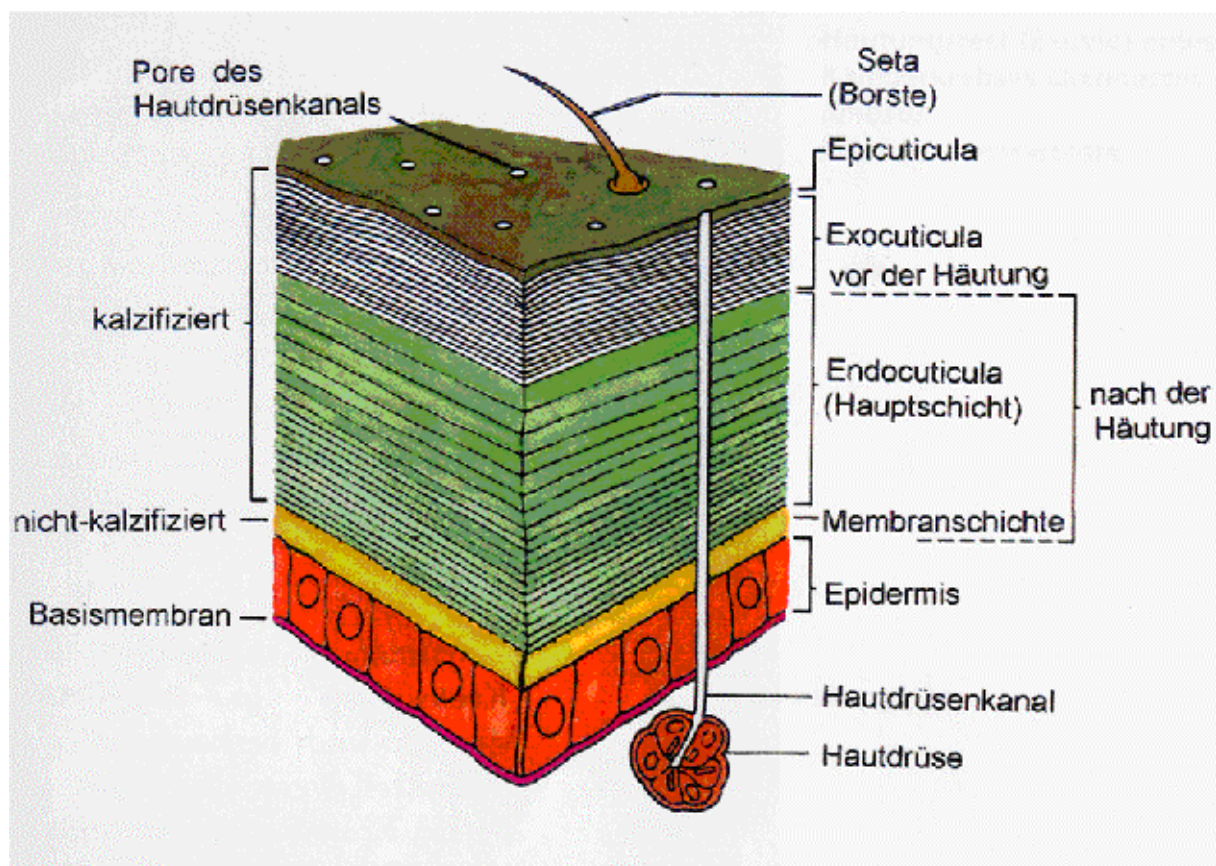


Abbildung 6 : Querschnitt und Aufbau des Exoskelettes eines Flusskrebses.
(aus PÖCKL 1998, nach LOWERY 1988)

Wie Vertebraten verfügen auch Invertebraten sowohl über eine zelluläre (Hämozyten) als auch über eine humorale Immunantwort (ProPO, Proteinaseinhibitoren, Agglutinine, etc.). Im Gegensatz zu den Wirbeltieren fehlen den Wirbellosen jedoch spezifische Immunglobuline (Antikörper), Lymphozyten und immunologisch aktive Proteine des Komplementsystems (SÖDERHÄLL et al. 1988, SMITH und CHRISHOLM 1992, SÖDERHÄLL und CERENIUS 1992, SRITUNYALUCKSANA und SÖDERHÄLL 2000).

Eine besonders wichtige Rolle in der Immunabwehr der Krebse spielt die Hämolymphe.

Sie besteht aus Plasma (Wasser, Ionen, Proteine) und 3 verschiedenen Blutzelltypen:

hyaline Hämozyten, semigranuläre Hämozyten und granuläre Hämozyten

(SÖDERHÄLL und CERENIUS 1992, JOHANSSON et al.2000).

Diese Blutzellen sind für die zelluläre Abwehr der Krebse verantwortlich. Ihr Anteil an der Gesamthämozytenzahl variiert bei den verschiedenen Krebspezies, wie in Tab.4 ersichtlich.

Tabelle 4: Einteilung der Hämozyten (nach SÖDERHÄLL und CERENIUS 1992, modifiziert)

	Hyaline Hämozyten	Semigranuläre Hämozyten	Granuläre Hämozyten
Morphologie	<ul style="list-style-type: none"> - meistens oval oder spindelförmig - mit rundem oder ovalem Kern - der Kern nimmt den Großteil des Zytoplasmas ein - enthalten keine Granula 	<ul style="list-style-type: none"> - spindelförmig - variierender Anteil kleiner, nicht-lichtbrechender Granula 	<ul style="list-style-type: none"> - runde oder ovale Form - exzentrisch gelegener Kern - im Zytoplasma zahlreiche, große, lichtbrechende Granula
Funktion (Zelluläre Immunantwort)	<ul style="list-style-type: none"> - Phagozytose 	<ul style="list-style-type: none"> - begrenzt phagozytosefähig - Erkennung und Abkapselung von Fremdkörpern - zytotoxische Abwehr - Träger der Komponenten des inaktiven ProPO-Systems 	<ul style="list-style-type: none"> - keine Phagozytose oder Abkapselung - zytotoxische Abwehr - Vorratsspeicher für ProPO

Zusätzlich sind die Hämozyten beim Wundverschluss, bei der Wundheilung und bei der Gerinnung der Hämolymphe von Bedeutung (BACHAU 1981, SMITH und SÖDERHÄLL 1983a,b, BANG 1983, SÖDERHÄLL und SMITH 1986).

Die Blutgerinnung, das so genannte „clotting“ stellt einen wichtigen Prozess bei Krebsen dar. Tritt bei einer Verletzung Hämolymphe aus, so muss dieses Leck schnellstmöglich verschlossen werden, da Krebse über ein offenes Kreislaufsystem verfügen und die Gefahr großer Hämolymphverluste gegeben wäre.

Die Gerinnung der Hämolymphe ist vergleichbar mit der Fibringerinnung der Vertebraten und wird durch im Plasma befindliche Koagulantien ermöglicht.

Das Blutgerinnungssystem der Süßwasserkrebse ist vom Enzym Transglutaminase (TGase) und dem zugehörigen Gerinnungsprotein (clotting protein, CP) abhängig.

Dieses Protein ist ein VHDL (very high density lipoprotein)-Dimer, welches aus 210 kDa Untereinheiten besteht. Es enthält freie Lysine und Glutamine, die durch TGasen kovalent aneinander gebunden werden, polymerisieren und in Anwesenheit von Ca^{2+} ein Gerinnsel bilden (SRITUNYALUCKSANA und SÖDERHÄLL 2000).

Zusätzlich sind Agglutinine, Cytokine und mikrobizide Faktoren vorhanden, die zur nicht-zellulären Abwehr zählen und bakteriostatisch/-lytisch, bakterizid, fungitoxisch, antiviral oder cytotoxisch wirken (SMITH und CHISHOLM 1992).

Die bedeutendste Rolle im Immunsystem der Crustaceen kommt, wie bei anderen Arthropoden auch, dem ProPO-System (Prophenoloxidase-System) zu. Es dient der Erkennung und Abwehr körperfremder Stoffe und wird in seiner inaktiven Form in den semigranulären und granulären Hämocyten gespeichert (SMITH und SÖDERHÄLL 1983b).

Die Aktivierung des ProPO-Systems kann sowohl durch geringe Mengen (pg/l) an Lipopolysacchariden LPS (Zellwandbestandteile gramnegativer Bakterien) oder β -1,3-Glukanen (Zellwandbestandteile von Pilzen) als auch durch niedrige Kalziumkonzentration ($< 5\text{mM}$) in der Hämolymphe ausgelöst werden (SÖDERHÄLL 1981, SÖDERHÄLL und HÄLL 1984, SÖDERHÄLL und CERENIUS 1992).

Nach der Degranulation (regulierte Exocytose) der semigranulären Hämocyten folgt die Aktivierung der Enzymkaskade (ProPO-System), bei der die Prophenoloxidase erst in die aktive Form der Phenoloxidase überführt wird. Dies führt schließlich nach mehreren Zwischenschritten zur Bildung von Melanin (UNESTAM und SÖDERHÄLL 1977, SÖDERHÄLL und UNESTAM 1979, SÖDERHÄLL 1981, 1983, SÖDERHÄLL und HÄLL 1984, SÖDERHÄLL 1988, SÖDERHÄLL et al. 1994, SÖDERHÄLL und CERENIUS 1998).

Eine schematische Darstellung des ProPO-Systems ist in **Abbildung 7** ersichtlich.

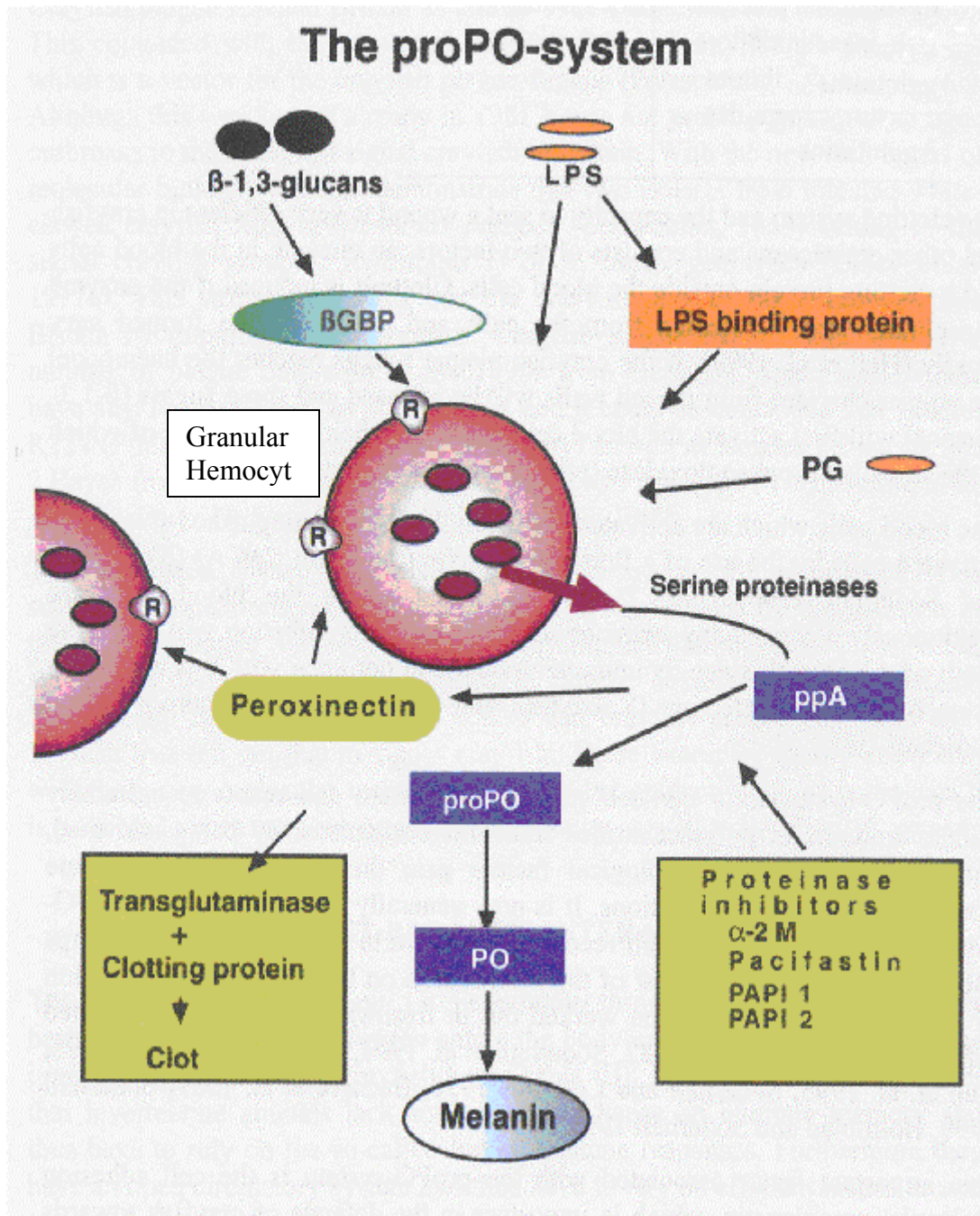


Abbildung 7 : Schematische Darstellung des proPO-Systems in Flusskrebsen:
(nach SÖDERHÄLL und CERENIUS 1999)

Da Invertebraten keine Immunglobuline aufweisen, müssen so genannte PRPs (pattern recognition proteins) als Erkennungsmoleküle die eingedrungenen Fremdstoffe anhand deren Oberfläche identifizieren (SRITUNYALUCKSANA und SÖDERHÄLL 2000).

Folgende Erkennungsmoleküle spielen dabei eine wichtige Rolle:

- β -1,3-Glukan-bindende-Proteine (BGBP) (SÖDERHÄLL et al. 1988, DUVIC und SÖDERHÄLL 1990, 1993)
- Lipopolysaccharid-bindende Proteine (LPS-BP) (DIMOPOULOS et al. 1997)
- Peptidoglykan-bindende Proteine (KANG et al. 1998)

Das β -1,3-Glukan-bindende-Protein (BGBP) ist ein HDL (high density lipoprotein) mit einer Monomer-Masse von 100 kDa (DUVIC und SÖDERHÄLL 1990). Es bildet mit dem β -1,3-Glukan, welches Zellwandbestandteil bei Pilzen ist, einen Komplex (BGBP-L). Dieser wird wahrscheinlich spezifisch an die Hämozytenoberfläche gebunden und induziert die Verbreitung und teilweise Degranulation von granulären Hämozyten (SÖDERHÄLL 1981, DUVIC und SÖDERHÄLL 1992). Zusätzlich fungiert dieses BGBP als Opsonin, welches durch Anlagerung an körperfremde Substanzen deren Phagozytose begünstigt.

Die Lipopolysaccharid-bindenden Proteine (LPS-BP) werden auch GNBPs (gram negative bacterial binding proteins) genannt, da sie an LPS, die in Zellwänden Gram-negativer Bakterien vorkommen, koppeln. Dadurch wird die Aktivierung des ProPO-Systems der semigranulären Hämozyten hervorgerufen (SRITUNYALUCKSANA und SÖDERHÄLL 2000). Bisher sind 6 verschiedene LPS-bindende Proteine bekannt. Vier davon konnten aus der Hämolymphe von Insekten, eines aus der Coelomflüssigkeit eines Wurmes und eines aus der Hämolymphe des Signalkrebses (*Pacifastacus leniusculus*) isoliert werden.

Bei den granulären Hämozyten kann die Degranulation (regulierte Exozytose) nicht wie bei den semigranulären Zellen durch Polysaccharide hervorgerufen werden (JOHANSSON und SÖDERHÄLL 1985). Auslöser sind hier entweder das endogene Krebsprotein Peroxinectin (76kDa) oder das β -1,3-Glukan-bindende Protein (BGBP) nach dessen Kopplung an ein β -1,3-Glukan. Dieser Komplex bindet dann an einen spezifischen Rezeptor auf den granulären Hämozyten. Dies zieht die Freisetzung des ProPO-System nach sich. Im Anschluss daran wird die inaktive Prophenoloxidase (ProPO) durch eine Serin-Protease (Prophenoloxidase-aktivierendes Enzym, ppa) in die aktive Form Phenoloxidase (PO) überführt. Der genaue Aktivierungsablauf ist jedoch noch nicht bekannt (SRITUNYALUCKSANA und SÖDERHÄLL 2000).

Die aktivierte Phenoloxidase katalysiert die O-Hydroxilierung von Monophenolen und die Oxidation von Phenolen zu Quinonen. Dadurch wird Tyrosin zu DOPA umgewandelt, welches anschließend zu Dopa-Quinon überführt wird und über mehrere Zwischenschritte schließlich zur Bildung von Melanin führt (SÖDERHÄLL und CERENIUS 1992, SRITUNYALUCKSANA und SÖDERHÄLL 2000).

Ergänzend zum ProPO-System werden während der Aktivierung der Enzymkaskade toxische Metaboliten synthetisiert, die fungistatisch wirken (SRITUNYALUCKSANA und SÖDERHÄLL 2000), extrazelluläre Proteine und Chitinasen hemmen und somit eine weitere Ausbreitung der Infektionserreger verhindern (SÖDERHÄLL und CERENIUS 1992).

Das bereits erwähnte endogene Krebsprotein Peroxynectin (76kDa) ist ein Zelladhäsionsfaktor, der 1988 das erste Mal von JOHANNSON und SÖDERHÄLL aufgereinigt wurde. Dieses Protein wird in den granulären Hämocyten gebildet und dort in seiner inaktiven Form in den Granula gespeichert.

Nachdem es außerhalb der Zellen aktiviert wird kommen ihm folgende Funktionen zu (SRITUNYALUCKSANA und SÖDERHÄLL 2000):

- Zelladhäsion der Hämocyten
- Degranulation des proPO-Systems bei granulären Hämocyten
- Wirkung als Opsonin (Phagozytose)
- Peroxidase-Aktivität

Die Funktion des Immunsystems der Flusskrebse ist zudem auch von Umweltfaktoren abhängig. Ist ein Tier durch Umweltveränderungen (Temperatur, Licht, Futter, Verschmutzungen, etc.) gestresst, so zieht dies eine Verminderung der in der Hämolymphe zirkulierenden Zahl an Hämocyten nach sich. Die ProPO-Aktivierung wird gesenkt und die Phagozytosereaktionen sind reduziert (SMITH und CHISHOLM 1992).

7.2 Immunologische Unterschiede zwischen Edelkrebsen und Signalkrebsen

Die verschiedenen Krankheitsausprägungen nach Infektion mit dem Krebspesterreger *Aphanomyces astaci* bei empfänglichen und resistenten Krebsarten lassen vermuten, dass es Unterschiede in deren Immunsystem gibt.

UNESTAM (1969a, 1972, 1975) und UNESTAM und WEISS (1970) konnten mit zahlreichen Untersuchungen beweisen, dass Signalkrebse (*Pacifastacus leniusculus*) weitaus weniger empfänglich für den Erreger der Krebspest sind als die europäischen, australischen und asiatischen Arten.

Da bei nordamerikanischen Flusskrebsen die Erkrankung nur unter Einfluss von Stressoren ausbricht, werden diese auch als resistente Arten bezeichnet (SÖDERHÄLL und CERENIUS 1992). PERSSON und SÖDERHÄLL (1983) und PERSSON et al. (1987) schwächten deren Immunsystems durch eine Injektion von Zymosan (Hefezellwandbestandteil), welches eine mindestens 6-stündige Absenkung der Hämozytenkonzentration in der Hämolymphe zur Folge hatte. Die daraufhin verendeten Signalkrebse wiesen außer melanisierten Hyphen bei der Sektion keinerlei Anzeichen einer Infektion mit *Aphanomyces astaci* auf.

Den Pilzhyphen gelingt es über Hautwunden in die sehr widerstandsfähigen Signalkrebse einzudringen. Dort werden sie sofort Melanisierungsprozessen unterzogen, um ein weiteres Wachstum des Erregers zu verhindern.

Bei Edelkrebsen hingegen werden die Pilzhyphen sehr viel langsamer melanisiert und ihr Wachstum, das meist parallel zu den Chitinfibrillen verläuft (NYHLEN und UNESTAM 1980), wird durch Wundreaktionen kaum beeinträchtigt.

Somit scheint der Unterschied zwischen resistenten und empfänglichen Spezies hauptsächlich im unterschiedlich starken Melanisierungsgrad zu liegen.

Bei den resistenten nordamerikanischen Krebsen lassen sich starke Melanisierungen im Bereich der weichen Abdominalkutikula beobachten, welche sich als fleckige Braunfärbungen darstellen (UNESTAM 1969c, 1975).

JÄRVENPÄÄ et al. (1987) stellten fest, dass die Zusammensetzung der Hämolymphe von mit *Aphanomyces astaci* infizierter Signalkrebse nur geringgradig von der gesunder Tiere abweicht. Dagegen kann in der Hämolymphe von infizierten Edelkrebsen (*Astacus astacus*) ein Anstieg des Gehaltes an Glucose, Laktat und Ca^{2+} und ein Abfall der Na^{2+} , K^{+} und Cl^{-} Werte im Vergleich mit gesunden Krebsen beobachtet werden.

Die durch die Hämozyten hervorgerufene stärkere Hemmung der pilzeigenen Chitinase stellt bei der Abwehr der Pilzinfektion einen weiteren Vorteil für die Signalkrebse gegenüber den Edelkrebsen dar (UNESTAM 1969c).

Bei Signalkrebsen (*Pacifastacus leniusculus*) liegt die Anzahl an Hämozyten pro Milliliter Hämolymphe (total haemocyte count = THC) sowohl bei gesunden als auch bei kranken Tieren immer höher als bei den Edelkrebsen (*Astacus astacus*). SUKRAKANCHANA et al. (2001) haben die Anzahl an Hämozyten bei 6 verschiedenen Gruppen, die unterschiedlichen Einflüssen unterlagen, verglichen. Der signifikanteste Unterschied zwischen Signal- und Edelkrebsen bestand in der Gruppe, die seit 3 Wochen mit der Krebspest infiziert waren. Hier reduzierte sich die Anzahl der Hämozyten pro Milliliter Hämolymphe bei den Edelkrebsen gegenüber der Kontrollgruppe, wobei die Signalkrebse gegenüber ihrer Kontrollgruppe einen deutlichen Anstieg der Hämozytenzahl verzeichnen konnten. Des Weiteren konnte ein erheblicher Unterschied in der Phenoloxidase-Aktivität der beiden Spezies festgestellt werden. Es wurden wiederum 6 verschieden behandelte Gruppen verglichen. Dabei ist die Phenoloxidase-Aktivität der seit 3 Wochen mit Krebspest infizierten Signalkrebse ca. um das 8-fache im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe gestiegen. Bei den Edelkrebsen konnte stattdessen in dieser Gruppe ein Rückgang der Aktivität der Phenoloxidase gegenüber ihrer Kontrollgruppe beobachtet werden. Im Gegensatz zu den von SUKRAKANCHANA (2002) gemachten Untersuchungen stehen frühere Berichte von UNESTAM (1981), der keinen Unterschied der Phenoloxidaseaktivität der beiden Spezies vermutete.

8. Bekämpfung und Prävention

Bei der Krebspest handelt es sich um eine hochinfektiöse Erkrankung, die sich über fast ganz Europa erstreckt.

Da auch in Zukunft Krebspestausbürche unvermeidlich sein werden, liegt das Hauptinteresse in der Verhinderung der Erregerverbreitung.

Für die Verschleppung der Seuche sind sowohl belebte als auch unbelebte Vektoren verantwortlich. Als belebte Vektoren kommen Wassersportler, wie Surfer und Schwimmer, oder vor allem Angler in Frage. Mit ihren Netzen, Keschern und Gummistiefel (unbelebte Vektoren) können sie Zoosporen von einem Gewässer ins andere verschleppen (OIDTMANN und HOFFMANN 1998).

Vor allem im feuchten Milieu haben die Zoosporen von *Aphanomyces astaci* eine hohe Tenazität und können bis zu zwei Wochen überleben.

Eine Möglichkeit die Verbreitung des Erregers zu verhindern liegt im Errichten so genannter Krebsperren in fließenden Gewässern. Dadurch kann die Wanderung von Krebsen stromaufwärts unterbunden werden (OIDTMANN und HOFFMANN 1998).

Um nach einem Krebspestausbürch kontaminierte Gegenstände zu desinfizieren eignen sich gängige Desinfektionsmittel, wie z.B. Jodoform oder Wasserstoffperoxyd. Da Zoosporen im Trocknen nicht lange lebensfähig sind, können Fischereigeräte mittels Durchtrocknung von eventuell anhaftenden Sporen befreit werden. Es muss allerdings auf eine vollständige Trocknung des Materials geachtet werden, wofür normalerweise 48 Stunden Sonnenlicht (UV-Licht) ausreichen. Aufgewickelte Angelschnüre oder zusammengelegte Netze weisen häufig noch nasse Stellen auf und können somit für ein Überleben des Erregers sorgen (OIDTMANN und HOFFMANN 1998).

Eine weitere Möglichkeit der Zerstörung der Zoosporen kann durch Kälte- oder Wärmeeinwirkung erfolgen. Der Erreger wird bei -20°C nach 2 Stunden oder bei 30°C nach 30 Stunden abgetötet (PERSSON und SÖDERHÄLL unveröffentlicht, zitiert bei SMITH und SÖDERHÄLL 1984).

Am schnellsten und einfachsten lassen sich infizierte Flusskrebse dekontaminieren, indem sie 1 Min. bei 100°C gekocht werden (OIDTMANN et al. 2002).

Wegen des hohen Verbreitungsgrads und der Unkontrollierbarkeit des Faktors Mensch, werden Krebspestausbürche auch in Zukunft weiterhin auftreten.

Die Prävention liegt daher vor allem in der Aufklärung involvierter Personenkreise. Dies geschieht in Deutschland bislang in der Fischerprüfung und in der Ausbildung zum

Gewässerwart. Außerdem tragen Artikel in Fischereizeitschriften zur Aufklärung von Anglern bei (KELLER 1997, TROSCHER 1997, OIETMANN und HOFFMANN 1998).

Dabei ist insbesondere die Unterscheidung der heimischen von den fremden Krebspezies von Bedeutung.

Flusskrebse, die von Anglern als Köder eingesetzt werden, sollten zuvor abgekocht werden.

Um eine Bestandsreduktion der nordamerikanischen Krebspopulationen, und damit eine Reduzierung des Krebspesteregens zu erreichen, sollten regelmäßige Krebsabfischungen durchgeführt werden (OIETMANN und HOFFMANN 1998). Zusätzlich können krebsfressende Fischarten (Aal, Barsch, Hecht) in dicht besiedelte Gewässer ausgesetzt werden.

Dagegen wird der Einsatz von Pestiziden abgelehnt, da hiervon das gesamte Ökosystem betroffen wäre.

Des Weiteren müssen Privatpersonen über die Gefahr des Aussetzens nicht heimischer Flusskrebse aufgeklärt werden. So werden Flusskrebse aus Aquarien, Gartenteichen oder solche, die zu Speisezwecken erworben wurden, wieder in der Natur ausgesetzt und können so als Überträger der Krankheit die Krebsbestände im jeweiligen Ökosystem gefährden.

Flusskrebse sind Gegenstand unterschiedlicher Gesetze und Verordnungen.

In Deutschland regelt das Bundesnaturschutzgesetz (BNatSchG) und darauf basierend die Bundesartenschutzverordnung (BArtSchV) die Erhaltung der natürlichen Lebensräume und die Förderung des Artenschutzes. Im Anhang 1 der Bundesartenschutzverordnung werden Edelkrebs und Steinkrebs als besonders geschützte Arten genannt.

Im Bundesnaturschutzgesetz steht die Definition von heimischer Art:

„eine wildlebende Tierart, die ihr Verbreitungsgebiet oder regelmäßiges Wanderungsgebiet ganz oder teilweise

a) im Inland hat oder in geschichtlicher Zeit hatte

b) auf natürliche Weise in das Inland ausdehnt;

als heimisch gilt eine wildlebende Tierart auch, wenn sich verwilderte oder durch menschlichen Einfluss eingebürgerte Tier der betreffenden Art im Inland in freier Natur und ohne menschliche Hilfe über mehrere Generationen als Population erhalten.“

Hierunter fallen nicht nur die ursprünglich einheimischen Flusskrebse Edelkrebs (*Astacus astacus*), Steinkrebs (*Austropotamobius torrentium*) und Dohlenkrebs (*Austropotamobius pallipes*) sondern auch die eingeführten Arten Galizierkrebs (*Astacus leptodactylus*), Kamberkrebs (*Orconectes limosus*), Signalkrebs (*Pacifastacus leniusculus*) und Roter amerikanischer Sumpfkrebs (*Procambarus clarkii*). Dies stellt ein Problem dar, da die eigentlich „fremden“ Arten Kamber- und Signalkrebs als Hauptverantwortliche der Verbreitung der Krebspest gelten und somit laut Bundesnaturschutzgesetz (BNatSchG) ihre Freisetzung in die Natur nicht verboten ist. Das Verbot bezieht sich lediglich auf die Freisetzung nicht-heimischer Arten. Aber laut Fischereigesetz des Bundeslandes Bayern ist das Aussetzen von Kamberkrebsen, Signalkrebsen und Roten Amerikanischen Sumpfkrebsen untersagt.

Die Fischereigesetze und Verordnungen der einzelnen Bundesländer dienen als anwendbare Bestimmungen. Die Länder sind selbst für ihre Krebsbestände verantwortlich. Dies ist sinnvoll, da die klimatischen Bedingungen, die Wasserqualität etc. sowie die Verbreitung verschiedener Spezies in den einzelnen Ländern variiert. Außer in Bremen gilt in allen Ländern ein Verbot der Freilassung fremder Arten (VON LUKOWICZ 1999). In Bayern muss eine behördliche Genehmigung eingeholt werden, um unter Herkunftsangabe Krebse ins freie Gewässer auszusetzen. Die Freisetzung nicht-heimischer Arten ist hier aber grundsätzlich verboten. Ebenfalls in Bayern existieren Regulierungen bezüglich der Mindestfanglänge für Edelkrebse (12 cm) und Steinkrebse (10 cm). Schonzeiten für ihre Weibchen bestehen vom 1. Oktober- 31. Juli (BOHL 1992).

Bislang konnte in Europa noch keine Überwachung des Importes fremder Spezies gesetzlich festgelegt werden. Die durch die Fischseuchenverordnung umgesetzte EU Richtlinie 91/67/EWG scheint hierfür geeignet. Mit dieser Richtlinie könnten Programmgebiete zum Schutz vor der Krebspest (Anhang A, Spalte 1, Liste III) eingerichtet werden, die bestimmte Gebiete als krebspestfreie Zone deklarieren könnten. In diese Bezirke dürften nur Flusskrebse aus anerkannten und bescheinigten krebspestfreien Regionen eingeführt werden. Somit würde die Verbreitung der Krebspest verhindert werden. In Europa gibt es derzeit keine solche zugelassene krebspestfreie Zone (DEHUS et al. 1999).

Voraussetzung hierfür wäre die genaue Kenntnis und das Monitoring der Krebspopulationen, ihrer Spezieszusammensetzung und ihres Gesundheitsstatus.

Ein weiteres Ziel könnte sein, dass die Krebspest als meldepflichtige Krankheit in das Tierseuchengesetz aufgenommen wird. Schnelle und zuverlässige Nachweismethoden könnten bereits beim Import von Krebsen eine vorhandene Infektion mit *Aphanomyces astaci* nachweisen und somit das Ausbreiten der Krebspest verhindern (DEHUS et al. 1999, VON LUKOWICZ 1999).

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN:

a) Ziel der Untersuchung:

Die vorliegende Arbeit wurde mit dem Ziel angefertigt eine molekularbiologische Methode zur Identifizierung des Krebspesterregers *Aphanomyces astaci* in nordamerikanischen Flusskrebse zu entwickeln.

b) Aufbau der Untersuchung:

Zunächst wurden nordamerikanische Flusskrebse aus verschiedenen Gewässern mit gesunden Edelkrebsen in Kontakt gebracht. Nachdem bei einigen Gruppen die Edelkrebsen, möglicherweise bedingt durch eine Übertragung des Krebspesterregers, gestorben waren, wurden die nordamerikanischen Krebse der entsprechenden Gruppen getötet und untersucht, ob sich mittels DNA-Extraktion und PCR der Erreger der Krebspest nachweisen lässt.

A. Material

1. Versuchstiere:

Für die Untersuchungen wurden 3 Flusskrebsspezies eingesetzt.

Dabei handelt es sich einerseits um zwei nordamerikanische Spezies, den Kamberkreb (*Orconectes limosus*), sowie den Signalkreb (*Pacifastacus leniusculus*) und andererseits um die in Europa heimische Flusskrebart, den Edelkreb (*Astacus astacus*).

Die nordamerikanischen Flusskrebse, die zur Abklärung des „Carrier“-Status als klinisches Untersuchungsmaterial eingesandt wurden, stammten aus unterschiedlichen Gewässern in der Schweiz.

Es wurden Vertreter aus 8 verschiedenen Populationen gefangen und dem Institut für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten übergeben. Diese Krebse wurden gemeinsam mit den Edelkrebsen (*Astacus astacus*) eines deutschen Krebszüchters in den Versuch eingesetzt.

1.1 Herkunft, Größe und Gewicht der nordamerikanischen Flusskrebse

Es wurden 347 nordamerikanische Flusskrebse eingesandt. Bei dem Großteil der Sendung (302 Krebse) handelte es sich um Kamberkrebse (*Orconectes limosus*). Unter den Krebsen befanden sich sowohl weibliche als auch männliche Tiere mit einer Länge zwischen 5,5-10,5 cm und einem Gewicht zwischen 4,7-35,7 g.

Tabelle 5: Herkunft der nordamerikanischen Flusskrebse

Gr.	Krebsart	Anzahl	Herkunft	Größe	Gewicht	Geschlecht
				der in die Versuchsgruppe eingesetzten Krebse		
1	Signalkrebs	45	Solothurn; Aare	5,4 cm – 9,1 cm	4,8 g – 24,7 g	8 männl. 2 weibl.
2	Kamberkrebse	50	Böningen; Depot-See	5,9 cm – 8,0 cm	6,7 g – 18,5 g	9 männl. 1 weibl.
3	Kamberkrebse	50	Tüscherz; Bieler See	5,5 cm – 6,7 cm	4,4 g – 10,9 g	6 männl. 4 weibl.
4	Kamberkrebse	50	Port; Aare	5,5 cm – 7,2 cm	4,7 g – 11,4 g	1 männl. 9 weibl.
5	Kamberkrebse	45	Bannwil; Aare-Stau	6,1 cm – 8,2 cm	7,4 g – 16,8 g	9 männl. 1 weibl.
6	Kamberkrebse	50	Estavayer le Lac; Neuenburger See	8,1 cm – 10,4 cm	18,1 g – 43,4 g	7 männl. 3 weibl.
7	Kamberkrebse	50	Murten; Murtensee	7,2 cm – 10,5 cm	8,4 g – 35,7 g	7 männl. 3 weibl.
8	Kamberkrebse	7	Nördl. Fribourg; Schiffenensee	7,0 cm – 9,5 cm	10,7 g – 27,8 g	6 männl. 1 weibl.

1.2 Herkunft, Größe und Gewicht der Edelkrebse

In den Versuch wurden 40 krebspestfreie Edelkrebse (*Astacus astacus*), die von einem deutschen Krebszüchter stammten, eingesetzt. Bei den Tieren handelte es sich um weibliche und männliche Exemplare mit einer Länge von 6,4-11,2 cm und einem Gewicht von 5,9 -44,0 g.

2. Molekularbiologische Reagenzien und Kits

2.1 DNA-Extraktion

Material:

DNeasy[®] Tissue Kit (Qiagen)
 DNeasy[®] Stool Kit (Qiagen)
 Ethanol \geq 99.9% (Rotisol[®])

2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR):

Reagenzien:

Aqua inject.

10x PCR-Puffer	(GeneAmp 10X PCR Gold Puffer)	}	AmpliTaq Gold [®] with GeneAmp 10x PCR Buffer; Applied Biosystems
25 mM MgCl ₂	(Magnesiumchlorid)		
Taq DNA Polymerase (AmpliTaq Gold [®])			
dNTPs	(Desoxynucleosidtriphosphate) (Roth)		
Primer	(Metabion)		
PCR Optimizer [™] Kit (Invitrogen, K 1220-01)			

Material:

Thermocycler, Mastercycler gradient[®] (Eppendorf Gerätebau GmbH, 531 000.010)

2.3 Gelelektrophorese:

Material:

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

DNA-Größenmarker 100 bp Ladder (Roth, GenSura)

6x Gel loading buffer (Roth, Gensura)

50x TAE Elektrophorese-Puffer:

Trizma[®] Base Molecular Biology Reagent (Sigma-Aldrich)

EDTA Molecular Biology Reagent (Sigma-Aldrich)

Acetic Acid Glacial (Essigsäure) (Sigma-Aldrich)

Ethidiumbromid (10 mg/ml) (BioRad)

2.4 Aufreinigung von erhaltenen PCR-Produkten:

QIAquick[®] PCR Purification Kit (Qiagen)

2.5 Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP):

Restriktionsenzym: *Hph I* (New England Biolabs)

2.6 Sequenzierung der Amplifikate:

Automatische Sequenzierung

(GENterprise, Gesellschaft für Genanalyse und Biotechnologie mbH)

3. Geräte

BioPhotometer 6131 (Eppendorf Gerätebau GmbH)

Elektrophorese-Kammern, 3 verschiedene Größen (Sub-Cell GT) (BioRad)

Hochgeschwindigkeitszentrifuge, Typ Biofuge Stratos (Heraeus Instruments GmbH)

Mikroskop Axiolab (Carl Zeiss Mikroskopie)

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)

Variable Mikroliter-Pipetten: 0,1-5, 2-20, 10-100, 100-1000 µl (Eppendorf Gerätebau GmbH)

4.2 PG₁-Medium und Agar (Pepton-Glucose-Agar)

Fleischpepton, tryptisch verdaut	3 g (Oxoid)
D(+)-Glucose-Monohydrat	6 g (Merck)
Salz II A	
Phosphat-Puffer	

Jede dieser Zutaten wurde in jeweils 100 ml Aqua dest. gelöst und separat autoklaviert. Zusätzlich wurden noch 600 ml Aqua dest. autoklaviert. Nach Abkühlen der Reagenzien wurden diese unter sterilen Bedingungen zu 1000 ml zusammengemischt.

Um den PG₁-Agar zu erhalten wurde zu 1000 ml Medium 15 g Agar bacteriological (Oxoid) dazugegeben und ein weiteres Mal autoklaviert (15 Min./ 120°C).

Zusammensetzung vom Salz II A

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

Zusammensetzung des Phosphat-Puffers (pH 6,7)

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

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

TAE-Puffer 50x :

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

TAE-Gebrauchslösung 1x:

TAE 50x	20 ml
Aqua dest.	980 ml

4.4 dNTP-Mix für die PCR

dNTP-Set 1 (Roth)

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

wurden gemischt und mit Aqua dest. 1:10 verdünnt (10 mM; 2,5 mM je dNTP).

5. Oligonukleotid-Primer

Die Primer wurden von der Firma Metabion GmbH (Martinsried) bezogen.

Zum Nachweis des Pilzes *Aphanomyces astaci* wurden 2 Primerpaare (80/640 und 525/640) eingesetzt.

Zum Nachweis von Krebsgewebe wurden die spezifischen Dekapoden-Primer (143/145) verwendet.

Tabelle 6: Sequenzen der Primer

Primernummer		DNA-Sequenz (5' → 3')	Referenz
80	F	5'- GCT TGT GCT GAG GAT GTT CT – 3'	Vorliegende Arbeit
640	R	5' – CTA TCC GAC TCC GCA TTC TG – 3'	OIDTMANN et al. unveröffentlicht
525	F	5'- AAG AAG GCT AAA TTG CGG TA – 3'	OIDTMANN et al. unveröffentlicht
640	R	5' – CTA TCC GAC TCC GCA TTC TG – 3'	OIDTMANN et al. unveröffentlicht
143	F	5' – TGC CTT ATC AGC T(AGCT)T CGA TTG TAG – 3'	LO et al.1996
145	R	5' – TTC AG(AGCT) TTT GCA ACC ATA CTT CCC – 3'	LO et al.1996

F: Forward Primer R: Reverse Primer

B. Methoden

1. Entwicklung einer Methode zur Testung nordamerikanischer Flusskrebse auf ihren Carrier-Status betreffend *Aphanomyces astaci*

1.1 Sektion der verendeten Krebse

Um ein ausgezeichnetes Hyphenwachstum bei den verendeten Edel-, Kamber- oder Signalkrebs hervorzurufen, wurden die frisch toten Tiere aus dem Becken entfernt und bis zum nächsten Tag in ein mit Leitungswasser gefülltes Einmachglas bei Raumtemperatur gelegt. Am darauf folgenden Tag wurden diese Krebse seziiert. Zunächst wurde das Extérieur beurteilt und mit den Aufzeichnungen („Landkarten“), die vor Versuchsbeginn angelegt wurden, verglichen.

Bei diesen „Landkarten“ handelt es sich um eine Krebskizze, die von jedem Edelkrebs, Signalkrebs und Kamberkrebs zu Beginn angefertigt wurde und in welche die bereits vorhandenen Melanisierungen sowie Gliedmaßenverluste eingezeichnet wurden (vergleichbar mit **Abbildung 10, III.B.1.10**).

Bei der postmortalen Sektion wurde vor allem auf weitere Gliedmaßenverluste und erworbene Melanisierungen an der Abdominalkutikula und an den Beinansätzen geachtet.

Danach wurden 2-3 Segmente der weichen Abdominalkutikula, bevorzugt melanierte Stellen, mit sterilen Instrumenten (Schere, Pinzette, Skalpellklinge) ohne Muskelreste herauspräpariert, auf einen Objektträger gebracht, mit einem Tropfen Wasser und einem Deckgläschen versehen und im Lichtmikroskop bei 10-facher und 40-facher Vergrößerung auf Melanisierungen und Pilzhyphen untersucht.

Dabei kann die Befallsstärke der einzelnen Segmente der weichen Abdominalkutikula bei der mikroskopischen Betrachtung abgeschätzt werden.

KLÄRDING (2001) hat folgende Einteilung vorgenommen: (**Abbildung 9**)

„+ + + +“ wenn von einem Segment > 10% der Fläche;

„+ + +“ wenn 6-10% der Fläche,

„+ +“ bei 2-6% der Fläche und „+“ bei < 2% der Fläche mit Hyphen befallen ist.

Die Segmente, die frei von Pilzhyphen sind, werden als „-“ eingestuft.

Wenn ein Segment keine Hyphen aufweist, aber einige kleine Melanisierungen oder Strukturen, die Keimschläuche darstellen könnten, so wird es mit „+/-“ beurteilt.



Abbildung 8: Signalkrebs, melanisierte weiche Kutikula des Abdomens
(Foto: OI DTMANN)

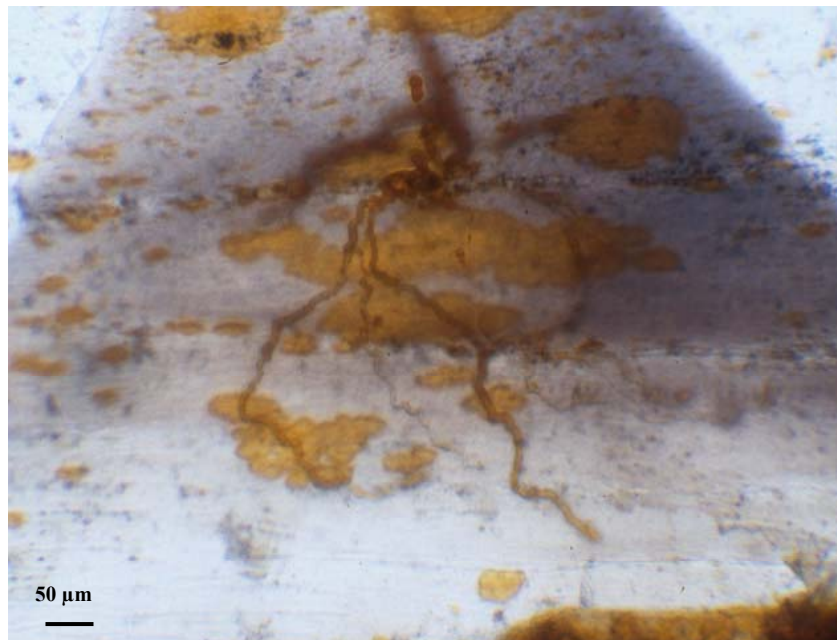


Abbildung 9: mittelgradiger Pilzbefall (+ +) der weichen Kutikula bei einem nordamerikanischen Krebs (Kamberkrebs, *Orconectes limosus*)
(Nativpräparat)

Die veränderten Kutikulastücke wurden daraufhin entweder in 70% igen Alkohol gegeben und zunächst bei -20°C eingefroren oder sofort zur DNA-Extraktion eingesetzt.

1.2 DNA-Extraktion aus Krebsgewebe mittels DNeasy[®]Tissue Kit (Qiagen)

Um den Krebspesterreger *Aphanomyces astaci* mittels PCR nachweisen zu können muss zunächst die Pilz-DNA aus Gewebe des entsprechenden Krebses isoliert werden. Dafür wurden DNA-Extraktionskits der Firma Qiagen[®] verwendet, wobei nach dem beigefügtem Protokoll für DNA-Extraktion aus Insektengewebe vorgegangen wurde. Es musste sehr steril und sauber gearbeitet werden, um eine Kontamination mit Erreger-DNA aus früheren Extraktionen zu verhindern. Deshalb wurden soweit wie möglich Einmal-Artikel gebraucht, wie z.B. Einmalhandschuhe, die während der Extraktion mehrfach gewechselt wurden und Einmalpipetten mit Filter.

Alle Reagenzien wurden dicht verschlossen und örtlich getrennt von jeglicher DNA aufbewahrt. Zur Zerkleinerung der Kutikula wurden sterile Mörser eingesetzt.

Als erstes wurde die laut Kit empfohlene Menge an weicher Kutikula abgewogen und in den mit flüssigem Stickstoff gefüllten Mörser gegeben. Mit dem Stößel wurde die weiche Kutikula ca. 5 Minuten lang zermahlen, bis ein feines, weißes Pulver im Mörser zurückblieb. Das Pulver wurde mittels eines sterilen Löffels in ein autoklaviertes 1,5 ml Eppendorf-Gefäß verbracht und 180 µl ATL-Puffer hinzu gegeben. Nachdem das Gemisch gründlich auf dem Schüttelgerät (Vortex[®]) durchmengt wurde, wurde Proteinase K hinzugefügt. Es folgte eine 1-2 stündige Inkubation bei 56°C im Wasserbad, welche fast zur vollständigen Lyse des Pulvers führte. Unter Verwendung einer speziellen Säule (Spin Column, Qiagen), die 30 mm lang und 9 mm breit ist, mit integrierter Silikagel-Membran und Zugabe verschiedener Puffer, fand eine selektive Bindung der DNA an diese Membran statt. Durch mehrere Zentrifugationsschritte wurden Enzyminhibitoren (Proteine, Kationen, etc.) und Kontaminanten ausgewaschen.

Im letzten Schritt erfolgte die Elution der DNA in 2 x 100 µl AE-Puffer, d.h. Eluat 1 und Eluat 2.

Diese DNA wurde danach, zum molekularbiologischem Nachweis von *Aphanomyces astaci*, in die PCR eingesetzt.

Es wurden außerdem DNA-Extraktionen aus nordamerikanischen Flusskrebse durchgeführt, in die teilweise der komplette Krebspanzer (z.B. 6600 mg) eingesetzt wurden. Diese Menge entsprach der 132-fachen im Protokoll zur DNA-Isolierung aus Insekten des DNeasy[®]Tissue Kit (Qiagen) angegebenen Gewebemenge.

Zunächst wurde der verendete Krebs sezirt und ausgenommen. Anschließend wurde der komplette Krebspanzer gewogen, mit dem Skalpell grob zerkleinert und im Anschluss daran mittels flüssigen Stickstoffs im Porzellanmörser fein zerrieben. Die benötigte Lysispuffer-Menge wurde entsprechend der eingesetzten Gewebemenge vervielfacht und die Inkubationszeit wurde verlängert um eine vollständige Auflösung der Zellen zu erreichen.

Die Eluierung der DNA erfolgte laut Protokoll in 100µl AE-Puffer.

(siehe III.C.2.1; Gr. 2 KK 1 und Gr. 4 KK 5)

1.3 Gewählte Primer

Die *Aphanomyces astaci* spezifischen Primer (80/640) waren schon vor Beginn des Versuchs festgelegt worden (OIDTMANN, unveröffentlicht). Dabei handelt es sich um die äußeren Primer. Die inneren, für die Nested-PCR notwendigen Primer, sind die Primer (525/640).

Um geeignete Oligonukleotid Primer für die Amplifikation von *Aphanomyces astaci* zu designen, wurden verschiedene DNA-Sequenzen, die von der *NCBI Genbank* bezogen wurden, und unveröffentlichte Sequenzen der ITS-Region der Oomycota aligned. Dieses Alignment wurde mit Hilfe einer speziellen Software zur DNA-Analyse (Lasergene for Windows, DNASTAR, Inc., Version 1997) durchgeführt. Nach manueller Überprüfung der Daten wurden zunächst die Primer (80/640) und (525/640) ausgewählt.

Diese beiden Primerpaare waren zu Beginn der Arbeit bereits auf ihre Spezifität hin untersucht worden. Sie wurden mit der DNA folgender Organismen getestet:

Aphanomyces astaci, *Aphanomyces invadans*, *Aphanomyces iridis*, *Aphanomyces cladogamus*, *Aphanomyces brassicae*, *Saprolegnia litoralis*, *Saprolegnia parasitica*, *Saprolegnia furcata*, *Saprolegnia terrestris*, *Isoachlya eccentrica*, *Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei*, *Thelohania contejeani*, *Fusarium solani* und *Aspergillus sp.*. Außerdem wurde die Wirts-DNA in eine PCR mit den Primern (80/640 und 525/640) eingesetzt, um sicherzustellen, dass die entwickelten Primer nicht homolog zu Sequenzen der Krebs-DNA waren. Es wurde dafür DNA aus der Muskulatur folgender Krebse extrahiert: *Astacus astacus* und *Pacifastacus leniusculus* (OIDTMANN, unveröffentlicht).

Dabei erwiesen sich die Primerpaare (80/640) für die äußere und (525/640) für die innere PCR als spezifisch für *Aphanomyces astaci* und *Aphanomyces invadans*.

Um einen optimalen Erfolg dieser Primer zu gewährleisten, wurden die PCR-Bedingungen optimiert (siehe **III.B.1.5 + III.C.1.3**), d.h. es wurden verschiedene Annealing-Temperaturen, Zyklenzahlen, Konzentrationen an MgCl₂, dNTPs und Taq-Polymerase ausgetestet um die bestmöglichen Resultate zu erhalten.

1.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR stellt ein in-vitro-Verfahren dar, in welchem eine selektive Anreicherung von Genom-Abschnitten mit definierter Länge und Sequenz, stattfindet. Sie wurde 1985 von MULLIS in den USA entwickelt. Um den gewünschten Genom-Abschnitt zu vervielfältigen nutzt man die Fähigkeit der hitzebeständigen Taq-Polymerase (Enzym aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus*) zur DNA-Strang Synthese aus. Das Enzym synthetisiert aus einem Gemisch von dNTPs den komplementären Zweitstrang zu der zunächst einzelsträngig vorliegenden Matrix-DNA (Ausgangs-DNA). Als Starter werden kurze einsträngige DNA-Abschnitte eingesetzt, sogenannte Primer, die komplementär zu den Enden einer definierten Sequenz der DNA-Matrize sind.

Im ersten Schritt der PCR wird der DNA-Doppelstrang, der als Matrize (Template) im Gemisch enthalten sein muß, durch Hitzedenaturierung in Einzelstränge aufgeteilt. Der große Vorteil der Taq-Polymerase besteht darin, daß sie wenig hitzeempfindlich ist und selbst bei Temperaturen von 96°C noch stabil ist und somit diesen ersten Schritt übersteht.

Als zweiter Schritt erfolgt das Annealing, d.h. die Hybridisierung der Primer an die komplementären Einzelstränge. Diese doppelsträngigen Bereiche stellen die Anfangspunkte für die Kettenverlängerung durch die Taq-Polymerase dar (3.Schritt). Es entstehen neue Doppelstränge, die im nächsten Zyklus durch Erhitzen wiederum in Einzelstränge aufgeteilt werden und somit erfolgt eine Vervielfältigung der Matrizen und der doppelsträngigen DNA.

Normalerweise läuft je nach Produkt die PCR über 25 bis 35 Zyklen.

Bei höheren Rundenzahlen erhöht sich die Gefahr des Auftretens unerwünschter Artefakte, außerdem kann die Menge der gewonnenen DNA meist nicht gesteigert werden.

Die PCRs wurden im Thermocycler (Mastercycler gradient[®], Eppendorf Gerätebau) unter standardisierten Bedingungen durchgeführt.

Dabei wurde zunächst eine PCR mit dem Einsatz von 2 µl genomischer DNA, die immer aus Eluat 2 der DNA-Extraktion stammte, durchgeführt. Gleich im Anschluss daran erfolgte eine (Semi) Nested-PCR in die 1 µl des PCR-Produkts, der vorangegangenen PCR eingesetzt wurde. Bei der PCR wurden die sogenannten „äußeren“ Primern 80 und 640 verwendet und bei der (Semi) Nested-PCR kamen die „inneren“ Primer 525 und 640 zum Einsatz.

1.5 Optimierung der PCR-Protokolle

Um die bestmögliche Zusammensetzung des PCR-Ansatzes sowie die optimalen Bedingungen im Thermocycler für das neue Primerpaar herauszufinden, wurden die einzelnen Parameter ausgetestet (siehe III.C.1.3).

Für die Primerkombination 525/640 bestand bereits ein optimiertes PCR-Protokoll (SCHAEFERS, 2002) welches weitgehend übernommen wurde.

Dagegen musste für die neu konstruierten Primer 80/640 das Protokoll noch optimiert werden. In die Optimierungsreaktionen für die Primer 80/640 wurden jeweils 2 µl DNA eingesetzt. Dabei wurde nach einem Protokoll (siehe S.57) vorgegangen, bei dem bei jedem Schritt immer nur ein Parameter ausgetestet werden konnte.

a) Optimierung der MgCl₂-Konzentration

Um die richtige Zusammensetzung des Puffers herauszufinden wurde das PCR Optimizer Kit[™] (Invitrogen) eingesetzt. Dies enthält 7 Puffer mit unterschiedlichen Magnesiumchlorid-Konzentrationen und variierenden pH-Werten.

b) Optimierung der Annealing-Temperatur und Zyklenzahl

Um eine Vorstellung des Temperaturoptimums zu erhalten, bedient man sich der Vorgaben der Schmelztemperaturen der Primer. Im vorliegenden Fall betrug die berechnete Schmelztemperatur für den 80er Primer 57,3°C und für den 640er Primer 59,4°C. Als Mittelwert wurde 58°C gewählt. Unter Verwendung des Gradientencyclers konnten unterschiedliche Temperaturen getestet werden.

Gleichzeitig wurde eine Groboptimierung der Zyklenzahlen (30 und 45 Zyklen) vorgenommen.

c) Zyklenzahl-Optimierung

Nachdem im vorhergegangenen Schritt die Zyklenzahl grob optimiert wurde, erfolgte eine exakte Optimierung.

Die PCR (Primer: 80/640) wurde mit folgenden Zyklenzahlen durchgeführt:

30; 35; 40; 45; 50

d) Optimierung der dNTP-Konzentration

Es wurden unterschiedliche Mengen an dNTPs (10mM) in den Mastermix eingesetzt, um den bestmöglichen Wert zu ermitteln.

e) Optimierung der Primer-Konzentration

Um die optimale Primerkonzentration herausfinden zu können, wurden unterschiedliche Mengen der Primer 80/640 (50 μ M) eingesetzt.

f) Optimierung der Taq-Konzentration

Es wurden zunächst Taq-Polymerasen unterschiedlicher Hersteller ausprobiert, von denen sich die AmpliTaq Gold[®] (5U/ μ l) als am besten geeignet auszeichnete.

Danach wurde die Optimierung der Taq-Konzentration vorgenommen.

Somit war die Optimierung des Protokolls abgeschlossen und die nachfolgenden PCRs wurden mit den optimierten Parametern durchgeführt (siehe **III.C.1.3.**).

Das optimierte Protokoll der PCRs sah folgendermaßen aus:

PCR mit den äußeren Primern 80/640

MASTERMIX

Bestandteile	Primer 80/640	
	Volumen je Einzelreaktion	Endkonzentration
Aqua inject.	32,6 µl	
10xPCR-Puffer*	5 µl	1x
MgCl ₂ (25 mM)*	5 µl	2,5 mM
dNTPs (10 mM)	2,5 µl	125 µM je dNTP
Primer 1 (50 µM)	1,25 µl	1,25 µM
Primer 2 (50 µM)	1,25 µl	1,25 µM
Taq-Polymerase (5 U/µl)*	0,4 µl	2,0 U
	48 µl	
Template DNA	+ 2 µl	
	50 µl	
Endvolumen		

*AmpliTaq Gold[®]

Im Thermocycler läuft folgendes Programm ab: **AC30Diss**

Initiale Denaturierung	T=96°C 5 Min.
Anzahl der Zyklen	30
Denaturierung	T=96°C 1 Min.
Primer-Annealing	T=59°C 1 Min.
Extension	T=72°C 1 Min.
Finale Extension	T=72°C 5 Min.

♦ vom Hersteller (metabion GmbH) angegebene Schmelztemperatur: Primer 80: 57,3 °C;
Primer 640: 59,4 °C

Erwartete Produktlänge bei diesem Primerpaar: **560 bp**

(Semi) Nested-PCR („verschachtelte“ PCR) mit den inneren Primern 525/640

MASTERMIX

Bestandteile:	Primer 525/640 Volumen je Einzelreaktion	Endkonzentration
Aqua inj.	34,45 µl	
10xPCR-Puffer*	5 µl	1x
MgCl ₂ (25 mM)*	3 µl	1,5 mM
dNTPs (10 mM)	3,75 µl	187,5 µM je dNTP
Primer 1 (50 µM)	1,25 µl	1,25 µM
Primer 2 (50 µM)	1,25 µl	1,25 µM
Taq-Polymerase (5 U/µl)*	0,3 µl	1,5 U
	49 µl	
PCR-Produkt	+ 1 µl	
	50 µl	
Endvolumen		

*AmpliTaq Gold®

Im Thermocycler läuft folgendes Programm ab: **NS40**

Initiale Denaturierung	T=96°C 5 Min.
Anzahl der Zyklen	40
Denaturierung	T=96°C 1 Min.
Primer-Annealing ♦	T=59°C 1 Min.
Extension	T=72°C 1 Min. 30 Sec.
Finale Extension	T=72°C 7 Min.

♦ vom Hersteller (metabion GmbH) angegebene Schmelztemperatur: Primer 525: 53,2 °C;
Primer 640: 59,4 °C

Erwartete Produktlänge bei diesem Primerpaar: **125 bp**

1.6 Aufreinigung der PCR-Produkte

Damit die erhaltenen PCR-Produkte in den anschließenden Verdau zur Differenzierung von *Aphanomyces astaci* und *Aphanomyces invadans* eingesetzt werden konnten, mussten diese zunächst aufgereinigt werden. Hierzu wurde das QIAquick[®] PCR Purification Kit (Qiagen) verwendet. Es entfernt DNA-Fragmente unter 40 bp sowie andere störende Komponente (störende Nukleotide, Primer, Salze etc.) aus dem PCR-Produkt. Dabei wird das gewünschte PCR-Produkt an eine spezifische Silikalgel-Membran gebunden und so vor dem Auswaschen geschützt. Am Ende wurde die aufgereinigte DNA in 30 µl EB-Puffer eluiert, wovon 8 µl in den Restriktionsenzym-Verdau eingesetzt wurden.

1.7 Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP)

Restriktionsenzyme sind in der Lage, doppelsträngige DNA an bestimmten Erkennungssequenzen, die für jedes Enzym unterschiedlich sind, zu spalten (Hydrolyse der Phosphat-Desoxyribose der DNA).

Um *Aphanomyces astaci* und *Aphanomyces invadans* mittels PCR voneinander abgrenzen zu können, wurde das bei beiden erhaltene PCR-Produkt (115 bp) mittels eines Restriktionsenzym (*Hph* I) aufgespaltet. Die Auswahl dieses Enzyms (*Hph* I) wurde bereits von SCHAEFERS (2002) vorgenommen.

Der Ansatz für den Verdau bestand aus folgenden Komponenten:

PCR-Produkt:	8 µl
Puffer (10x):	1 µl
Enzym (<i>Hph</i> I):	1 µl

Der 10 µl Ansatz wurde im Thermocycler bei 37° C für 90 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 5 µl der unverdauten Produktes zur Kontrolle und 10 µl Restriktionsenzyme in einem 2 % igem Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (siehe III.C.1.4.1).

1.8 Sensitivitätsbestimmung

Um die Sensitivität der entwickelten PCR gegenüber *Aphanomyces astaci* bestimmen zu können, wurden Kutikulastücke von Edelkrebsen mit Sporen von *Aphanomyces astaci* versetzt („gespikete“ Kutikula) um anschließend daraus mit Hilfe des DNeasy[®] Tissue Kit (Qiagen) die DNA zu extrahieren. Außerdem wurde mittels dieses Extraktionskits die DNA aus reinen Sporen isoliert.

Um die untere Nachweisgrenze der PCR feststellen zu können wurden Aliquote der isolierten DNA in eine PCR eingesetzt.

Als erstes mussten Sporen des Pilzes gewonnen werden (siehe **III B.3**). Dann wurden weiche Kutikulastücke herauspräpariert, wobei darauf geachtet wurde, dass keine Stegreste an der Kutikula übrig blieben. Es wurden 30mg Stücke der Kutikula abgewogen, die zunächst im Mörser, nach Zugabe von flüssigem Stickstoff, fein zermahlen wurden. Im Anschluss daran wurden die unterschiedlichen Sporenmengen dazugegeben. Die weitere DNA-Extraktion lief laut Protokoll ab (DNeasy[®] Tissue Kit; Qiagen).

Außerdem wurde in einem separaten Ansatz die DNA aus „reinen“ Pilzsporen isoliert.

- 15 Proben:
- 1.) 0 Sporen + Kutikula
 - 2.) 1 Spore (ohne Kutikula)
 - 3.) 10 Sporen (ohne Kutikula)
 - 4.) 100 Sporen (ohne Kutikula)
 - 5.) 1000 Sporen (ohne Kutikula)
 - 6.) 3 Sporen in 30mg Kutikula (1Sp./10mg)
 - 7.) 10 Sporen in 30mg Kutikula (3Sp./10mg)
 - 8.) 30 Spore in 30mg Kutikula (1Sp./1mg)
 - 9.) 90 Sporen in 30mg Kutikula (3Sp./1mg)
 - 10.) 300 Sporen in 30mg Kutikula (10Sp./1mg)
 - 11.) 900 Sporen in 30mg Kutikula (30Sp./1mg)
 - 12.) 3000 Sporen in 30mg Kutikula (100Sp./1mg)
 - 13.) 9000 Sporen in 30mg Kutikula (300Sp./1mg)
 - 14.) 1000 Sporen in 1mg Kutikula
 - 15.) Negativkontrolle (Mastermix ohne DNA-Zugabe)

Von den jeweils 2 x 100 µl gewonnenen Eluaten der DNA-Extraktion aus den oben beschriebenen Proben wurden je 2 µl des 2.Eluates in die PCR mit den äußeren Primern 80/640 eingesetzt. Im Anschluss daran wurde mit einem Aliquot des erhaltenen PCR-Produktes eine (Semi) Nested-PCR mit den inneren Primern 525/640 durchgeführt.

1.9 Agarosegel-Elektrophorese

Zur Aufspaltung der unterschiedlich großen PCR-Produkte fand die Agarosegel-Elektrophorese Anwendung.

Dabei nutzt man die Eigenschaft, dass in einem elektrischen Feld die negativ geladenen DNA-Abschnitte zum positiven Pol wandern. Je kürzer ein Fragment ist, desto schneller kann es sich durch die Poren des Agarosegels bewegen, so dass nach einer gewissen Zeit die Auftrennung der Fragmente nach ihrer Länge erfolgt. Die zurückgelegte Strecke der einzelnen Fragmente hängt auch von der Konzentration der Agarose ab. Dementsprechend kann die geeignete Konzentration je nach Erwartung der Fragmentlänge gewählt werden.

Um die Banden sichtbar zu machen wird dem Gel Ethidiumbromid zugegeben, welches sich zwischen die DNA-Doppelstränge einlagert. Mit Hilfe von UV-Fluoreszenz kann das PCR-Produkt sichtbar gemacht werden.

Es sind mindestens 25ng DNA nötig um eine Bande mittels Ethidiumbromid detektieren zu können (BROWN 1996). Die Größe des DNA-Abschnittes lässt sich anhand eines mitgelaufenen Größenstandards abschätzen.

In der vorliegenden Arbeit wurde aufgrund der Länge des DNA-Abschnittes ein 1,3%iges Agarosegel für die Aufspaltung ausgewählt. Der Längenstandard betrug 100bp, d.h. Banden im Bereich von 100-1000bp können mit dem Marker verglichen werden.

Herstellung des Agarosegels:

100ml 1x TAE-Puffer wurde mit 1,3g Agarosepulver in der Mikrowelle bis zur kompletten Auflösung der Agarose zum Kochen gebracht. Nach Abkühlung des Gels wurden 5µl Ethidiumbromid dazugegeben und mittels eines Magnetrührers gut vermischt.

Danach wurde das flüssige Gel in eine vorbereitete Kammer mit eingesetzten Kämmen gegossen. Nach dem Erstarren wurden die Kämmen herausgezogen.

Das starre Gel wurde in die mit 1x TAE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer verbracht.

Die durch die Kämme entstandenen Taschen wurden mit jeweils 5µl PCR-Produkt und 1µl 6x Laufpuffer („Blaupuffer“) gefüllt. Jeweils in die erste und letzte Tasche wurden je 2µl eines 100bp Größenstandards (100bp DNA-Leiter) gegeben, die ebenfalls mit 1µl Laufpuffer vermischt waren.

Die angelegte Spannung betrug 5 V/cm Gellänge und wurde über 40-60 Minuten aufrechterhalten.

Danach wurde das Gel zur Sichtbarmachung der Banden durch UV-Strahlen (312nm) in eine UV-Kammer gelegt. Mit Hilfe einer digitalen Fotoeinrichtung konnte das Bild abfotografiert und daraufhin auf der Festplatte des Computers gespeichert werden.

1.10 Untersuchung verschiedener Panzerregionen von nordamerikanischen Flusskrebse auf ihre Eignung für das vorgesehene Versuchsverfahren

In früheren Untersuchungen wurde zum Nachweis von *Aphanomyces astaci* die DNA immer aus der weichen Kutikula von Edelkrebsen (*Astacus astacus*) extrahiert.

Um die für den Pilznachweis geeigneten Panzerregionen bei nordamerikanischen Krebsen herauszufinden wurde aus den folgenden 6 verschiedenen Stellen die DNA isoliert: Auge, Cephalothorax, dorsales Abdomen, Beinansatz, weiche Kutikula und Telson (siehe **Abbildung 10**).

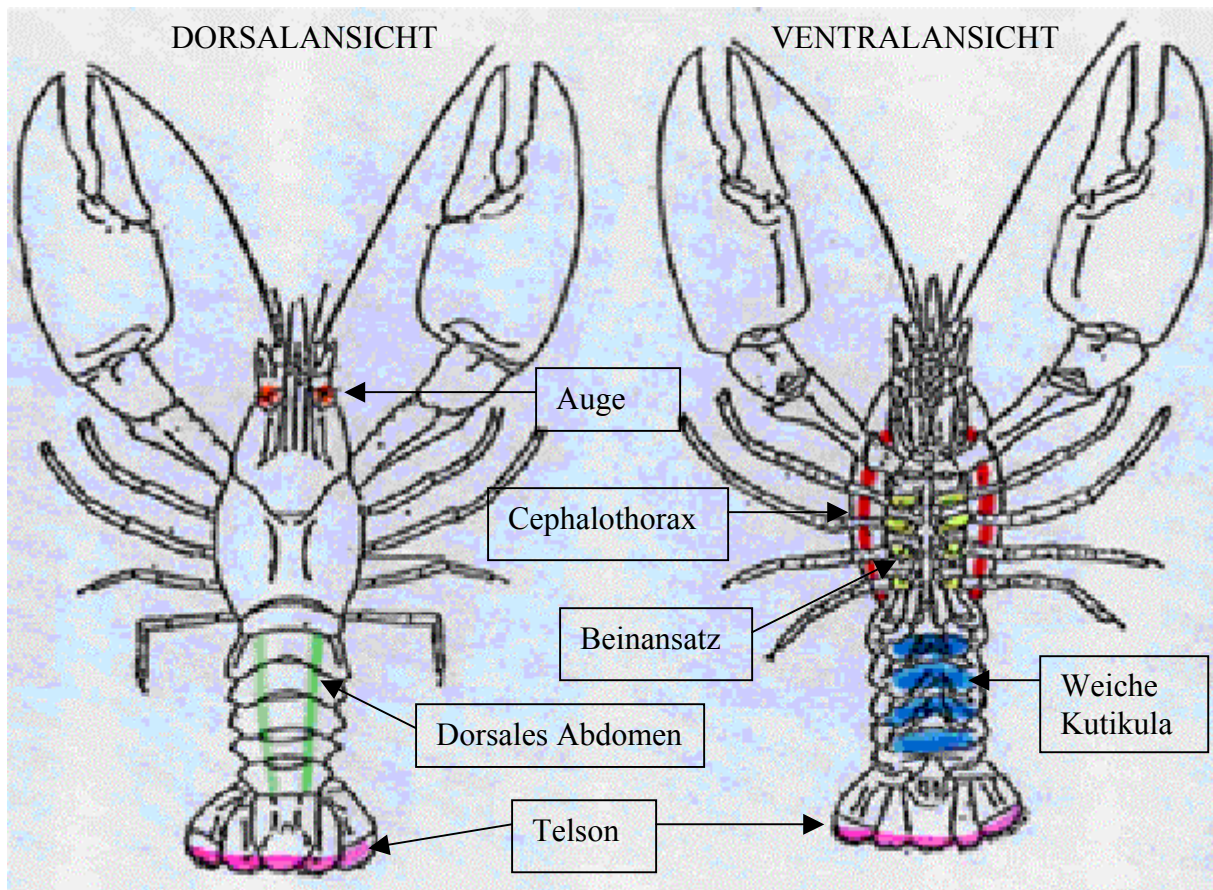


Abbildung 10: 6 verschiedene DNA-Extraktionsstellen

Zum Vergleich wurden hierfür Tiere aus Gruppen mit unterschiedlicher Befallstärke herangezogen. Es wurde eine hochgradig infizierte Gruppe (Gr.2) mit einer mittelgradig infizierten (Gr.4) und einer nicht infizierten Gruppe (Gr.1+Gr.6) verglichen.

Vergleich 6 verschiedener Stellen bei einer hochgradig infizierten Gruppe

Hierfür wurden Kamberkrebse aus der **Reserve-Gruppe 2** eingesetzt, da die entsprechende Versuchs-Gruppe nur hochgradig infizierte Krebse aufwies (siehe **III.C.2.1**).

Es wurden 5 Kamberkrebse aus der Reservegruppe entnommen und mittels Chloroform euthanasiert. Im Anschluss daran wurden die 6 verschiedenen Bereiche steril herauspräpariert und abgewogen. Die DNA wurde mittels des DNeasy[®] Tissue Kit (Qiagen) isoliert. Dabei wurde laut Protokoll für Insekten vorgegangen. Der Unterschied zum normalen Protokoll liegt in der Menge an einsetzbarem Gewebe. Hier können anstelle von sonst 25 mg sogar 50 mg Gewebe eingesetzt werden. Die Inkubationszeit des Lysispuffers betrug 90 Min.

Am Ende wurde das 1. und 2. Eluat in je 100 µl AE-Puffer ausgewaschen.

In die PCR wurde immer ein Aliquot des 2. Eluates eingesetzt.

Tabelle 7: 5 Kamberkrebse aus Reserve-Gruppe 2; eingesetzte Gewebemengen

	Melanisierte Stellen	Gliedmaßenverluste	A	CT	BA	DA	WK	T
KK 1	WK + T +	<u>Nur</u> Gliedmaßenspitze an 2 Beinen	19mg	48mg	58mg	56mg	25mg	50mg
KK 2	WK +++ T +++ GMS +	<u>Nur</u> Gliedmaßenspitze an 1 Bein	25mg	46mg	51mg	46mg	41mg	45mg
KK 3	WK ++ T +	<u>Nur</u> Gliedmaßenspitze an 1 Bein	25mg	51mg	52mg	60mg	38mg	42mg
KK 4	SCH + BA +	-	21mg	49mg	50mg	42mg	20mg	40mg
KK 5	WK ++ T ++ BA +	-	28mg	46mg	50mg	43mg	48mg	41mg

KK = Kamberkrebs; WK = weiche Kutikula, T = Telson, GMS = Gliedmaßenspitze,
SCH = Schere, A = Auge, CT = Cephalothorax, BA = Beinansatz, DA = dorsales Abdomen
(-) negativ, (+) geringgradig, (++) mittelgradig, (+++) hochgradig

Vergleich 6 verschiedener Stellen bei einer mittelgradig infizierten Gruppe

Als mittelgradig infizierte Gruppe wurde die **Versuchsgruppe 4** ausgewählt. Folglich wurden aus ihrer Reservegruppe 5 Kamberkrebse entnommen und mittels Chloroform getötet. Die weitere Vorgehensweise entspricht der eben beschriebenen Methode.

Tabelle 8: 5 Kamberkrebse aus Reserve-Gruppe 4; eingesetzte Gewebemengen

	Melanisierte Stellen	Gliedmaßenverluste	A	CT	BA	DA	WK	T
KK 1	WK + T +	<u>Nur</u> Gliedmaßenspitze an 2 Beinen	32mg	51mg	52mg	51mg	51mg	53mg
KK 2	WK ++ T ++ BA +	-	35mg	52mg	48mg	53mg	46mg	50mg
KK 3	WK ++ T ++ BA ++	-	23mg	45mg	45mg	45mg	35mg	42mg
KK 4	WK ++ T ++ BA +	1 Bein	22mg	50mg	43mg	43mg	28mg	45mg
KK 5	WK +++	-	47mg	53mg	48mg	56mg	53mg	50mg

KK = Kamberkrebs; WK = weiche Kutikula, T = Telson, A = Auge, CT = Cephalothorax,
BA = Beinansatz, DA = dorsales Abdomen

(-) negativ, (+) geringgradig, (++) mittelgradig, (+++) hochgradig

Vergleich 6 verschiedener Stellen bei einer nicht infizierten Gruppe

Die beiden **Versuchsgruppen (Gr.1 + Gr.6)** wurden als nicht infizierte Gruppen identifiziert. In ihren Reserve-Gruppen waren keine 5 Krebse mehr am Leben. Daher konnte sowohl aus Gr.1 als auch aus Gr.6 jeweils nur ein Krebs getötet und für die DNA-Extraktion verwendet werden.

Tabelle 9: 5 Krebse aus Reserve-Gruppe 1 + 6; eingesetzte Gewebemengen

	Melanisierte Stellen	Gliedmaßenverluste	A	CT	BA	DA	WK	T
SK 1 Gr.1	-	-	55mg	50mg	48mg	49mg	40mg	51mg
KK 1 Gr.6	WK +++	-	24mg	50mg	52mg	45mg	26mg	43mg

SK = Signalkrebs, KK = Kamberkrebs; WK = weiche Kutikula, T = Telson, A = Auge, CT = Cephalothorax, BA = Beinansatz, DA = dorsales Abdomen

(-) negativ, (+) geringgradig, (++) mittelgradig, (+++) hochgradig

2. Testung der Methoden an Krebsen aus 8 verschiedenen Populationen nordamerikanischer Flusskrebse

2.1 Herkunft der Krebse

siehe **Kapitel III.A.1.** und **Tabelle 5**; Herkunft der nordamerikanischen Flusskrebse

2.2 Bestimmung des Carrier-Status der nordamerikanischen Flusskrebse durch Kontaktversuche (Versuchsaufbau)

Ziel der Untersuchungen war, die Übertragung der Krebspest von nordamerikanischen „Carrier“-Krebsen auf Edelkrebse nachzuweisen. Für den Versuch wurde für jede zu testende nordamerikanische Krebsgruppe ein Kontaktaquarium mit 70 l Volumen verwendet. Diese wurden mit je einem Kieselgurausströmer zur Versorgung der Krebse mit Luftsauerstoff ausgerüstet und wiesen weder einen Wasserdurchlauf noch Versteckmöglichkeiten für die Krebse auf. Die Wassertemperatur betrug 19°C ($\pm 1^\circ\text{C}$). Vor Versuchsbeginn wurde das Gewicht, die Größe und das Geschlecht jedes einzelnen Krebses bestimmt. Außerdem wurden so genannte „Landkarten“ angefertigt. Dabei handelt es sich um eine Krebs-Skizze (vergleichbar mit **Abbildung 10, III.B.1.10**), in die alle Veränderungen, wie Gliedmaßenverluste, Melanisierungen etc. eingezeichnet wurden. Sie wurde nach dem Verenden der Tiere zum „vorher-nachher“ Vergleich herangezogen.

Jeder Krebs wurde mit einer Nummer, die mittels Nagellack (wasserfest!) auf das Brustsegment, den Cephalothorax, aufgetragen wurde, gekennzeichnet.

Den nordamerikanischen Kamber- und Signalkrebsen wurde zudem vor Versuchsbeginn Hämolymphe (2% des Körpergewichts) entnommen, um ihr Immunsystem zu schwächen und so einen Ausbruch der Krebspest bei diesen Tieren zu induzieren.

In jedes Becken wurden 5 Edelkrebse zusammen mit 10 Kamberkrebsen bzw. Signalkrebsen gesetzt. Letztere wurden in 5er-Gruppen in Plastikgitterkäfigen gehalten, wodurch ein direkter Kontakt der nordamerikanischen Krebse zu den Edelkrebsen verhindert wurde. Eine Übertragung des Erregers durch Körperkontakt konnte somit ausgeschlossen werden. Eine Infektion mit *Aphanomyces astaci* war demzufolge nur durch sich im Wasser befindende, von den „Carrier“-Krebsen stammende, Zoosporen möglich. Bei der Auswahl der Krebse wurde das Geschlecht nicht beachtet.

Die Tiere wurden alle 2 Wochen mit Karottenscheiben oder Fischstückchen gefüttert und je nach Wasserqualität wurde alle 10-15 Tage ein Wasserwechsel vorgenommen. Nach 10-monatiger Versuchsdauer war ein Großteil der Krebse gestorben. Die zu diesem Zeitpunkt noch lebenden Tiere wurden mittels Chloroform euthanasiert. Anschließend wurden die Krebse sezirt und aus ihrer weichen Abdominalkutikula DNA extrahiert (siehe **III.B.1.2**).

Da in die Versuchsgruppen nur jeweils 10 Kamber-/Signalkrebse der eingesandten Krebse eingesetzt wurden, bildeten die übrigen Tiere die Reserve-Gruppen. Nach Beenden des Kontaktversuchs wurden einige der Krebse aus den Reserve-Gruppen mittels Chloroform euthanasiert. Dazu wurde in ein verschließbares Glasgefäß Chloroform und ein Krebs gegeben und dieses dicht verschlossen. Es dauerte 2-5 Minuten bis das Tier starb. Die Krebse wurden anschließend ebenfalls sezirt, mikroskopisch auf Melanisierungen und Pilzhyphen untersucht und aus 6 verschiedenen Stellen wurde DNA extrahiert.

2.3 Bestimmung des Carrier-Status durch PCR

Um den Carrier-Status der nordamerikanischen Flusskrebse molekularbiologisch feststellen zu können wurde eine Methode (PCR) angewandt, die größtenteils bereits vorher an Edelkrebse entwickelt wurde (SCHAEFERS 2002). In der vorliegenden Arbeit wurden diese Verfahren weiterentwickelt und auf nordamerikanische Flusskrebse übertragen.

Da die nordamerikanischen Spezies bei intaktem Immunstatus nicht an der Krebspest erkranken, dennoch Träger („Carrier-Krebse“) darstellen, wurden im Versuchsaufbau nordamerikanische und europäische Krebse in ein gemeinsames Aquarium gegeben.

Sobald die europäischen Flusskrebse starben, wurden diese zunächst sezirt und lichtmikroskopisch auf Pilzhyphen untersucht. Anschließend wurde aus der weichen Abdominalkutikula DNA extrahiert (siehe **III.B.1.2**). Im Anschluss daran wurden 2µl des Eluates in die PCR eingesetzt (siehe **III.B.1.4**) und anhand der *Aphanomyces astaci* spezifischen Primer konnte bei den Carrier-Krebsen Pilz-DNA nachgewiesen werden.

Die nordamerikanischen Flusskrebse sind zum Teil bereits nach der Immunsupprimierung (durch Entnahme von Hämolymphe) zu Versuchsbeginn gestorben oder wurden mittels Chloroform getötet. Die weiteren Untersuchungsmethoden entsprechen weitgehend denen der europäischen Krebse.

Beim nordamerikanischen Krebs wurde jedoch zum Teil der komplette Panzer eingesetzt, um selbst geringe Mengen an Pilz-DNA im Krebspanzer erfassen zu können. Folglich wurde das 30-132 fache an Gewebe verwendet als im Protokoll zur DNA-Isolierung aus Insekten des DNeasy[®]Tissue Kit (Qiagen) angegeben. Die Puffermengen und Inkubationszeiten mussten dementsprechend angepasst werden (siehe **III.C.2.2**).

3. Gewinnung und Auszählung der Pilzsporen

Um die Sensitivität der PCR bestimmen zu können, wurden Sporen des Pilzes *Aphanomyces astaci* benötigt. Dabei wurde als Referenzstamm M 1/96 verwendet.

Die Pilzreinkultur wurde als Stockkultur in Reagenzgläsern auf Schrägagar aufbewahrt und auf einer PG1-Agarplatte subkultiviert. Sobald eine Mycelschicht auf dem Agar gewachsen war, wurde ein kleines Stück des Nährbodens mit Mycel in flüssiges PG1-Medium überführt. Nach 3-5 Tagen kam es zur Ausbildung des Pilzmycels. Anschließend wurde das Mycel gründlich mit Aqua dest. gewaschen, so dass jegliche PG1-Medium Reste herausgespült waren, und in autoklaviertes Flusswasser (Eisbach, München) gegeben. Durch den Nährstoffentzug kam es nach einigen Tagen zur Sporenfreisetzung. Nach vorsichtigem Mischen der Sporenlösung wurde eine geringe Menge des Flusswassers herauspipettiert und mittels der Neubauer Zählkammer konnte die Sporenausbeute bestimmt werden. Dabei wurden 5 Stichproben in den 18 Quadraten einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

Dadurch ergab sich folgende Sporendichte pro ml Flusswasser:

Formel:	$\frac{\text{ausgezählte Sporen (in den 18 Quadraten)} \times 10 \times 1000}{18}$
----------------	--

Die Sporenkonzentration wurde für die Sensitivitätsbestimmung der PCR verdünnt und in 1,5 ml Eppendorfgläsern im Kühlschrank für einige Stunden aufbewahrt.

C. ERGEBNISSE

1. Anwendung, der bereits für Edelkrebse entwickelten Methode, zum Nachweis der Krebspest (OIDTMANN et al. unveröffentlicht) bei nordamerikanischen Flusskrebsen (*Orconectes limosus*, *Pacifastacus leniusculus*)

1.1 Methode um die Krebspest in nordamerikanischen Flusskrebsen nachzuweisen

Um in nordamerikanischen Flusskrebsen die DNA des Krebspesterregers *Aphanomyces astaci* nachweisen zu können, wurde nach dem Protokoll für Insekten des DNeasy[®]Tissue Kit (Qiagen) vorgegangen. Dabei wurde zunächst aus der weichen Abdominalkutikula eines Krebses DNA extrahiert. Als letzter Extraktionsschritt wurde die DNA in 100 µl Puffer eluiert. Dieser Vorgang wurde nochmals wiederholt, so dass am Ende 2 Eluate jeder Probe vorhanden waren. Anschließend wurden aus dem 2. Eluat 2 µl entnommen und in die erste, „einfache“ PCR eingesetzt. In die darauf folgende Nested-PCR wurde 1 µl des aus der ersten PCR erhaltenen PCR-Produkts eingesetzt.

Mit Hilfe der neu entwickelten spezifischen Primer 525/640 (OIDTMANN, unveröffentlicht) werden ausschließlich *Aphanomyces astaci* und *Aphanomyces invadans* amplifiziert. Das zu erhaltende Produkt hat eine Länge von etwa 115bp. Bislang konnte *Aphanomyces invadans* noch nicht aus einem Flusskrebs isoliert werden, so dass bei einem positiven Ergebnis der Nested-PCR vom Erreger *Aphanomyces astaci* ausgegangen werden kann. Um diese Annahme zu bestätigen kann ein Verdau der PCR-Produkte mittels Restriktionsenzymen durchgeführt werden. (siehe III. C.1.4.1)

1.2 Wahl der Primer

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primerpaare (80/640 und 525/640) wurden zuvor auf ihre Spezifität gegenüber der DNA von *Aphanomyces astaci* und anderen nahe verwandten Pilzen, Bakterien, Parasiten und gegenüber der DNA von verschiedenen Flusskrebs-Spezies getestet. Folgende *Aphanomyces*-Arten wurden dabei getestet: *Aphanomyces stellatus*, *Aphanomyces brassicae*, *Aphanomyces cladogamus*, *Aphanomyces cochloides*, *Aphanomyces euteiches*, *Aphanomyces helicoides*, *Aphanomyces iridis*, *Aphanomyces irregulare*, *Aphanomyces laevis*, und *Aphanomyces invadans*. Die weiteren eingesetzten Oomycota (*Saprolegnia sp.*, *Isoachlya turoloides*, *Isoachlya eccentrica*, *Leptolegnia sp.*, *Pytium flevium*) stellen die nächsten Verwandten der *Aphanomyces*-Arten dar.

Bei Flusskrebsen vorkommende Bakterien (*Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei*) und Parasiten (*Psorospermium haeckeli*, *Thelohania contejeani*) wurden ebenso wie *Fusarium solani* und *Trichosporon beigelii* überprüft. Die DNA von mit *Aphanomyces* entfernter verwandten Arten *Aspergillus sp.*, *Candida albicans* und *Mucor sp.* wurde ebenfalls in die PCR eingesetzt. Um eine Homologie dieser Primer zu den Sequenzen der Wirts-DNA auszuschließen, wurde DNA aus der zellreichen Muskulatur folgender Krebse getestet: *Astacus astacus*, *Pacifastacus leniusculus* und *Procambarus clarkii* (OIDTMANN et al. unveröffentlicht; SCHAEFERS, 2002).

Dabei stellte sich heraus, dass das Primerpaar 80/640 für die äußere PCR und die Primer 525/640 für die innere PCR als spezifisch für die beiden Arten *Aphanomyces astaci* und *Aphanomyces invadans* gelten.

Bezeichnung und Beschreibung der Primer:

Name des Primers:	Länge der Nukleotide:	Lage auf der zellulären rDNA:	Richtung der Replikation:	Schmelztemperatur in °C :
80	20	ITS 1	F	57,3°C
525	20	ITS 2	F	53,2°C
640	20	ITS 2	R	59,4°C

1.3 Optimierung der PCR-Protokolle

Um die bestmögliche Zusammensetzung des PCR-Ansatzes sowie die optimalen Bedingungen im Thermocycler für das neue Primerpaar herauszufinden, wurden die einzelnen Parameter ausgetestet.

Für die Primerkombination 525/640 bestand bereits ein optimiertes PCR-Protokoll (SCHAEFERS, 2002) welches weitgehend übernommen wurde.

Dagegen musste für die neu konstruierten Primer 80/640 das Protokoll noch optimiert werden. Dabei wurde in die PCR mit den äußeren Primern (80/640) immer 2 µl des 2.Eluates in einen 50 µl PCR-Ansatz gegeben. Die Zusammensetzung des Mastermixes sowie die PCR-Bedingungen sind dem Kapitel III.B.1.5 zu entnehmen. Bei der nachfolgenden Optimierung konnte bei jedem Schritt jeweils nur 1 Parameter verändert werden.

1.3.1 Optimierung der MgCl₂-Konzentration

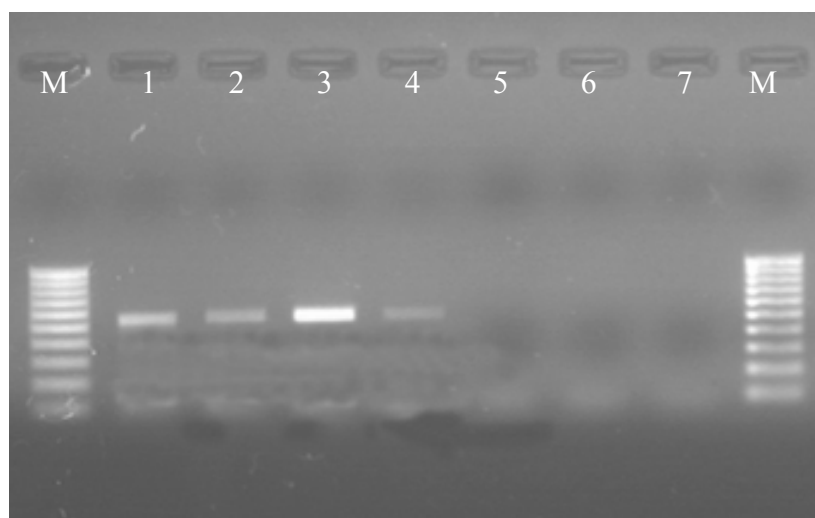


Abbildung 11: Optimierung der MgCl₂-Konzentration für das Primerpaar 80/640
(PCR-Optimizer™ Kit (Invitrogen))

M: 100bp DNA-Leiter

Spur 1: Puffer A (7,5 mM MgCl₂, pH 8,5) **Spur 5:** Puffer F (10 mM MgCl₂, pH 9,0)

Spur 2: Puffer B (10 mM MgCl₂, pH 8,5) **Spur 6:** Puffer J (10 mM MgCl₂, pH 9,5)

Spur 3: Puffer C (12,5 mM MgCl₂, pH 8,5) **Spur 7:** Puffer N (10 mM MgCl₂, pH 10,0)

Spur 4: Puffer D (17,5 mM MgCl₂, pH 8,5)

Wie im Material- und Methoden-Teil (siehe **III.B.1.5**) beschrieben, wurde das PCR-Optimizer™ Kit (Invitrogen) eingesetzt um die optimale MgCl₂-Konzentration für das Primerpaar (80/640) herauszufinden.

Es wurden jeweils 10 µl Puffer in den Mastermix (50 µl-Ansatz) gegeben. Die Endkonzentration an MgCl₂ im Mastermix betrug somit 1/5 der bei den Puffern angegebenen Konzentrationen.

Bei Puffer C (12,5mM+ pH 8,5) stellte sich die Bande am deutlichsten dar. Hier liegt demzufolge eine MgCl₂-Konzentration von 2,5 mMol im PCR-Ansatz vor.

In den folgenden Untersuchungen wurde die Taq-Polymerase und der Puffer von AmpliTaq Gold® verwendet. Der 10x PCR Gold Puffer (pH 8.0) enthält kein MgCl₂. Daher muss dieses zusätzlich hinzugefügt werden. Es wird in einem Eppendorf-Gefäß in der Konzentration von 25 mM MgCl₂ mitgeliefert.

Um die optimale Konzentration von 2,5 mMol MgCl₂ / PCR-Ansatz zu erhalten, müssen 5 µl der MgCl₂-Lösung (25 mM) in den Ansatz gegeben werden.

1.3.2 Optimierung der Annealing-Temperatur und Zyklenzahl

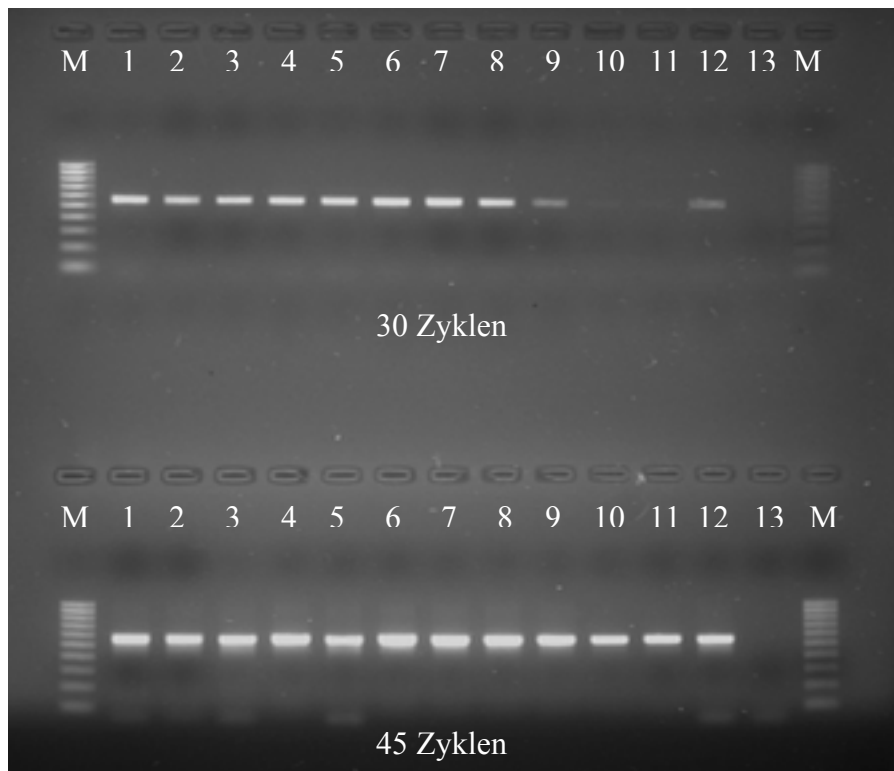


Abbildung 12: Optimierung der Annealing-Temperatur und Zyklenzahl für die Primer 80/640

M: 100bp DNA-Leiter

Spur 1: 48,0°C

Spur 2: 49,4°C

Spur 3: 51,2°C

Spur 4: 53,5°C

Spur 5: 56,1°C

Spur 6: 58,8°C

Spur 7: 61,5°C

Spur 8: 64,0°C

Spur 9: 66,1°C

Spur 10: 67,7°C

Spur 11: 68,5°C

Spur 12: Positiv-Kontrolle D_{1/96} 1:10 bei 56,1°C

Spur 13: Negativkontrolle bei 56,1°C

Zyklenzahl: 30 bzw. 45 Zyklen

Die Dezimalstellen bei den Temperaturangaben sind technisch bedingt; sie ergeben sich aus dem Gradientencycler.

Als Mittelwert wurde 58°C gewählt und durch Eingabe des Gradienten $G=10,0^\circ$ wurden diese Werte automatisch ermittelt.

Dabei erwies sich die Bande bei Spur 7, d.h. bei 58,8°C und bei 30 Zyklen als optimal.

Bei den nachfolgenden PCRs wurde die **Annealing-Temperatur** mit **59°C** festgelegt.

1.3.3. Zyklenzahl-Optimierung

Nachdem im vorhergegangenen Schritt die Zyklenzahl grob optimiert wurde, erfolgte eine exakte Optimierung.

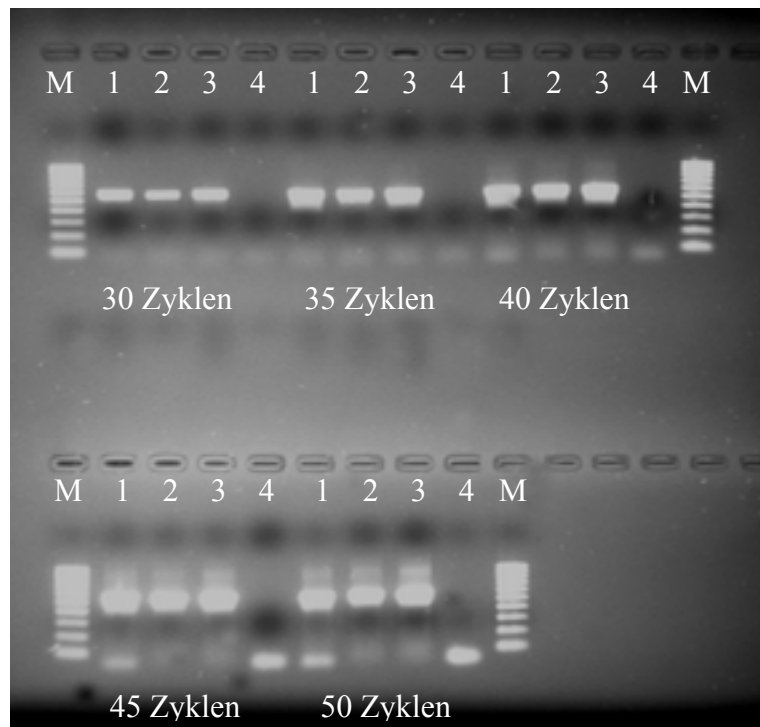


Abbildung 13: Optimierung der Zyklenzahl für das Primerpaar 80/640

M: 100bp DNA-Leiter

Spur 1: gespikete Probe 1:10 Verdünnung (1000 Sporen/ 1 mg)

Spur 2: gespikete Probe 1:100 Verdünnung (1000 Sporen/ 1 mg)

Spur 3: D_{1/96} 1:10 Verdünnung (Positiv-Kontrolle)

Spur 4: Negativ-Kontrolle

Dauer eines Zyklus: 3 Minuten

Bei höherer Zyklenzahl konnten stärkere Banden beobachtet werden. Bei 30 Zyklen waren die Banden deutlich abgegrenzt. Dagegen war bei einer höheren Anzahl von Zyklen ein „schmieriger“ Hintergrund zu erkennen, der durch vermehrt auftretende Nebenprodukte entstand.

Fortan wurde die PCR mit den Primern 80/640 bei **30 Zyklen** (Programm: **AC30Diss**) durchgeführt.

1.3.4 Optimierung der dNTP-Konzentration

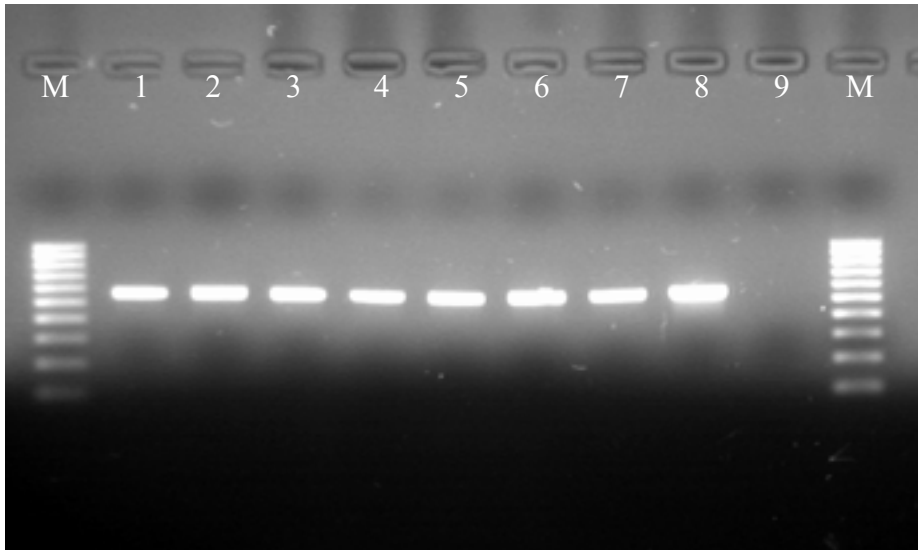


Abbildung 14: Optimierung der dNTP-Konzentration für das Primerpaar 80/640

M: 100bp DNA-Leiter

Spur 1: 0,2 mM dNTP

Spur 2: 0,3 mM dNTP

Spur 3: 0,4 mM dNTP

Spur 4: 0,5 mM dNTP

Spur 5: 0,6 mM dNTP

Spur 6: 0,7 mM dNTP

Spur 7: 0,8 mM dNTP

Spur 8: 0,7 mM dNTP + D_{1/96} 1:10 (Positivkontrolle)

Spur 9: Negativkontrolle

Es konnten keine deutlichen Unterschiede der Bandenstärke in Abhängigkeit zur Menge an dNTPs konstatiert werden. Daher wurde der Mittelwert von **0,5 mM dNTPs** für einen 50 µl Ansatz ausgewählt.

1.3.5 Optimierung der Primer-Konzentration

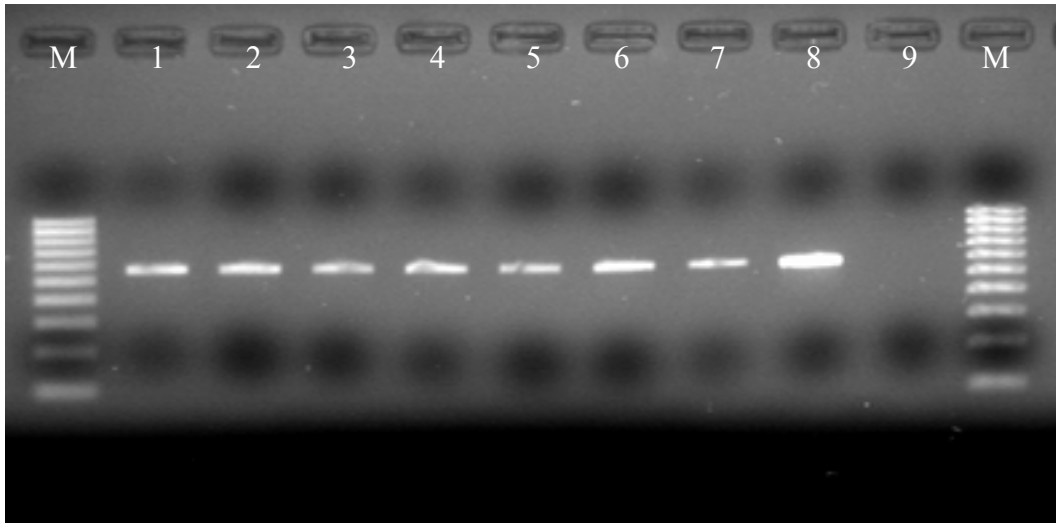


Abbildung 15: Optimierung der Primer-Konzentration für das Primerpaar 80/640

M: 100bp DNA-Leiter

Spur 1: 0,50 μM

Spur 2: 0,75 μM

Spur 3: 1,00 μM

Spur 4: 1,25 μM

Spur 5: 1,50 μM

Spur 6: 1,75 μM

Spur 7: 2,00 μM

Spur 8: 1,25 μM + D_{1/96} (Positivkontrolle)

Spur 9: 1,25 μM + Negativkontrolle

Es konnten keine eindeutigen Unterschiede der Bandenstärke in Abhängigkeit zur Primer-Konzentration festgestellt werden. Daher wurde die mittlere Konzentration von **1,25 μM Primer** für die Primer 80 und 640 zum Einsatz in den Mastermix ausgewählt.

1.3.6 Optimierung der Taq- Konzentration

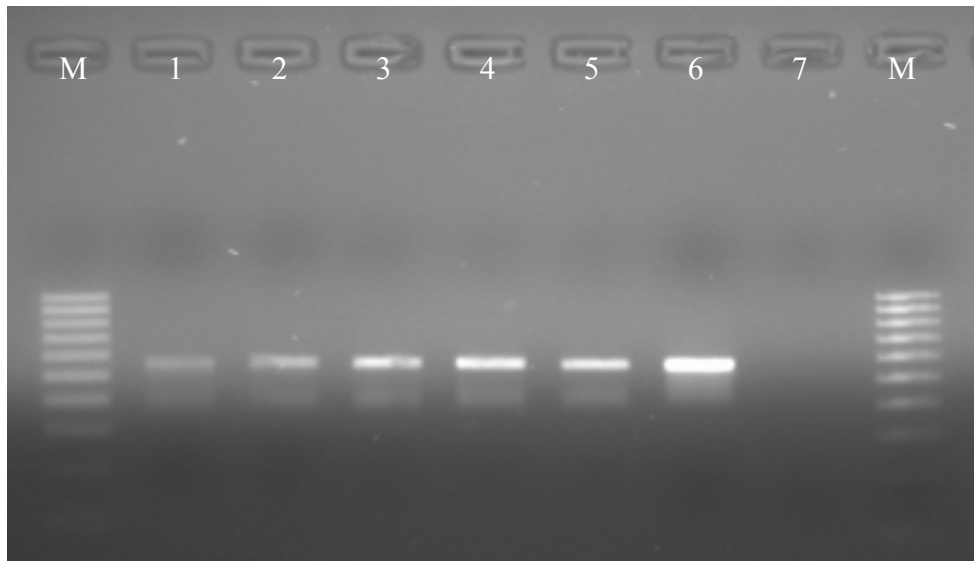


Abbildung 16: Optimierung der Taq-Konzentration für das Primerpaar 80/640

M: 100bp DNA-Leiter

Spur 1: 0,5 U

Spur 2: 1,0 U

Spur 3: 1,5 U

Spur 4: 2,0 U

Spur 5: 2,5 U

Spur 6: 1,5 U + D_{1/96} (Positivkontrolle)

Spur 7: 1,5 U + Negativkontrolle

Je höher die Konzentration an Taq-Polymerase, um so dicker und verschmierter wurde die Bande. Die optimale Bandenstärke wurde bei **2,0 U Taq** festgestellt.

Somit war die Optimierung des Protokolls (siehe **III.B.1.5**) abgeschlossen und die nachfolgenden PCRs wurden mit den optimierten Parametern fortgesetzt.

Tabelle 10: Zusammenfassung der optimierten Parameter für die PCR mit den Primern 80/640

MgCl₂-Konzentration u. pH-Wert:	2,5 mM (im 50 µl PCR-Ansatz), pH 8,5
Zyklenzahl:	30 Zyklen
Annealing-Temperatur	59°C
dNTP-Konzentration:	0,5 mM dNTPs (im 50 µl PCR-Ansatz)
Primer-Konzentration:	1,25 µM je Primer
Taq-Polymerase Konzentration:	2,0 U Taq

1.4 Spezifität der Primer und Restriktionsenzym-Analyse

Nachdem die Optimierung erfolgreich abgeschlossen war, musste die Spezifität der Primer gegenüber *Aphanomyces astaci*+ *Aphanomyces invadans* nachgewiesen werden. Wie bereits in vorangegangenen Veröffentlichungen nachgewiesen, amplifizieren folgende Primer Pilz-DNA.

Tabelle 11: Spezifität der Primer

Primerpaar	Amplifizierte DNA
ITS 1 + ITS 4 (WHITE et al., 1990)	Alle Pilze
Aa 1 + Aa 5 (SCHAEFERS, 2002)	Alle <i>Aphanomyces</i> -Spezies
525 + 640 (OIDTMANN et al., unveröffentlicht)	Nur <i>Aph. astaci</i> + <i>Aph. invadans</i>
80 + 640 (vorliegende Arbeit, 2003)	Nur <i>Aph. astaci</i> + <i>Aph. Invadans</i>

Die spezifischen Primer können teilweise auch ein Signal bei *Aphanomyces invadans* geben, da sich *Aphanomyces astaci* und *Aphanomyces invadans* im Bereich der Primersequenzen nur durch wenige Basen der DNA unterscheiden. Um eine Abklärung zu bekommen kann ein Verdau angefügt werden. In diesem Fall wird an die PCR eine Restriktionsenzym-Analyse angeschlossen, bei der durch ein bestimmtes Enzym (*Hph I*) die erhaltenen PCR-Produkte gespalten werden. In einem anschließenden Agarosegel werden die Fragmente entsprechend ihrer Größe aufgespaltet und anhand eines standardisierten Größenmarkers abgeschätzt.

Das PCR-Produkt (525/640) von *Aphanomyces astaci* wird dabei mittels einer Endonuklease hydrolytisch verdaut, wohingegen das PCR-Produkt von *Aphanomyces invadans* unverdaut bleibt.

Eine Isolierung von *Aphanomyces invadans* aus Krebsgewebe ist bislang unbekannt und daher kann dieser Erreger in Bezug auf die Krebspest-Diagnostik in Flusskrebsen vernachlässigt werden.

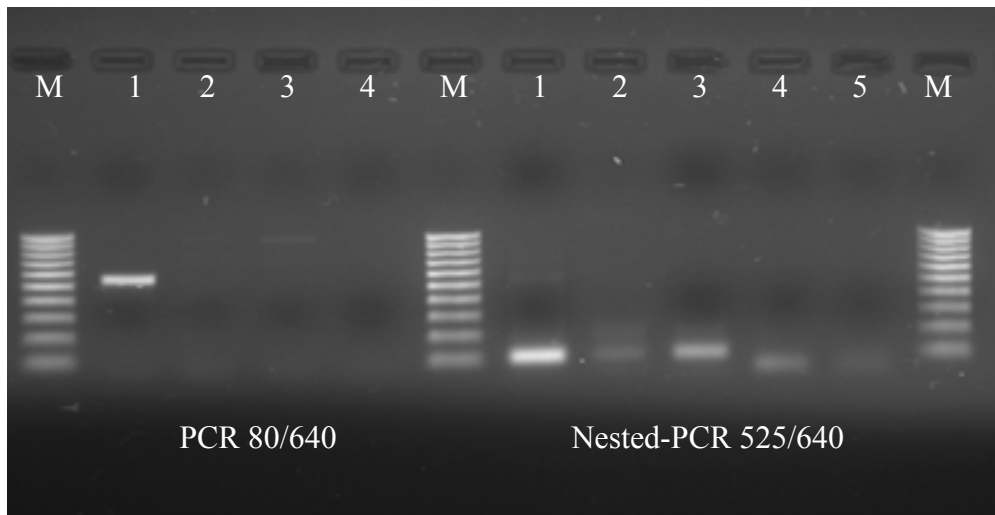


Abbildung 17: Spezifität der Primer für *Aph. astaci*+ *Aph. invadans*

M: 100bp DNA-Leiter

Spur 1: D_{1/96} - *Aphanomyces astaci* 1:10 Verdünnung (Positivkontrolle)

Spur 2: WIC 1 - *Aphanomyces invadans* 1:10 Verdünnung

Spur 3: PA 7 - *Aphanomyces invadans* 1:10 Verdünnung

Spur 4: Negativ-Kontrolle

Spur 5: Negativ-Kontrolle der Nested-PCR

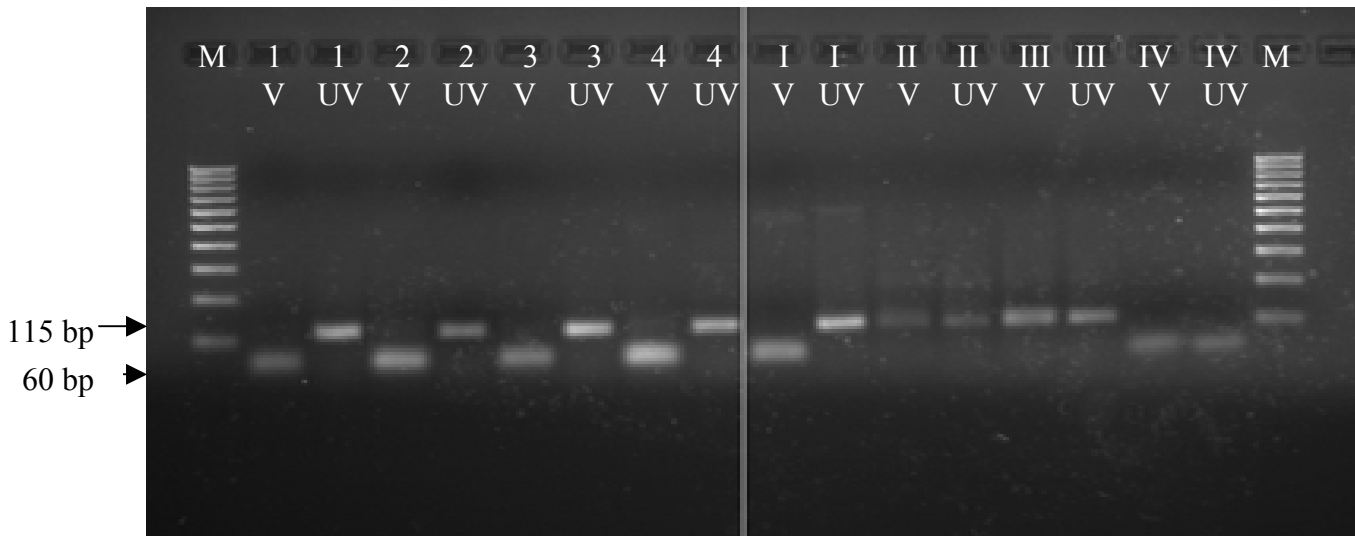
1.4.1 Restriktionsenzym- Analyse

Abbildung 18: Differenzierung der PCR-Produkte (aus PCR mit Primern 525/640) von *Aphanomyces astaci* und *Aphanomyces invadans* durch den Verdau mit dem Restriktionsenzym *Hph I*

M: 100bp DNA-Leiter

Spur 1: PCR-Produkt, DNA aus Gr. 2 EK 1

Spur 2: PCR-Produkt, DNA aus Gr. 2 EK 2

Spur 3: PCR-Produkt; DNA aus Gr. 2 KK 6

Spur 4: PCR-Produkt, DNA aus Gr. 2 KK 7

Spur I: PCR-Produkt, D_{1/96} 1:10 (*Aph. astaci*)

Spur II: WIC 1, 1:10 (*Aph. invadans*)

Spur III: PA 7, 1:10 (*Aph. invadans*)

Spur IV: Negativkontrolle

V: Verdaut (60 bp) **UV:** Unverdaut (115 bp)

1.4.2 Testung der Spezifität der Primer

Mit einer weiteren PCR wurde nachgewiesen, dass die neu entwickelten Primer nicht mit der DNA von Krebsmuskulatur (*Astacus astacus*; *Pacifastacus leniusculus*; *Orconectes limosus*, *Austropotamobius pallipes*, *Procambarus clarkii*) kreuzreagieren.

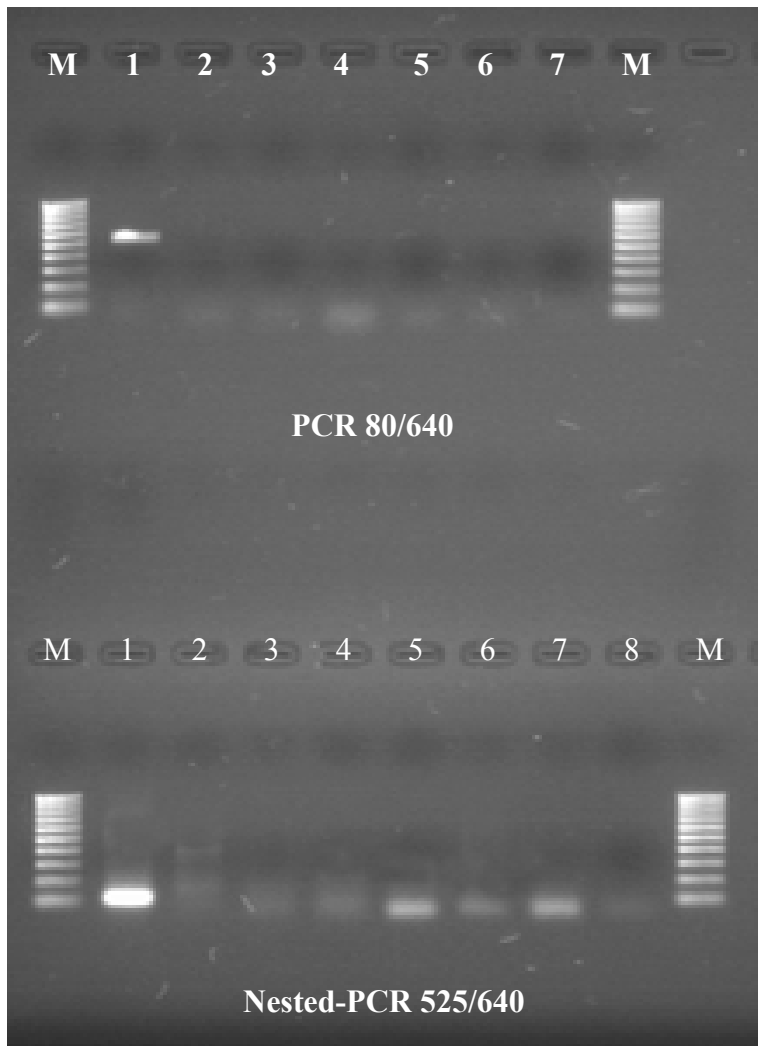


Abbildung 19: Testung der Primer mit Krebs-DNA (aus Muskulatur)

M: 100bp DNA-Leiter

Spur 1: D_{1/96} - *Aphanomyces astaci* 1:10 Verdünnung (Positivkontrolle)

Spur 2: DNA von *Astacus astacus* (Edelkrebs) reine Muskulatur

Spur 3: DNA von *Pacifastacus leniusculus* (Signalkrebs) reine Muskulatur

Spur 4: DNA von *Orconectes limosus* (Kammerkrebs) reine Muskulatur

Spur 5: DNA von *Austropotamobius pallipes* (Dohlenkrebs) reine Muskulatur

Spur 6: DNA von *Procambarus clarkii* (Roter amerik. Sumpfkrebs) reine Muskulatur

Spur 7: Negativkontrolle

Spur 8: Negativkontrolle der Nested-PCR

1.4.3 PCR mit spezifischen Dekapoden-Primern 143/145 (amplifizieren nur Krebse):

Um sicherzustellen, dass die in die PCR zur Testung der Spezifität der Primer eingesetzte DNA-Menge ausreichend war, wurde diese Krebs-DNA in eine PCR mit spezifischen Dekapoden-Primer 143/145 eingesetzt. Sie muss hier eine Bande in der erwarteten Größe von ca. 850 bp ergeben. Dementsprechend dürfen diese Primer kein Signal mit *Aphanomyces astaci* oder anderen Pilzen geben.

In einer PCR wurde die DNA von *Aphanomyces astaci* mit der vom Edelkrebs, Dohlenkrebs und Signalkrebs verglichen.

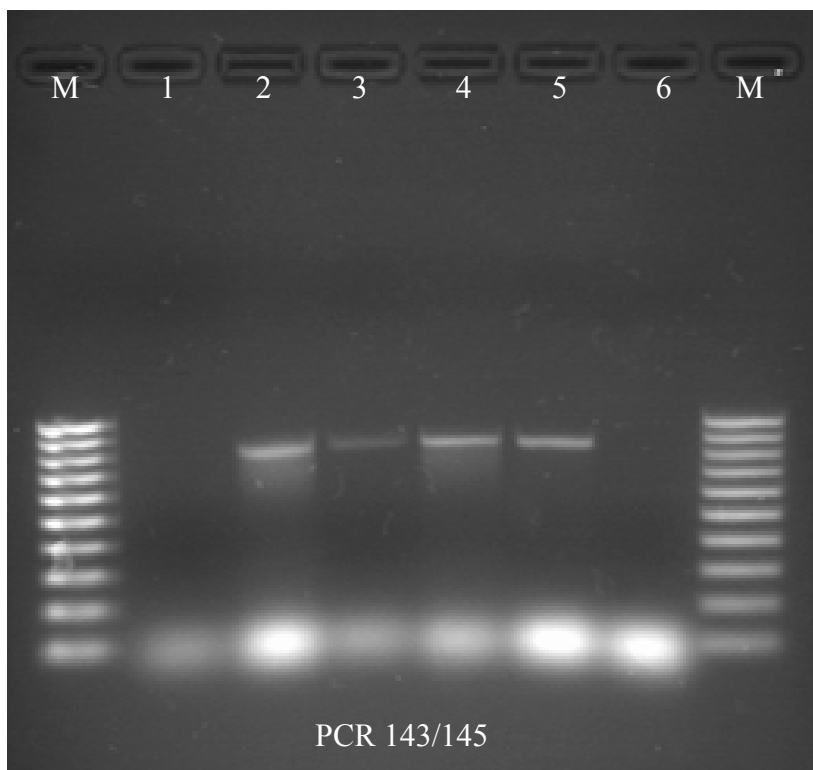


Abbildung 20: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte mit den Dekapoden-Primern (143/145) mit *Aphanomyces astaci* und Krebs-DNA

M: 100 bp DNA-Marker

Spur 1: D_{1/96} 1:10 (Positivkontrolle)

Spur 2: DNA von *Astacus astacus* (Edelkrebs) reine Muskulatur

Spur 3: DNA von *Astacus leptodactylus* (Galizierkrebs) reine Muskulatur

Spur 4: DNA von *Pacifastacus leniusculus* (Signalkrebs) reine Muskulatur

Spur 5: DNA von *Austropotamobius pallipes* (Dohlenkrebs) reine Muskulatur

Spur 6: Negativkontrolle

Die 4 Krebse weisen eine für die Dekapodenprimer charakteristische Bande in der Größe von ca. 850 bp auf. Dagegen liegt beim Krebspesterreger *Aphanomyces astaci* mit diesen Primern kein Signal vor.

1.5 Sensitivitätsbestimmung der PCR

Um die untere Nachweisgrenze der PCR und der Nested-PCR festlegen zu können, musste eine PCR mit „gespikten“ Proben durchgeführt werden.

Zunächst mussten Sporen aus dem Pilz *Aphanomyces astaci* gewonnen werden. Danach wurde eine ausgezählte Sporenmenge zu einem Stück (30 mg) weicher Kutikula eines gesunden Edelkrebsees hinzu gegeben und daraus die DNA extrahiert (mittels Qiagen DNeasy[®] Tissue Kit). (siehe **Abbildung 21**)

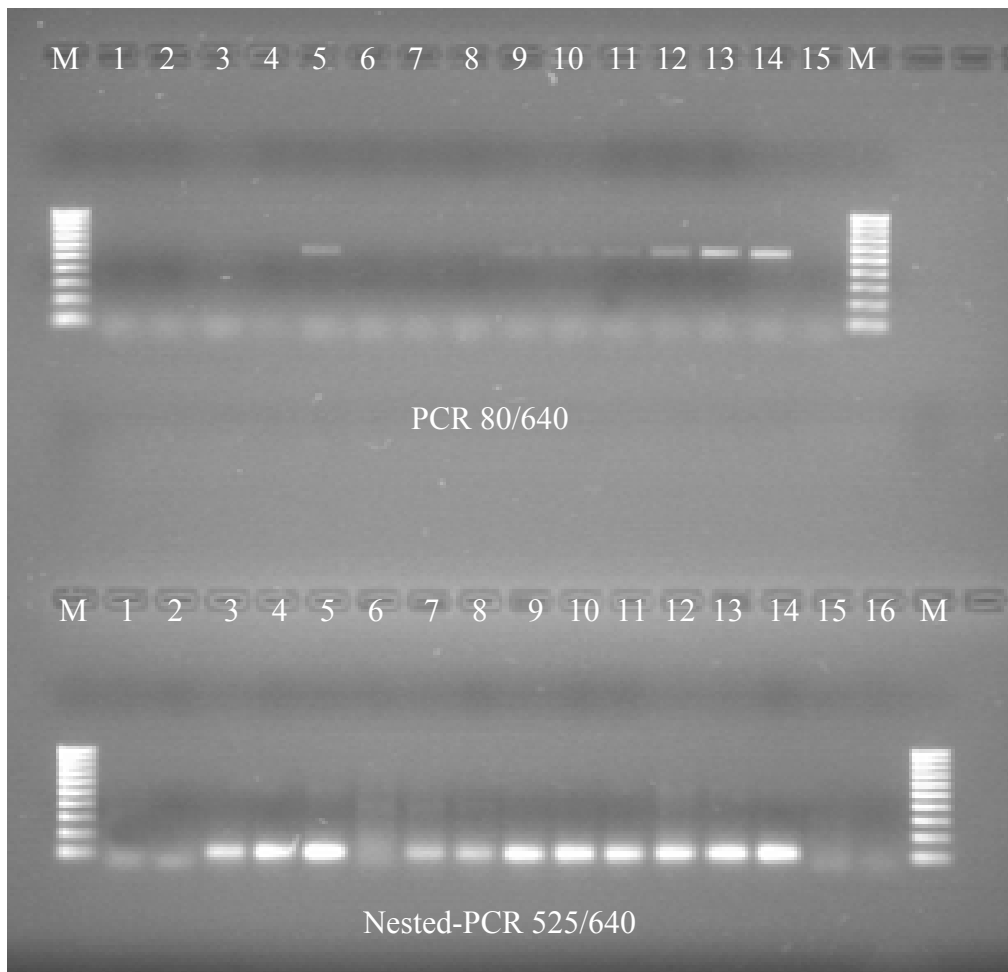


Abbildung 21: Sensitivitätsbestimmung der PCR (Sporen von *Aph. astaci*)

M: 100bp DNA-Leiter

Spur 1: 0 Sporen + Kutikula

Spur 2: 1 Spore (ohne Kutikula)

Spur 3: 10 Sporen (ohne Kutikula)

Spur 4: 100 Sporen (ohne Kutikula)

Spur 5: 1000 Sporen (ohne Kutikula)

Spur 6: 3 Sporen in 30 mg (1Sp/10 mg)

Spur 7: 10 Sporen in 30 mg (1Sp=3 mg)

Spur 8: 30 Sporen in 30 mg (1Sp/mg)

Spur 9: 90 Sporen in 30mg (3Sp/mg)

Spur 10: 300 Sporen in 30 mg (10Sp/mg)

Spur 11: 900 Sporen in 30mg (30Sp/mg)

Spur 12: 3000 Sporen in 30 mg (100Sp/mg)

Spur 13: 9000 Sporen in 30 mg (300Sp/mg)

Spur 14: 30000 Sporen in 30 mg (1000Sp/mg)

Spur 15: Negativkontrolle

Spur 16: Negativkontrolle der Nested-PCR

Bei den „gespikten“ Proben wurde jeweils 30 mg weiche Kutikula eingesetzt.

Bei der PCR mit den äußeren Primern 80/640 lag die Nachweisgrenze bei der reinen Sporenmenge bei 1000 Sporen und bei der gespikten Probe bei 90 Sporen/30mg Kutikula.

Bei der Nested PCR werden die Amplifikate um ein Vielfaches erhöht, so dass die untere Nachweisgrenze hier bereits bei 10 Sporen, reine Sporenmenge und bei 10 Sporen/30 mg bei der gespikten Probe lagen.

2. Auswertung der Versuchsgruppen

Von den 8 verschiedenen Versuchsgruppen wurden in den Gruppen 2-8 jeweils Kamberkrebse und Edelkrebse zusammen in einem Becken gehalten. In der 1. Gruppe traten Signalkrebse mit Edelkrebsen in Kontakt. Einige der immunsupprimierten nordamerikanischen Krebse starben an den Folgen der Immunsuppression. Der Versuchsaufbau diente dazu, eine Übertragung der Infektion mit *Aphanomyces astaci* von nordamerikanischen Spezies auf Edelkrebse auszulösen, um in den Edelkrebsen die Erkrankung eindeutig nachweisen zu können. Eine Methode für den Nachweis einer Krebspest-Infektion in Edelkrebsen ist etabliert (SCHAEFERS 2002).

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche waren sozusagen ein zweiter Weg um zu einer eindeutigen Diagnose bei den nordamerikanischen Flusskrebsen hinsichtlich ihres Carrier-Status zu gelangen.

Der erste Edelkrebs starb 4 Tage nach Kontaktbeginn. Die lichtmikroskopische Untersuchung der weichen Kutikula des Edelkrebses ergab folgendes Bild

(siehe **Abbildung 22 a) + b)**). Mittels PCR konnte bei diesem Tier DNA von *Aphanomyces astaci* eindeutig nachgewiesen werden.

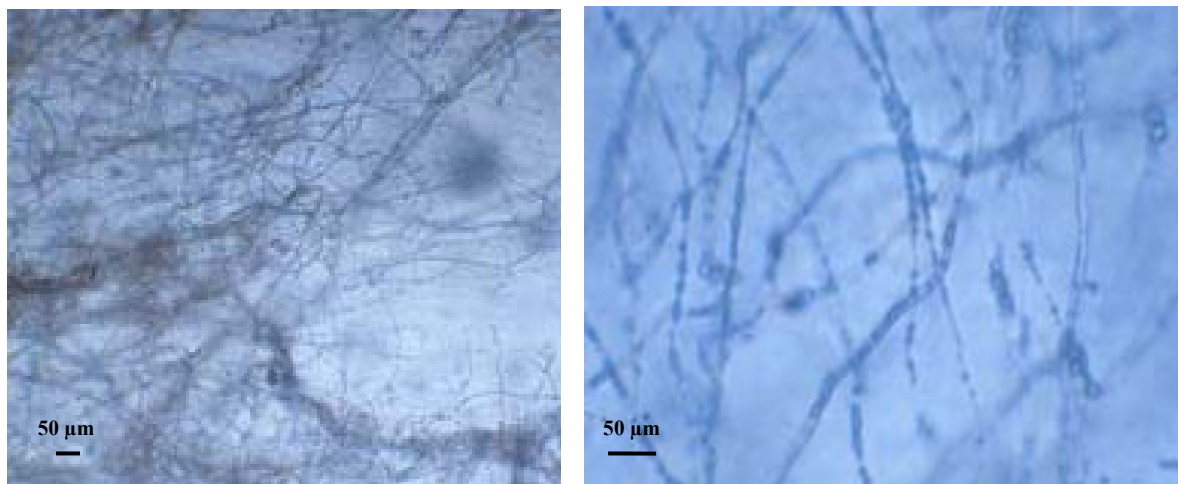


Abbildung 22 : Pilzhyphen beim Edelkrebs, weiche Kutikula; Gr.3 EK 3

Abb. 22 a) Nativpräparat

Abb. 22 b) Ausschnitt aus linkem Bild, Nativpräparat

Nachdem die ersten Edelkrebse verendet waren, starben auch einige Signal- und Kamberkrebse. Die Sektion und die weiterführenden Untersuchungen wurden nach dem im Kapitel **III.B.1.2** beschriebenen Procedere durchgeführt. Auch hier konnten im Lichtmikroskop bei einigen Krebsen Pilzhypen in der weichen Kutikula erkannt werden. Häufig befanden sich die Hypen in melanisierten Bereichen (siehe **Abbildung 23 a)+b)**). Diese Bereiche wurden für die DNA-Extraktion eingesetzt.

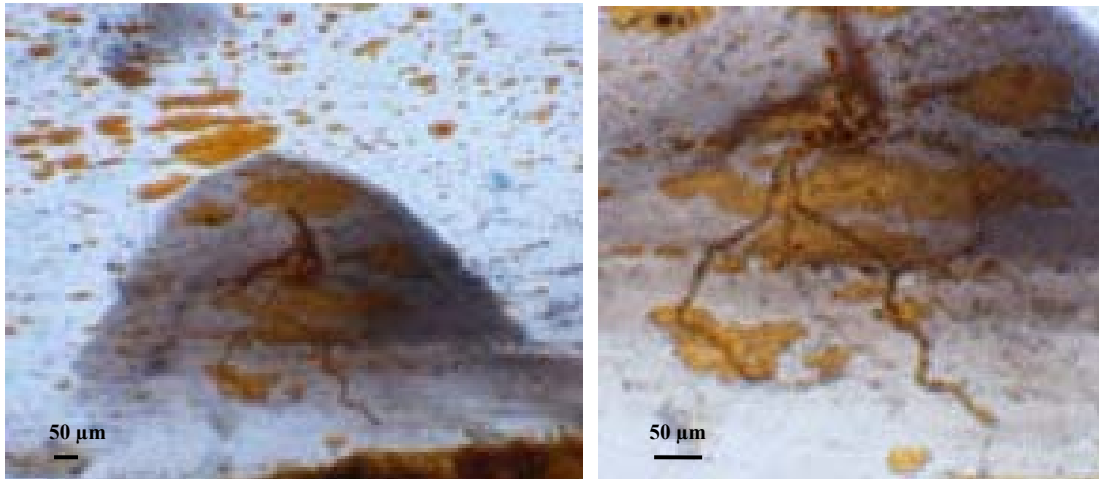


Abbildung 23: Melanisierte Pilzhypen beim Kamberkrebs, weiche Kutikula;
Gr.8 KK 7

Abb. 23 a) Nativpräparat

Abb. 23 b) Ausschnitt aus linkem Bild; Nativpräparat

2.1 Auswertungen der Versuchsgruppen 1-8

Von den 8 untersuchten Gruppen wurden 6 als Träger der Krebspest identifiziert. Dieses Ergebnis wurde übereinstimmend mittels des direkten Nachweises durch PCR, unter Verwendung von DNA aus nordamerikanischen Flusskrebsen, sowie dem Kontaktversuch von nordamerikanischen Spezies mit Edelkrebsen erhalten.

Die Ergebnisse sind in **Tabelle 12** auf der nächsten Seite aufgeführt.

Tabelle 12: Auswertungen der Versuchsgruppen

	Todesfälle bei immun-supprimierten nordamerik. Krebsen	Todesfälle bei vergesellschafteten Edelkrebsen	Eutha. nord-amerik. Krebse aus der Gruppe	Nachweis von A.a. durch PCR bei immun-supprimierten nordamerik. Krebsen	Nachweis von A.a. durch PCR bei vergesellschafteten Edelkrebsen	Direkter Nachweis mittels PCR aus Reserve-Gr. nord. Krebse (nicht immun-supprimiert)	Insgesamt positive nord-amerik. Krebse
Gruppe 1 SK + EK	10 von 10 <u>Tag*:</u> 2(3), 8(1), 10(1), 12(5)	5 von 5 <u>Tag*:</u> 6(1), 10(1), 14(1), 22(2)	0	Negativ (bei 1 von 1 untersuchten SK)	-	Negativ (bei 1 von 1 untersuchten SK)	0 von 2
	Insgesamt 4 angefressen	Insgesamt 1 angefressen					
Gruppe 2 KK + EK	10 von 10 <u>Tag*:</u> 4(1), 71(1), 93(1), 129(1), 153(2), 157(1), 270(3)	5 von 5 <u>Tag*:</u> 6(1), 8(1), 13(1), 16(2)	0	Positiv (bei 5 von 7 untersuchten KK)	Positiv (bei 3 von 3 untersuchten EK)	Positiv (bei 4 von 5 untersuchten KK)	9 von 12
	0	Insgesamt 1 angefressen					
Gruppe 3 KK + EK	10 von 10 <u>Tag*:</u> 2(3), 99(1), 115(1), 116(1), 130(1), 135(1), 237(2)	5 von 5 <u>Tag*:</u> 51(1), 99(1), 115(1), 142(1), 243(1)	0	Positiv (bei 5 von 6 untersuchten KK)	Negativ (bei 2 von 2 untersuchten EK)	-	5 von 6
	Insgesamt 1 angefressen	0					
Gruppe 4 KK + EK	6 von 10 <u>Tag*:</u> 4(1), 131(1), 205(1), 219(1), 243(2)	4 von 5 <u>Tag*:</u> 4(1), 83(2), 142(1)	4 <u>Tag:</u> 278	Positiv (bei 8 von 8 untersuchten KK)	Negativ (bei 1 von 1 untersuchten EK)	Positiv (bei 1 von 1 untersuchten KK)	9 von 9
Gruppe 5 KK + EK	8 von 10 <u>Tag*:</u> 4(1), 8(1), 121(1), 191(1), 260(1), 268(3)	5 von 5 <u>Tag*:</u> 132(1), 193(2), 274(2)	2 <u>Tag:</u> 278	Positiv (bei 3 von 4 untersuchten KK)	-	Positiv (bei 2 von 2 untersuchten KK)	5 von 6
Gruppe 6 KK + EK	10 von 10 <u>Tag*:</u> 2(2), 5(1), 12(2), 29(1), 30(1), 91(1), 235(1), 254(1)	5 von 5 <u>Tag*:</u> 123(1), 131(1), 199(1), 254(2)	0	-	-	Negativ (bei 2 von 2 untersuchten KK)	0 von 2
		Insgesamt 2 angefressen					
Gruppe 7 KK + EK	8 von 10 <u>Tag*:</u> 4(1), 69(1), 87(1), 99(1), 101(1), 183(1), 228(1), 246(1)	5 von 5 <u>Tag*:</u> 14(1), 22(2), 31(1), 166(1)	2 <u>Tag:</u> 278	Positiv (bei 1 von 2 untersuchten KK)	-	Negativ (bei 2 von 2 untersuchten KK)	1 von 4
		Insgesamt 1 angefressen					
Gruppe 8 KK + EK	6 von 8 <u>Tag*:</u> 4(2), 10(2), 129(2)	4 von 4 <u>Tag*:</u> 55(3), 69(1)	1 <u>Tag:</u> 278	Positiv (bei 2 von 3 untersuchten KK)	Positiv (bei 2 von 2 untersuchten EK)	-	2 von 3

SK = Signalkrebs, **KK** = Kamberkrebs, **EK** = Edelkrebs; **A.a.** = *Aphanomyces astaci*,

Eutha. = euthanasierte; (-) nicht untersucht

Tag*: 2(3) bedeutet, dass am 2.Tag nach Versuchsbeginn 3 Krebse verendet sind (etc.)

Tabelle 13: Zusammenhang zwischen lichtmikroskopisch festgestellten Pilzhyphen und dem Nachweis von *Aphanomyces astaci* mittels PCR bei den Krebsen in den Versuchsgruppen

	Nordamerik. Krebse mit Melanin	Nordamerik. Krebse mit Pilzhyphen	Nordamerik. Krebse mit Melanin & Pilzhyphen	Nordamerik. Krebse mit Pilzhyphen + <i>A.a.</i> -Nachweis	Edelkrebse mit Pilzhyphen + <i>A.a.</i> -Nachweis
	Lichtmikroskopischer Nachweis			PCR	
Gruppe 1*	1 SK von 10	0 von 10	0 von 10	0 von 10	0 von 10
Gruppe 2*	10 KK von 10 untersch. große Melanisierungen	5 KK von 10 mittel-/hochgradig	5 KK von 10	5 KK von 10	3 EK von 5 hochgr. Hyphen + <i>A.a.</i>
Gruppe 3*	10 KK von 10 untersch. große Melanisierungen	5 KK von 10 mittelgradig	5 KK von 10	5 KK von 10	2 EK von 5 geringgr. Hyphen Negativ !!!
Gruppe 4*	10 KK von 10 untersch. große Melanisierungen	8 KK von 10 mittel-/hochgradig	8 KK von 10	8 KK von 10	1 EK von 5 geringgr. Hyphen; Negativ !!!
Gruppe 5*	9 KK von 10 untersch. große Melanisierungen	5 KK von 10 gering-/hochgradig	5 KK von 10	4 KK von 10	0 EK von 5
Gruppe 6*	7 KK von 10 untersch. große Melanisierungen	0 von 10	0 von 10	0 von 10	0 von 5
Gruppe 7*	10 KK von 10 untersch. große Melanisierungen	3 KK von 10 geringgradig	3 KK von 10	1 KK von 10	0 von 5
Gruppe 8*	7 KK von 7 untersch. große Melanisierungen	3 KK von 10 gering-/mittelgradig	3 KK von 10	2 KK von 10	2 EK von 5 hochgr. Hyphen + <i>A.a.</i>

SK = Signalkrebs, KK = Kamberkreb, EK = Edelkreb; **A.a.** = *Aphanomyces astaci*,

* Je Gruppe wurden 5 Edelkrebse und 10 nordamerikanische Krebse eingesetzt (Ausnahme Gr.8, hier waren nur 7 Krebse vorhanden); jedoch wurden einige Krebse nach ihrer Häutung angefressen und konnten daher nicht mehr untersucht werden.

Bevor die Ergebnisse der einzelnen Versuchsgruppen aufgeführt werden, wird an dieser Stelle die Verwendung des 2.Eluates anstelle des 1.Eluates in der PCR erläutert.

Unterschiede in der Bandenstärke beim Einsatz des 1. oder 2. Eluates

Als letzter Schritt der DNA Isolierung erfolgt laut Protokoll des DNeasy[®]Tissue Kit (Qiagen) eine doppelte Eluierung in AE-Puffer. Dabei kann, je nach erwarteter DNA-Konzentration, in 50µl, 100µl oder 200µl AE-Puffer eluiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde immer in 100µl eluiert, da vorherige Versuche eine zu geringe DNA-Ausbeute beim Eluieren in 200µl aufwiesen.

In einer PCR wurden die DNA-Konzentrationen des 1. und 2.Eluates verglichen. Hierbei wies das 2.Eluates eine höhere Konzentration an DNA als das 1.Eluate auf. Gleiches wird im Handbuch des DNeasy[®]Tissue Kit (Qiagen) beschrieben.

Das PCR-Bild zeigt den Unterschied beim Einsatz eines Aliquots des 1. oder 2. Eluates.

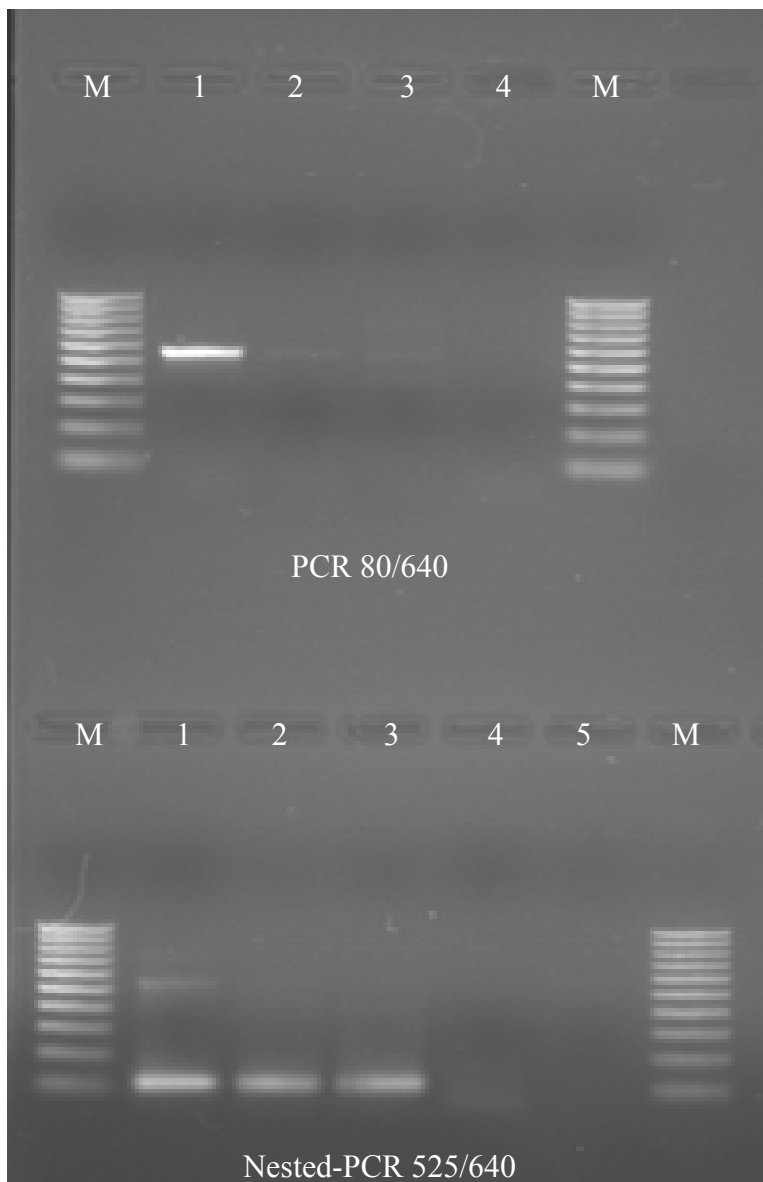


Abbildung 24: Vergleich von Eluat 1 und Eluat 2 der DNA-Extraktion

M: 100 bp DNA-Marker

Spur 1: D_{1/96} 1:10 (Positivkontrolle)

Spur 2: Gr. 2 KK 6 Eluat 1

Spur 3: Gr. 2 KK 6 Eluat 2

Spur 4: Negativkontrolle

Spur 5: Negativkontrolle der PCR

Das Signal bei Spur 3 (Eluat 2) ist etwas stärker als das bei Spur 2 (Eluat1).

Daher wurde bei allen nachfolgenden Polymerasekettenreaktionen ein Aliquot des 2. Eluates als Template in die PCR eingesetzt.

Versuchsgruppe 1:

Es wurde von je einem Signalkrebs aus der Versuchs-Gruppe und aus der Reserve-Gruppe DNA extrahiert und in die PCR eingesetzt.

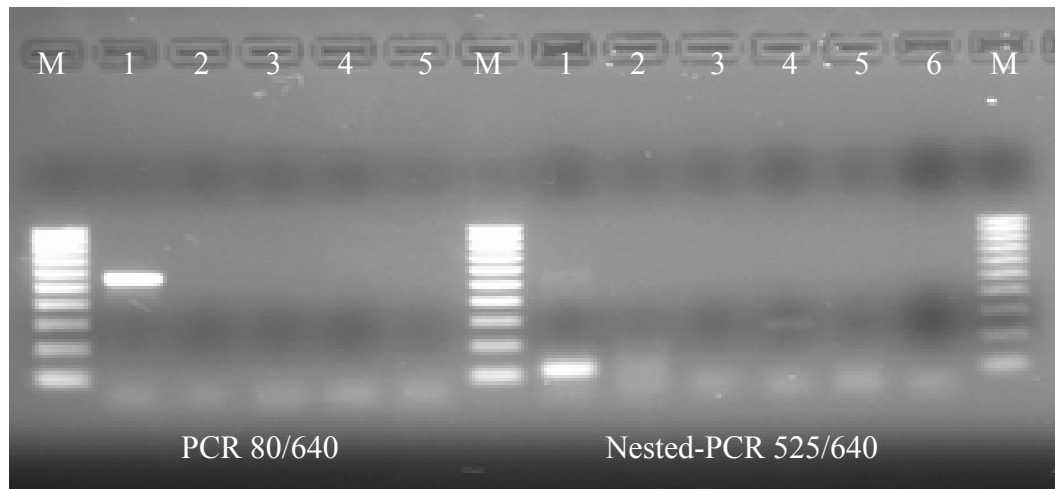


Abbildung 25: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte mit den Proben aus Versuchsgruppe 1 (Signalkrebse + Edelkrebse) und Reserve-Gruppe 1

M: 100 bp DNA-Marker

Spur 1: D_{1/96} 1:10 (Positivkontrolle)

Spur 2: Gr. 1 SK 4

Spur 3: Negativkontrolle

Spur 4: Reserve-Gr. 1 Krebs I WK

Spur 5: Negativkontrolle

Spur 6: Negativkontrolle der Nested-PCR

Bei keinem der untersuchten Krebse konnte *Aphanomyces astaci* –DNA mittels PCR nachgewiesen werden.

Versuchsgruppe 2:

Bei dieser Gruppe wurden zusätzlich 5 Kamberkrebse aus der Reservegruppe auf ihren Carrier-Status getestet. Diese wurden getötet, sezziert, lichtmikroskopisch untersucht und aus 6 verschiedenen Stellen wurde DNA extrahiert (siehe **III.C.3**).

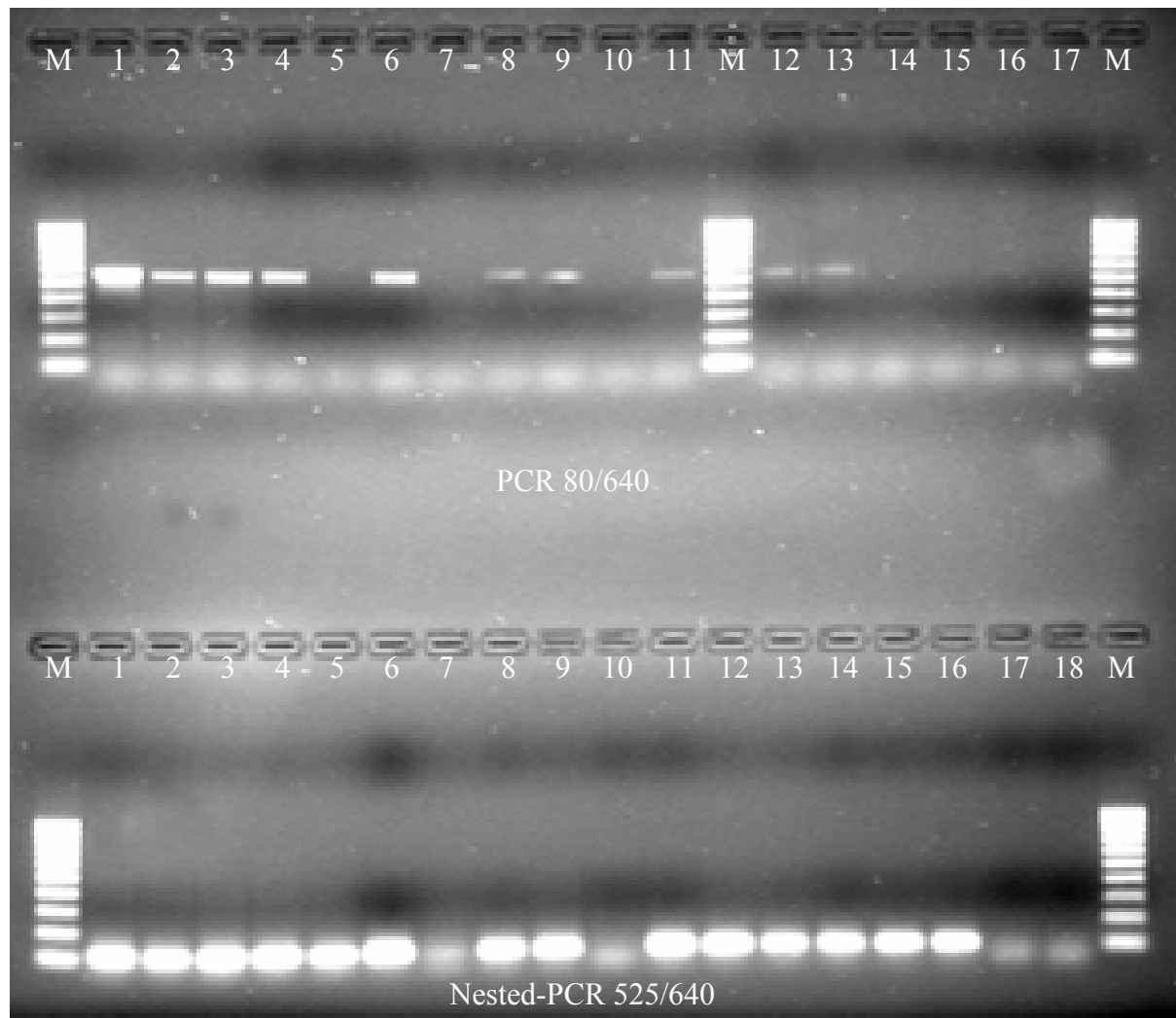


Abbildung 26: : Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte mit den Proben aus Versuchsgruppe 2 (Kamberkrebse + Edelkrebse) und Reserve-Gruppe 2

M: 100 bp DNA-Marker

Spur 1: D_{1/96} 1:10 (Positivkontrolle)

Spur 2: Gr. 2 EK 1

Spur 3: Gr. 2 EK 2

Spur 4: Gr. 2 EK 4

Spur 5: Gr. 2 KK 1 **

Spur 6: Gr. 2 KK 4

Spur 7: Gr. 2 KK 5

Spur 8: Gr. 2 KK 6

Spur 9: Gr. 2 KK 7

Spur 10: Gr. 2 KK 8 Stool-Kit

Spur 11: Gr. 2 KK 10

Spur 12: Reserve-Gr. 2 KK I

Spur 13: Reserve-Gr. 2 KK II

Spur 14: Reserve-Gr. 2 KK III

Spur 15: Reserve-Gr. 2 KK IV

Spur 16: Reserve-Gr. 2 KK V

Spur 17: Negativkontrolle

Spur 18: Negativkontrolle der Nested-PCR

** hier wurde der komplette Krebspanzer in die DNA-Extraktion eingesetzt (siehe **III.B.1.2**)

Die 3 untersuchten Edelkrebse waren **Krebspest positiv**. Von den 12 examinierten Kamberkrebse (7 aus der Versuchs-Gruppe und 5 aus der Reserve-Gruppe) waren **10 Tiere positiv**.

Dass hier ein hochgradiger Befall mit *Aphanomyces astaci* vorlag, ist erkennbar durch die bereits in der PCR mit den äußeren Primern aufgetretenen Banden.

Versuchsgruppe 3:

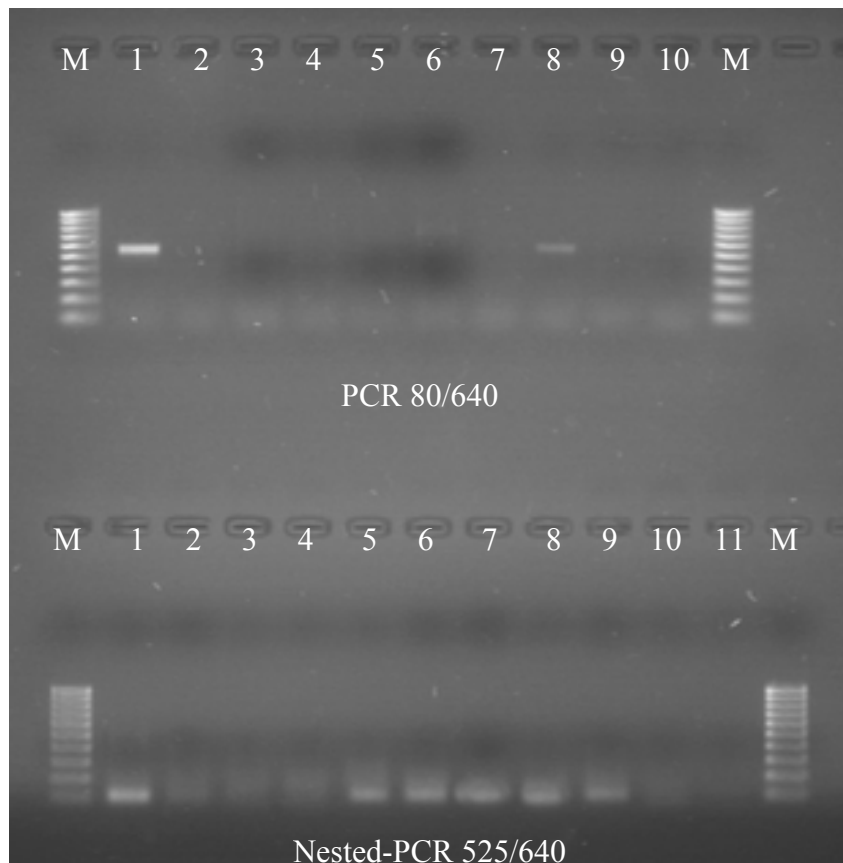


Abbildung 27: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte mit den Proben aus Versuchsguppe 3 (Kamberkrebse + Edelkrebse)

M: 100 bp DNA-Marker

Spur 1: D_{1/96} 1:10 (Positivkontrolle)

Spur 2: Gr. 3 EK 3

Spur 3: Gr. 3 EK 4

Spur 4: Gr. 3 KK 1

Spur 5: Gr. 3 KK 3

Spur 6: Gr. 3 KK 4

Spur 7: Gr. 3 KK 5

Spur 8: Gr. 3 KK 6

Spur 9: Gr. 3 KK 8

Spur 10: Negativkontrolle

Spur 11: Negativkontrolle der Nested-PCR

Das Ergebnis war bei den Kamberkrebse Nr.3, Nr.4 Nr.5 Nr.6, Nr.8 **Krebspest positiv**. Bei Kamberkrebs Nr.6 war bereits in der PCR mit den äußeren Primern eine Bande sichtbar. Die beiden Edelkrebse und Kamberkrebs Nr.1 waren negativ.

Versuchsgruppe 4:

Es wurde ein aus der Reserve-Gruppe stammender verendeter Kamberkrebs seziiert und lichtmikroskopisch untersucht. Er wies einige kleine melanisierte Stellen in Bereich der weichen Kutikula auf und es bestand der Verdacht auf Pilzhyphen. Anschließend wurde aus diesem Bereich DNA extrahiert und ebenfalls in die PCR eingesetzt.

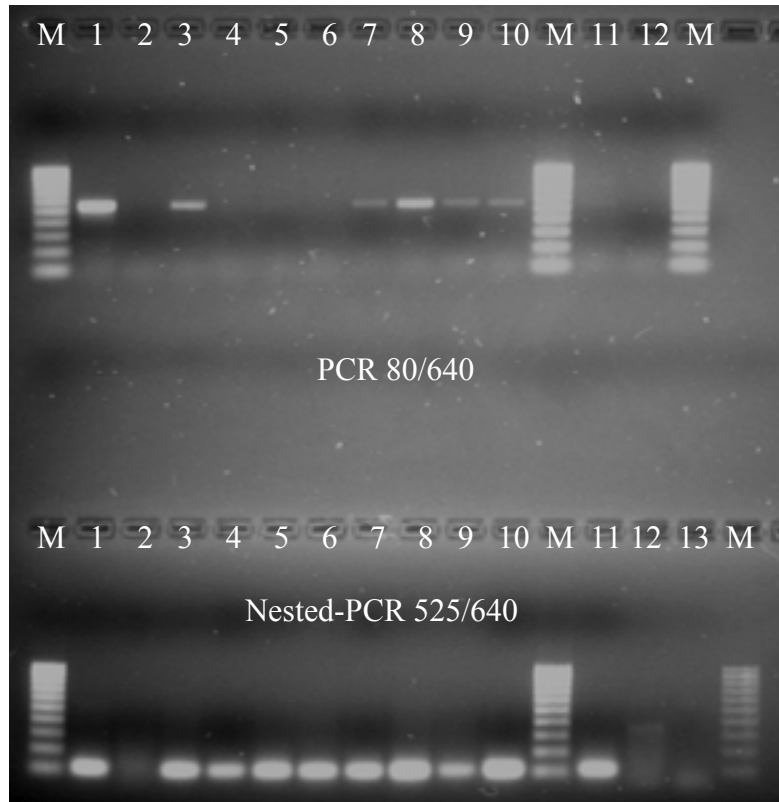


Abbildung 28: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte mit den Proben aus Versuchsgruppe 4 (Kamberkrebse + Edelkrebse) und Reserve-Gruppe 4

M: 100 bp DNA-Marker

Spur 1: D_{1/96} 1:10 (Positivkontrolle)

Spur 2: Gr. 4 EK 5

Spur 3: Gr. 4 KK 2

Spur 4: Gr. 4 KK 3

Spur 5: Gr. 4 KK 4

Spur 6: Gr. 4 KK 5 **

Spur 7: Gr. 4 KK 6

Spur 8: Gr. 4 KK 7

Spur 9: Gr. 4 KK 8

Spur 10: Gr. 4 KK 10

Spur 11: Reserve-Gr. 4 KK I

Spur 12: Negativkontrolle

Spur 13: Negativkontrolle der Nested-PCR

** hier wurde der komplette Krebspanzer in die DNA-Extraktion eingesetzt (siehe **III.B.1.2**)

Aphanomyces astaci konnte bei den Kamberkrebsen aus der Versuchsgruppe, sowie bei einem Kamberkrebs aus der Reserve-Gruppe nachgewiesen werden. Der untersuchte Edelkrebs hingegen wies kein Signal in der PCR auf.

Es lag hier ein **hochgradiger Pilzbefall** vor, da bei 5 von 9 untersuchten Kamberkrebsen bereits bei der PCR mit den äußeren Primern eine Bande vorhanden war.

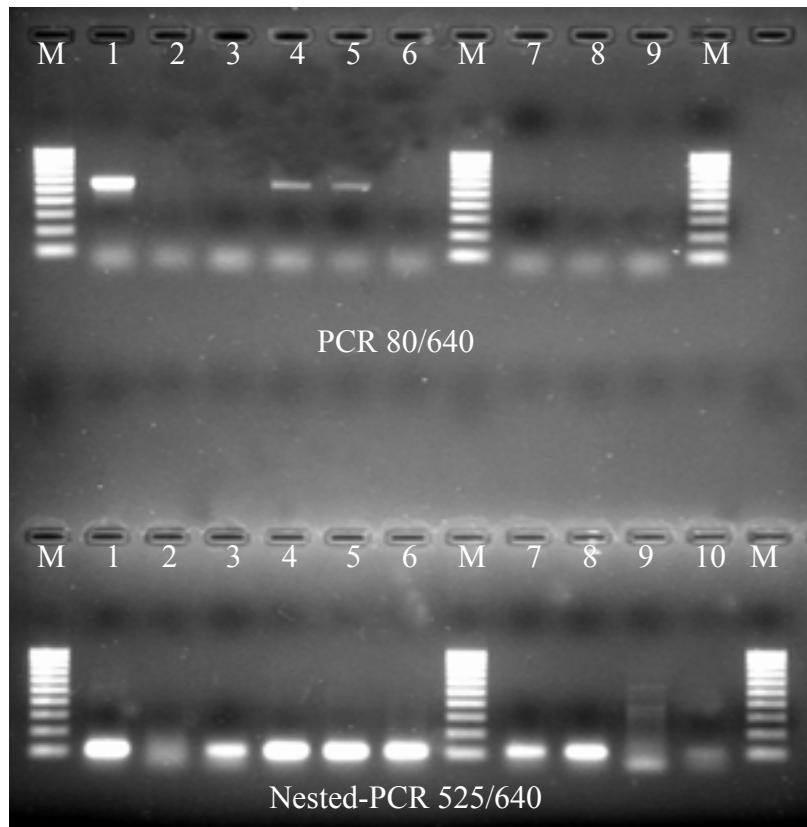
Versuchsgruppe 5:

Abbildung 29: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte mit den Proben aus Versuchungsgruppe 5 (Kamberskrebse + Edelkrebse) und Reserve-Gruppe 5

M: 100 bp DNA-Marker

Spur 1: D_{1/96} 1:10 (Positivkontrolle)

Spur 2: Gr. 5 KK 2

Spur 3: Gr. 5 KK 3

Spur 4: Gr. 5 KK 5

Spur 5: Gr. 5 KK 8

Spur 6: Gr. 5 KK 10

Spur 7: Reserve-Gr. 5 KK I

Spur 8: Reserve-Gr. 5 KK II

Spur 9: Negativkontrolle

Spur 10: Negativkontrolle der Nested-PCR

4 Kamberskrebse aus der Versuchungsgruppe und 2 aus der Reserve-Gruppe waren Krebspest positiv. Zwei der aus der Versuchungsgruppe stammenden Kamberskrebse zeigten bereits in der PCR mit den äußeren Primern das für den Krebspesterreger charakteristische Signal. Dies weist auf einen **hochgradigen Befall von *Aphanomyces astaci*** hin

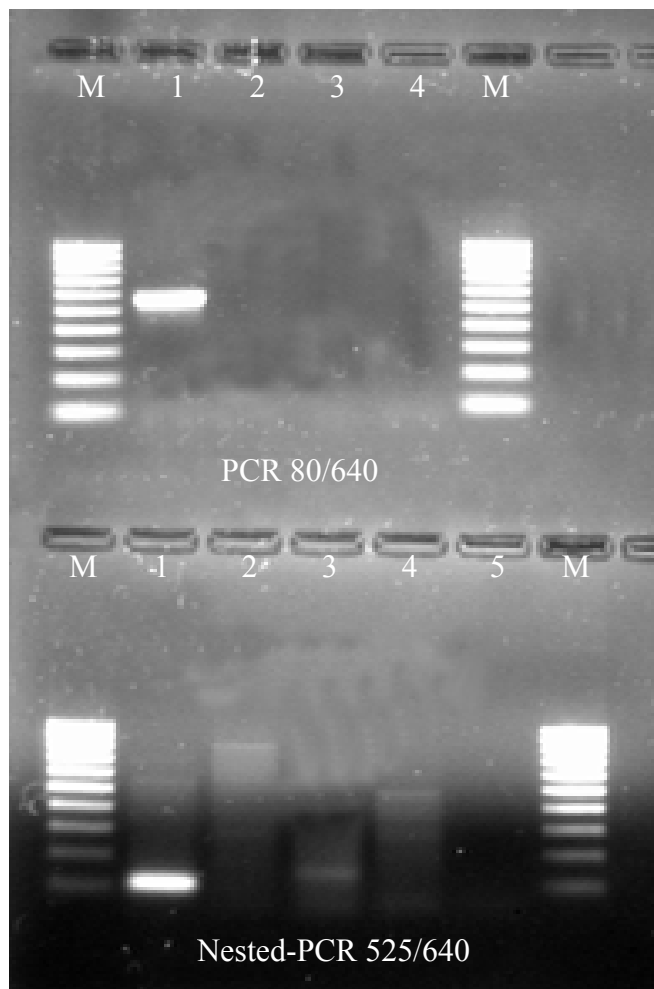
Versuchsgruppe 6:

Abbildung 30: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte mit den Proben aus Versuchungsgruppe 6 (Kamberskrebse + Edelkrebse) und Reserve-Gruppe 6

M: 100 bp DNA-Marker

Spur 1: D_{1/96} 1:10 (Positivkontrolle)

Spur 2: Reserve-Gr. 6 KK I

Spur 3: Reserve-Gr. 6 KK II

Spur 4: Negativkontrolle

Spur 5: Negativkontrolle der Nested-PCR

Es wurde von 2 Kamberskrebsen aus der Reserve-Gruppe die DNA extrahiert und diese wurde anschließend in die PCR eingesetzt. Das Ergebnis war bei beiden **negativ**.

Somit ist diese Gruppe von Kamberskrebsen **nicht** mit *Aphanomyces astaci* infiziert.

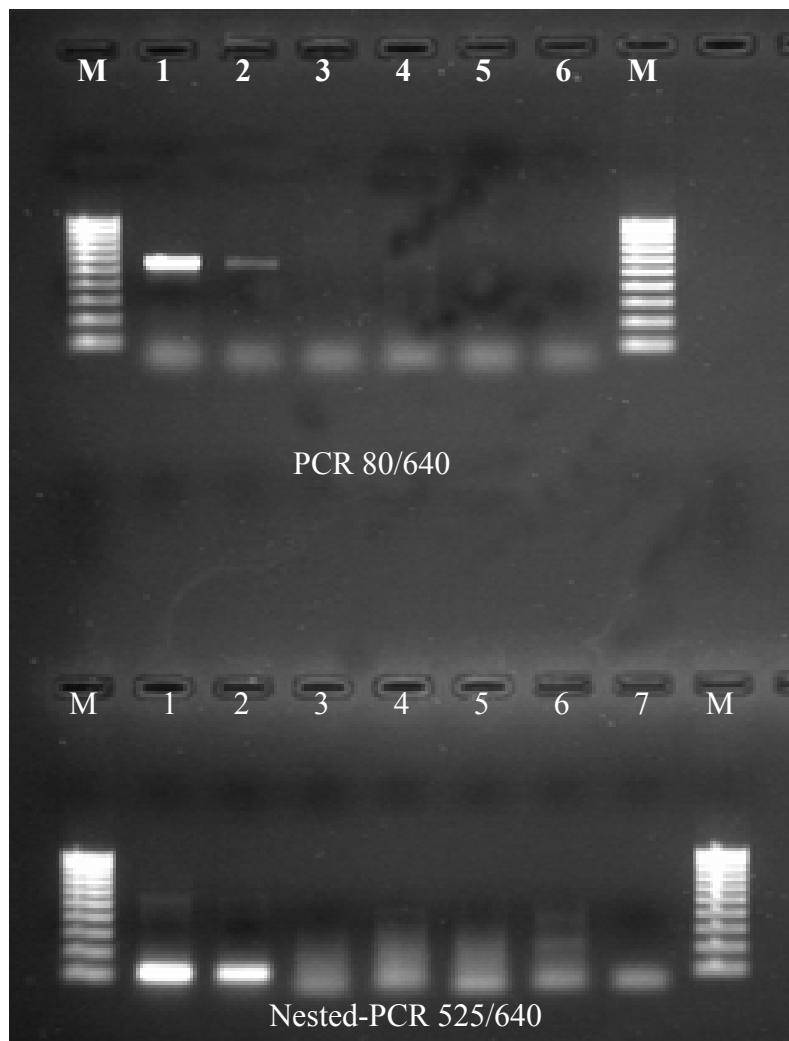
Versuchsgruppe 7:

Abbildung 31: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte mit den Proben aus Versuchsgruppe 7 (Kammerkrebse + Edelkrebse) und Reserve-Gruppe 7

M: 100 bp DNA-Marker

Spur 1: D_{1/96} 1:10 (Positivkontrolle)

Spur 2: Gr. 7 KK 1

Spur 3: Gr. 7 KK 3

Spur 4: Reserve-Gr. 7 KK I

Spur 5: Reserve-Gr. 7 KK II

Spur 6: Negativkontrolle

Spur 7: Negativkontrolle der Nested-PCR

Das Ergebnis der PCR war nur bei dem hyphenbefallenen Krebs **positiv**. Die anderen 3 Kammerkrebse wiesen kein Signal auf.

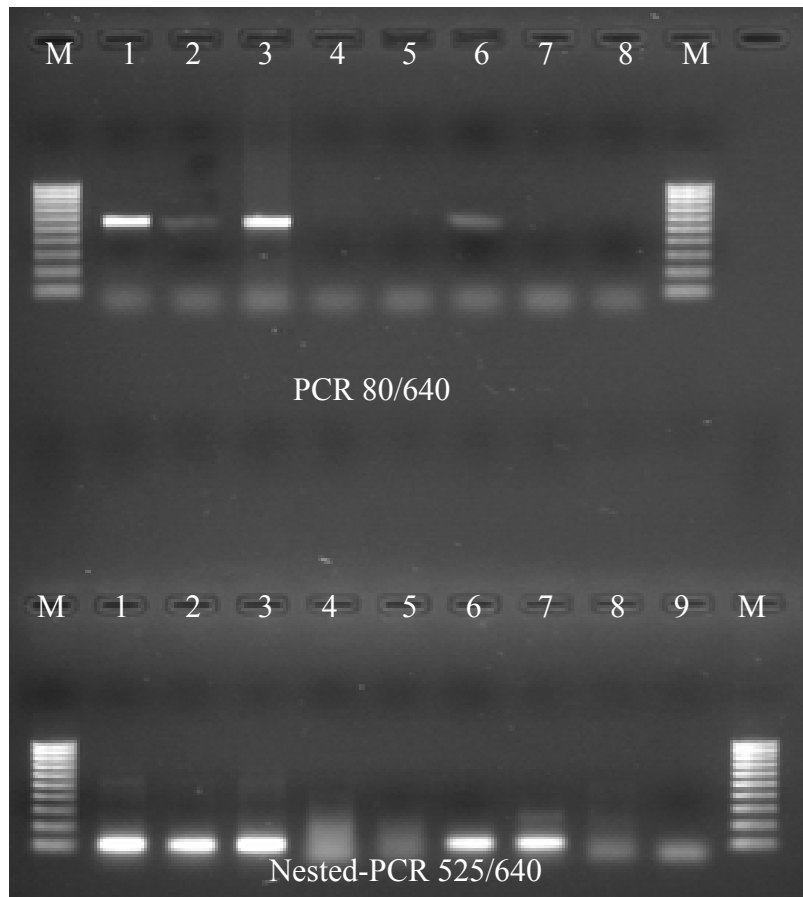
Versuchsgruppe 8:

Abbildung 32: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte mit den Proben aus Versuchsgruppe 8 (Kamberkrebse + Edelkrebse)

M: 100 bp DNA-Marker

Spur 1: D_{1/96} 1:10 (Positivkontrolle)

Spur 2: Gr. 8 EK 1

Spur 3: Gr. 8 EK 2

Spur 4: Gr. 8 KK 2 Tissue-Kit

Spur 5: Gr. 8 KK 2 Stool-Kit

Spur 6: Gr. 8 KK 5

Spur 7: Gr. 8 KK 7

Spur 8: Negativkontrolle

Spur 9: Negativkontrolle der Nested-PCR

Das Ergebnis der PCR war bis auf einen Kamberkrebs bei allen **Krebspest positiv**.

3. Vergleich 6 verschiedener Krebsbereiche, um die für den Pilznachweis geeignete herauszufinden:

Zum Vergleich wurden Tiere aus Gruppen mit unterschiedlicher Befallstärke herangezogen. Es wurde eine hochgradig infizierte Gruppe (Gr.2) mit einer mittelgradig infizierten (Gr.4) und einer nicht infizierten Gruppe (Gr.1+Gr.6) verglichen.

3.1 Vergleich 6 verschiedener Stellen bei einer hochgradig infizierten Gruppe

Hierfür wurden Kamberkrebse aus der **Reserve-Gruppe 2** eingesetzt, da die entsprechende Versuchs-Gruppe hochgradig infizierte Krebse aufwies.

Es wurden 5 Kamberkrebse aus der Reservegruppe entnommen und mittels Chloroform euthanasiert. Im Anschluss daran wurden die 6 verschiedenen Bereiche steril herauspräpariert und abgewogen. Die DNA wurde mittels des DNeasy[®] Tissue Kit (Qiagen) isoliert. Dabei wurde laut Protokoll für Insekten vorgegangen. Der Unterschied zum normalen Protokoll liegt in der Menge an einsetzbarem Gewebe. Hier können anstelle von sonst 25 mg sogar 50 mg Gewebe eingesetzt werden. Die Inkubationszeit des Lysispuffers betrug 90 Min.

Am Ende wurde das 1. und 2. Eluat in je 100 µl AE-Puffer ausgewaschen.

In die PCR wurde immer ein Aliquot des 2.Eluates eingesetzt.

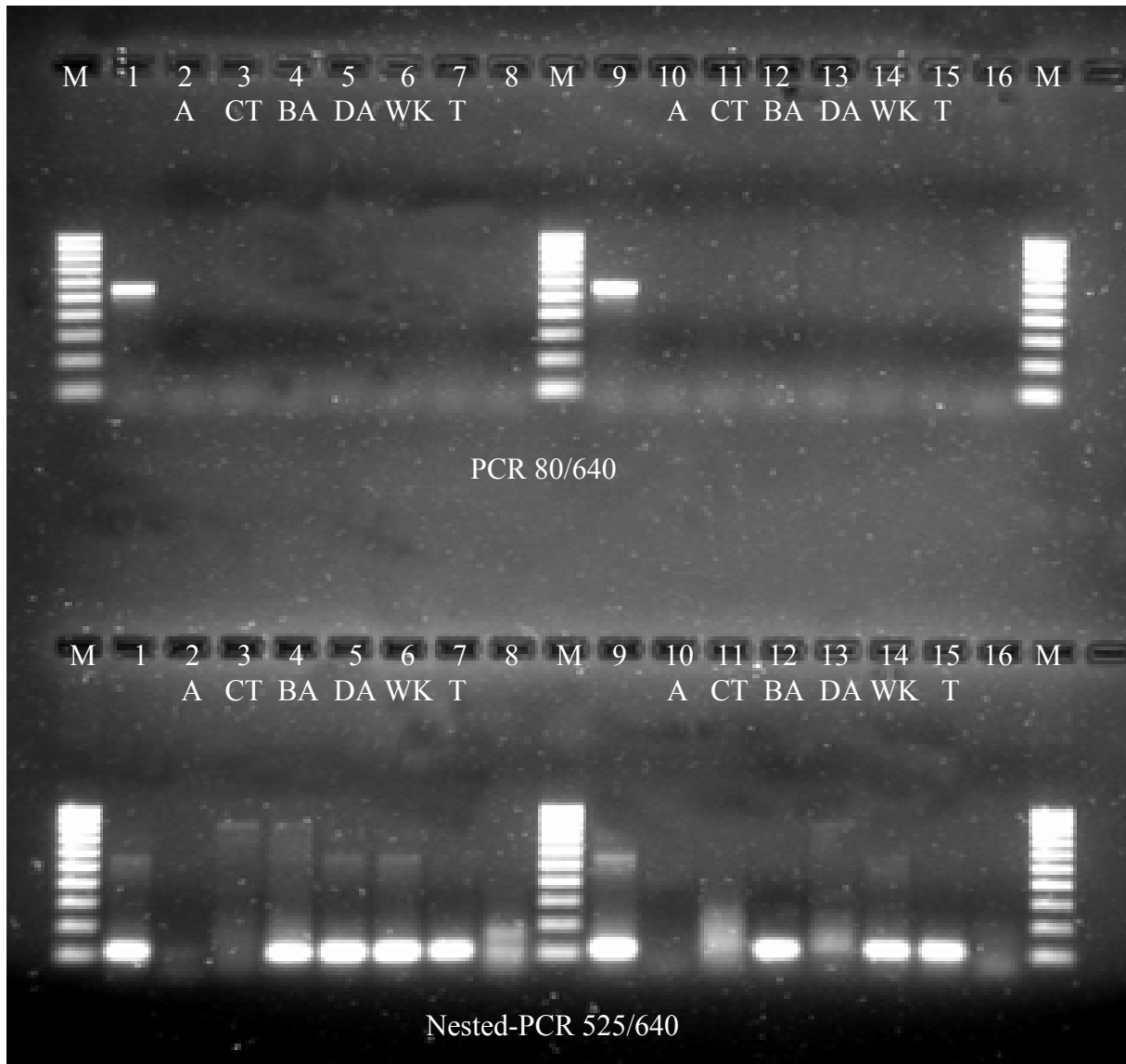


Abbildung 33: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte mit den Proben aus Reserve-Gruppe 2, Kamberkrebs I + II, 6 versch. Stellen

M: 100 bp DNA-Marker

Spur 1: D_{1/96} 1:10 (Positivkontrolle)

Spur 2 - Spur 7: Kamberkrebs Nr.I

Spur 8: Negativkontrolle

Spur 9: D_{1/96} 1:10 (Positivkontrolle)

Spur 10 – Spur 15: Kamberkrebs Nr.II

Spur 16: Negativkontrolle

A: Auge; CT: Cephalothorax; BA: Beinansatz; DA: dorsales Abdomen;

WK: weiche Kutikula; T: Telson

Bei der Nested-PCR treten starke Banden an folgenden Stellen auf: BA, DA, WK und T. Die Banden liegen bei etwa 115 bp und sind spezifisch für *Aphanomyces astaci*.

Beim Auge und beim Cephalothorax sind keine Banden sichtbar.

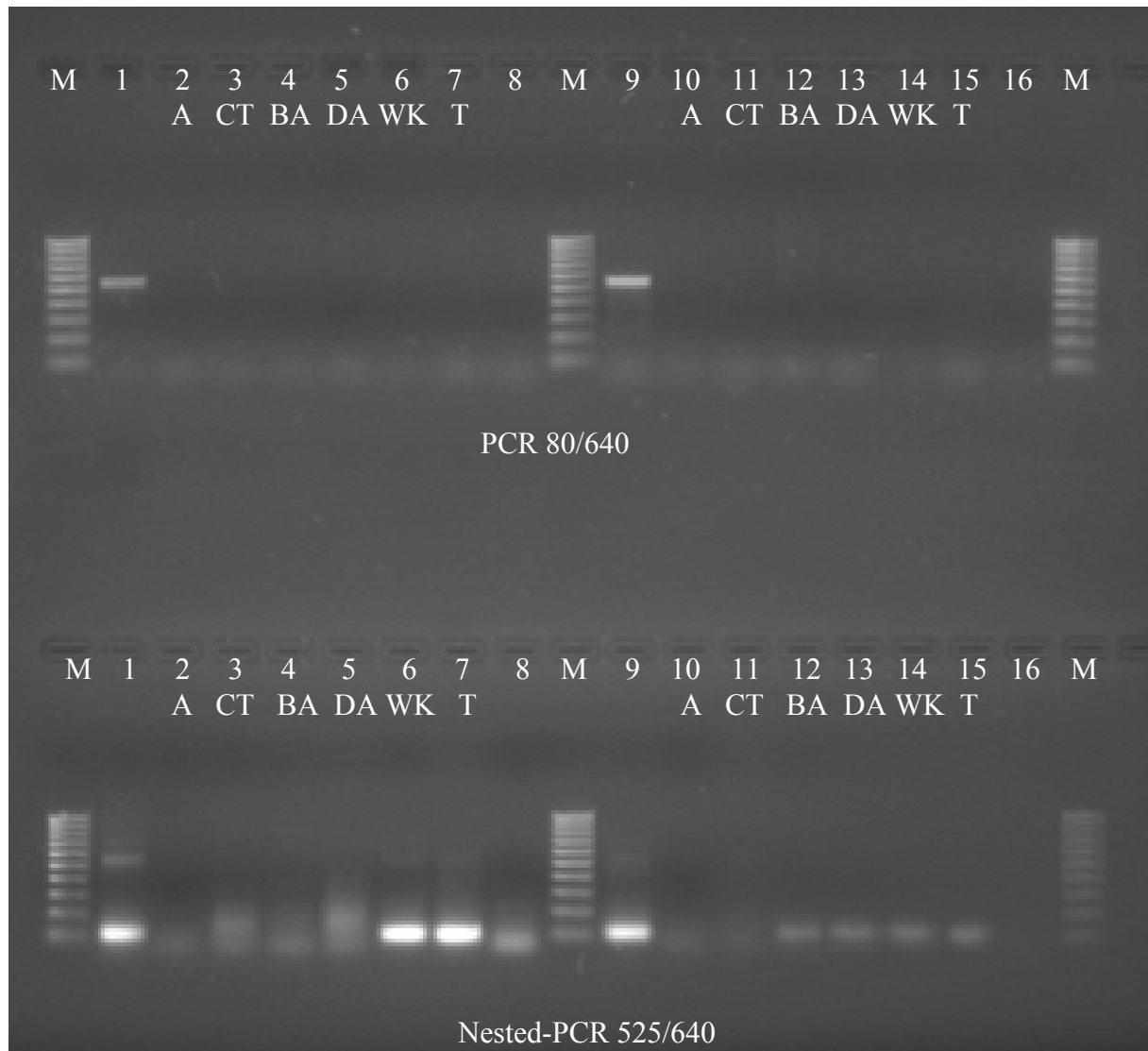


Abbildung 34: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte mit den Proben aus Reserve-Gruppe 2, Kamberkrebs III + IV, 6 versch. Stellen

M: 100 bp DNA-Marker

Spur 1: D_{1/96} 1:10 (Positivkontrolle)

Spur 2 - Spur 7: Kamberkrebs Nr.III

Spur 8: Negativkontrolle

Spur 9: D_{1/96} 1:10 (Positivkontrolle)

Spur 10 – Spur 15: Kamberkrebs Nr.IV

Spur 16: Negativkontrolle

A: Auge; CT: Cephalothorax; BA: Beinansatz; DA: dorsales Abdomen;

WK: weiche Kutikula; T: Telson

Kamberkrebs III weist in der Nested-PCR deutliche Banden in erwarteter Größe an den Stellen WK und T auf. Dagegen sind bei Kamberkrebs IV die Banden an den Stellen BA, DA, WK und T nur schwach ausgeprägt.

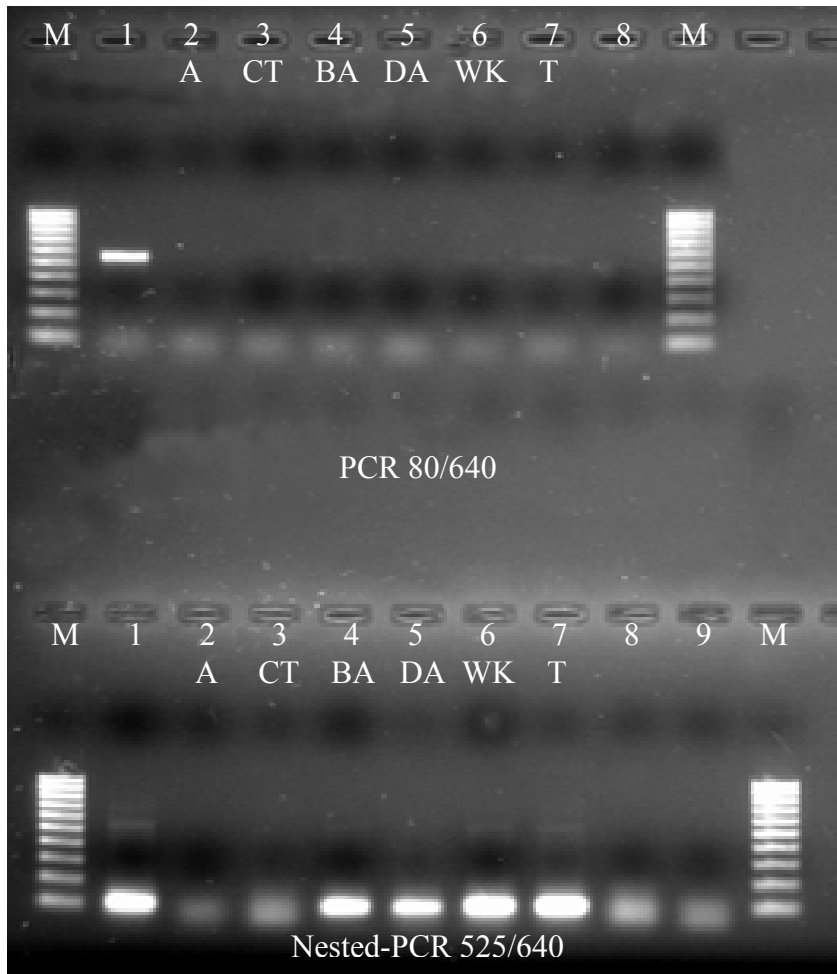


Abbildung 35: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte mit den Proben aus Reserve-Gruppe 2, Kamberkrebs V, 6 versch. Stellen

M: 100 bp DNA-Marker

Spur 1: D_{1/96} 1:10 (Positivkontrolle)

Spur 2 - Spur 7: Kamberkrebs Nr.V

Spur 8: Negativkontrolle

A: Auge; CT: Cephalothorax; BA: Beinansatz; DA: dorsales Abdomen;

WK: weiche Kutikula; T: Telson

In der „einfachen“-PCR treten bereits schwache Banden bei BA, WK und T auf. Diese zeigen sich in der Nested-PCR als kräftige Signale. Hier liegt zudem beim DA ein Signal vor.

Tabelle 14 : Zusammenfassung der Ergebnisse der hochgradig infizierten KK (Reserve-Gr.2);
Vergleich 6 verschiedener Stellen (A; CT; BA; DA; WK; T); Sektion + PCR

KK	Melanisierung Weiche Kutikula	Melanisierung Gliedermaße	Melanisierung Telson	PCR positiv
1	+	-	-	BA, DA, WK, T
2	+++	-	+++	BA, WK, T
3	++	-	+	WK, T
4	-	+	-	BA, DA, WK, T
5	+	+	+	BA, DA, WK, T

KK= Kamberkrebs; (+) wenig; (++) mittel; (+++) viel ; (-) negativ

A = Auge; CT = Cephalothorax; BA = Beinansatz; DA = dorsales Abdomen;

WK = Weiche Kutikula; T = Telson

3.2 Vergleich 6 verschiedener Stellen bei einer mittelgradig infizierten Gruppe

Als mittelgradig infizierte Gruppe wurde die **Versuchsgruppe 4** ausgewählt. Folglich wurden aus ihrer Reservegruppe 5 Kamberkrebse entnommen und mittels Chloroform getötet. Die weitere Vorgehensweise entspricht der im Abschnitt 3.1 beschriebenen Methode.

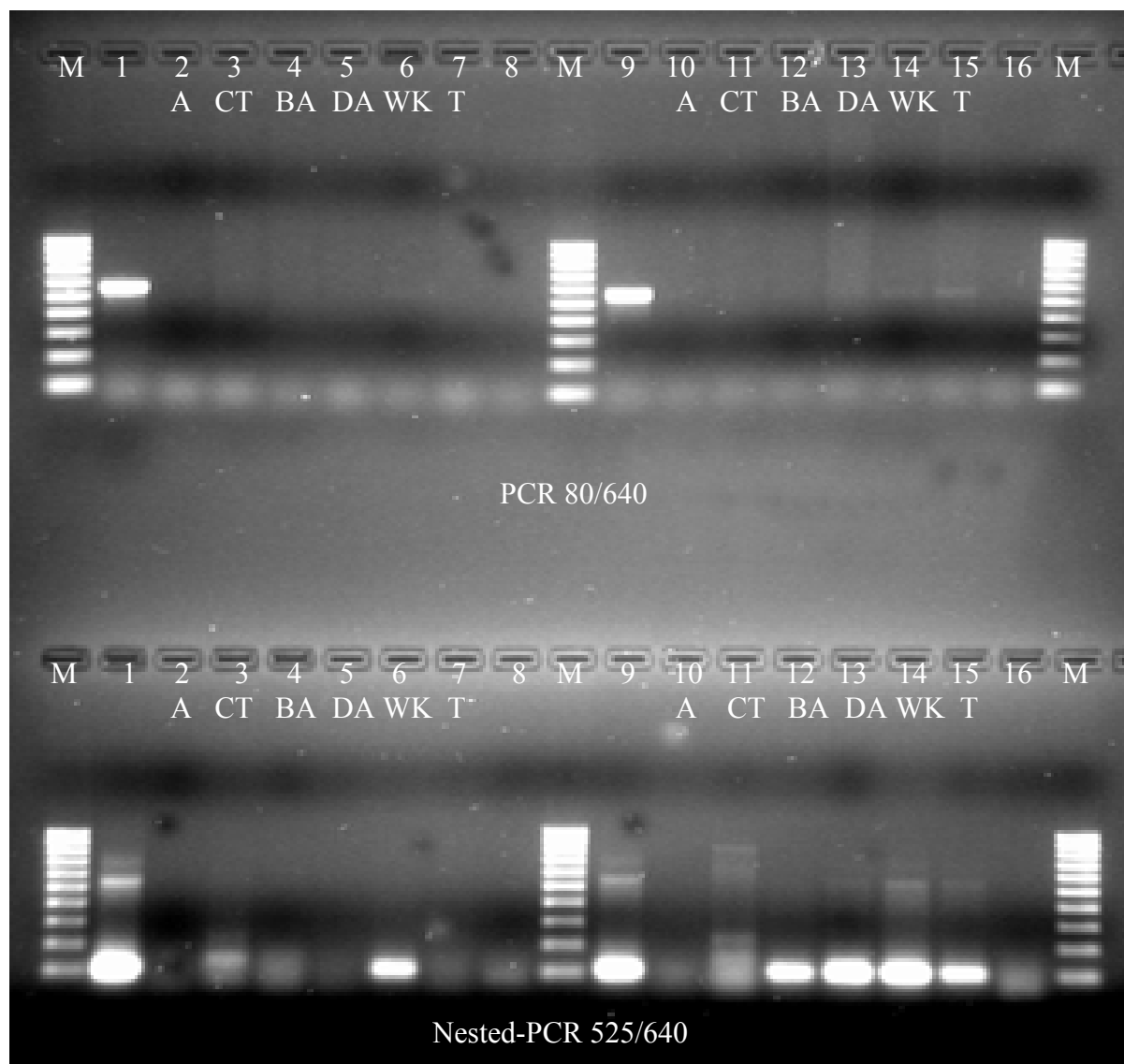


Abbildung 36: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte mit den Proben aus Reserve-Gruppe 4, Kamberkrebs I + II, 6 versch. Stellen

M: 100 bp DNA-Marker

Spur 1: D_{1/96} 1:10 (Positivkontrolle)

Spur 2 - Spur 7: Kamberkrebs Nr.I

Spur 8: Negativkontrolle

Spur 9: D_{1/96} 1:10 (Positivkontrolle)

Spur 10 – Spur 15: Kamberkrebs Nr.II

Spur 16: Negativkontrolle

A: Auge; CT: Cephalothorax; BA: Beinansatz; DA: dorsales Abdomen;

WK: weiche Kutikula; T: Telson

Hier können bereits in der „einfachen“ PCR, bei Kamberkrebs Nr.I im Bereich der WK und bei Kamberkrebs Nr.II in der WK und im T, sehr schwache Banden festgestellt werden. In der Nested-PCR sind die Banden der besagten Spuren verstärkt. Zudem weist Kamberkrebs Nr.II zusätzlich Banden im Bereich BA und DA auf.

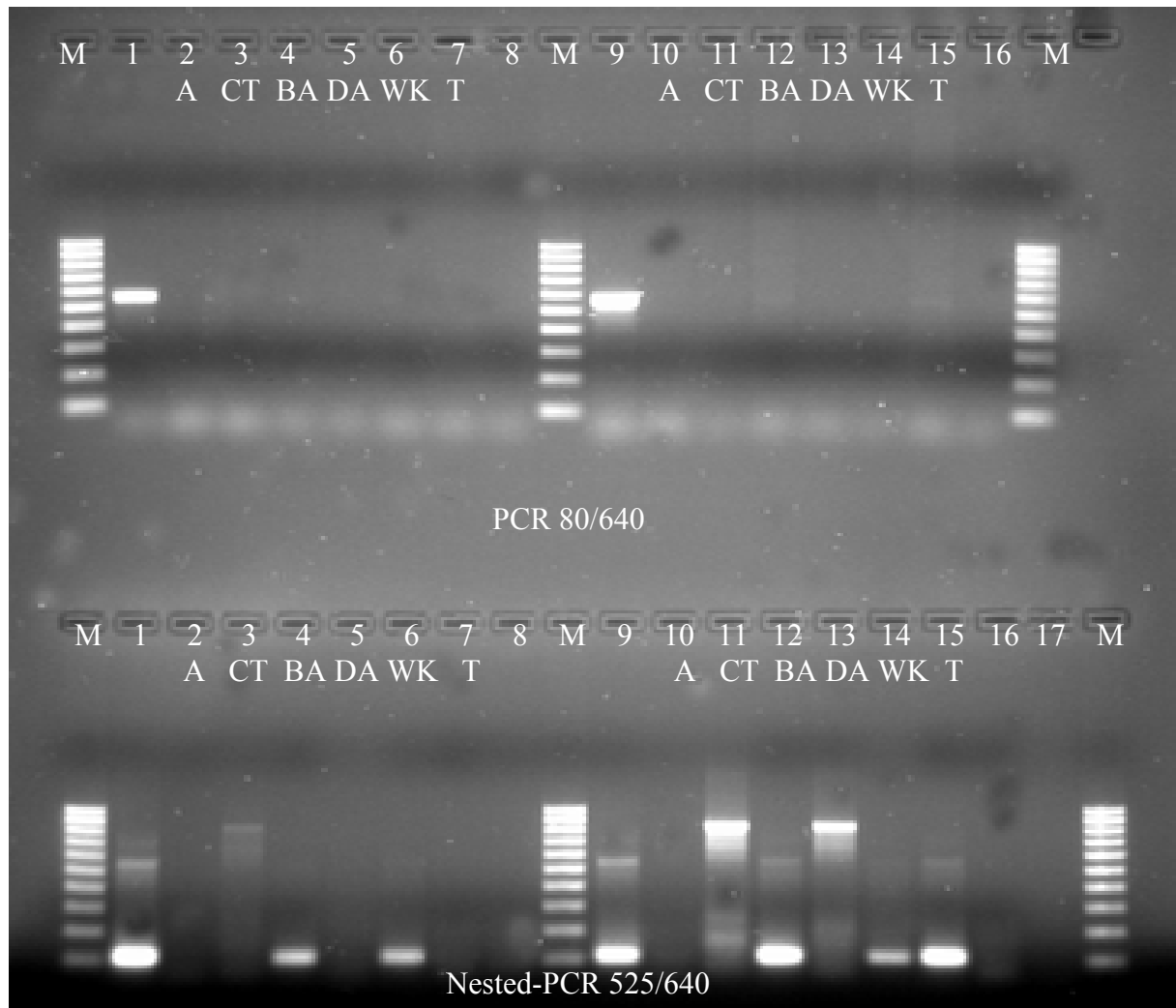


Abbildung 37: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte mit den Proben aus Reserve-Gruppe 4, Kamberkrebs III + IV, 6 versch. Stellen

M: 100 bp DNA-Marker

Spur 1: D_{1/96} 1:10 (Positivkontrolle)

Spur 2 - Spur 7: Kamberkrebs Nr.III

Spur 8: Negativkontrolle

Spur 9: D_{1/96} 1:10 (Positivkontrolle)

Spur 10 – Spur 15: Kamberkrebs Nr.IV

Spur 16: Negativkontrolle

A: Auge; CT: Cephalothorax; BA: Beinansatz; DA: dorsales Abdomen;
WK: weiche Kutikula; T: Telson

In der Nested-PCR befinden sich die zu erwartenden Banden an folgenden Stellen: BA, WK und T. Zusätzlich treten unspezifische Nebenbanden in einer Größe von ca. 850 bp auf.

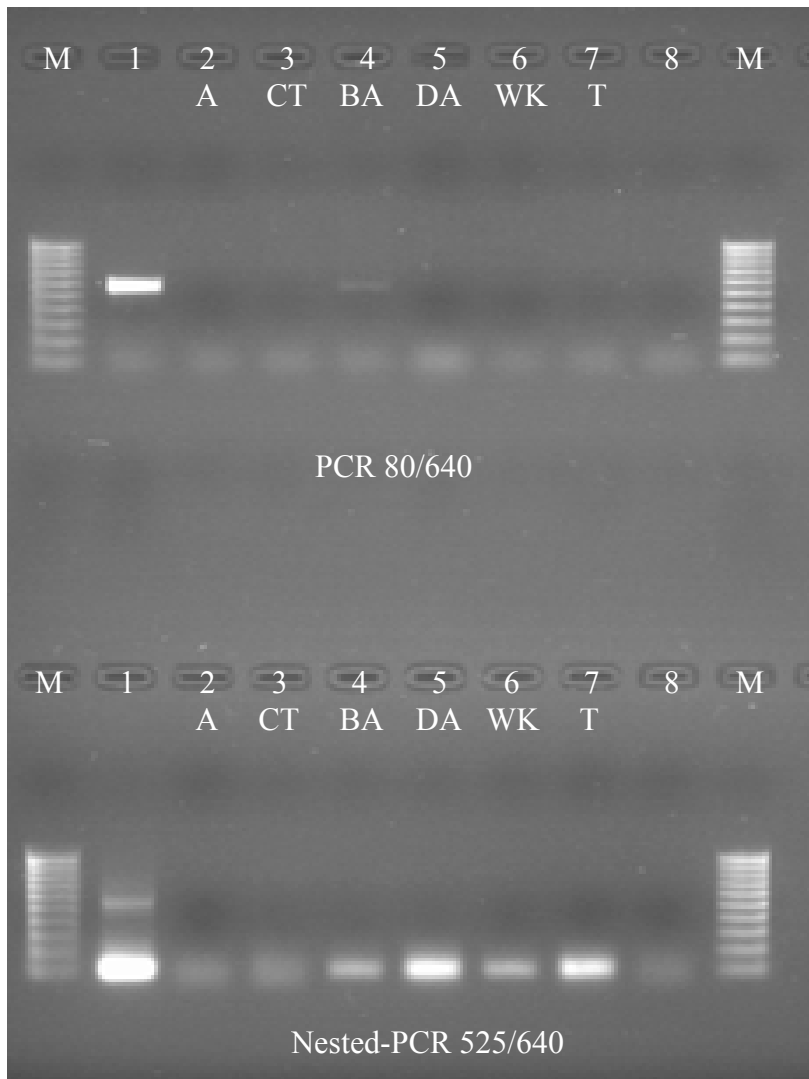


Abbildung 38: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte mit den Proben aus Reserve-Gruppe 4, Kamberkrebs V, 6 versch. Stellen

M: 100 bp DNA-Marker

Spur 1: D_{1/96} 1:10 (Positivkontrolle)

Spur 2 - Spur 7: Kamberkrebs Nr.V

Spur 8: Negativkontrolle

A: Auge; CT: Cephalothorax; BA: Beinansatz; DA: dorsales Abdomen;

WK: weiche Kutikula; T: Telson

In der „einfachen“ PCR zeigt sich im Bereich des BA ein für die Krebspest spezifisches Signal sehr schwach. In der Nested-PCR tritt die zu erwartende Bande von 115 bp bei BA, DA, WK und T auf.

Tabelle 15 : Zusammenfassung der Ergebnisse der mittelgradig infizierten KK

(Reserve-Gr.4);

Vergleich 6 verschiedener Stellen (A; CT; BA; DA; WK; T); Sektion + PCR

KK	Melanisierung Weiche Kutikula	Melanisierung Gliedermaße	Melanisierung Telson	PCR positiv
1	++	-	++	WK
2	++	++	++	BA, DA, WK, T
3	++	++	+	BA, WK
4	++	++	++	BA, WK, T
5	+	-	-	BA, DA, WK, T

KK= Kamberkrebs; (+) wenig; (++) mittel; (+++) viel ; (-) negativ

A = Auge; CT = Cephalothorax; BA = Beinansatz; DA = dorsales Abdomen;

WK = Weiche Kutikula; T = Telson

3.3 Vergleich 6 verschiedener Stellen bei einer nicht infizierten Gruppe

Von den **nicht infizierten Reserve-Gruppen (Gr.1 + Gr.6)** war keine mehr vorhanden, bei der noch 5 Krebse am Leben waren. Daher konnte sowohl aus Gr.1 als auch aus Gr.6 jeweils nur ein Krebs getötet und für die DNA-Extraktion verwendet werden.

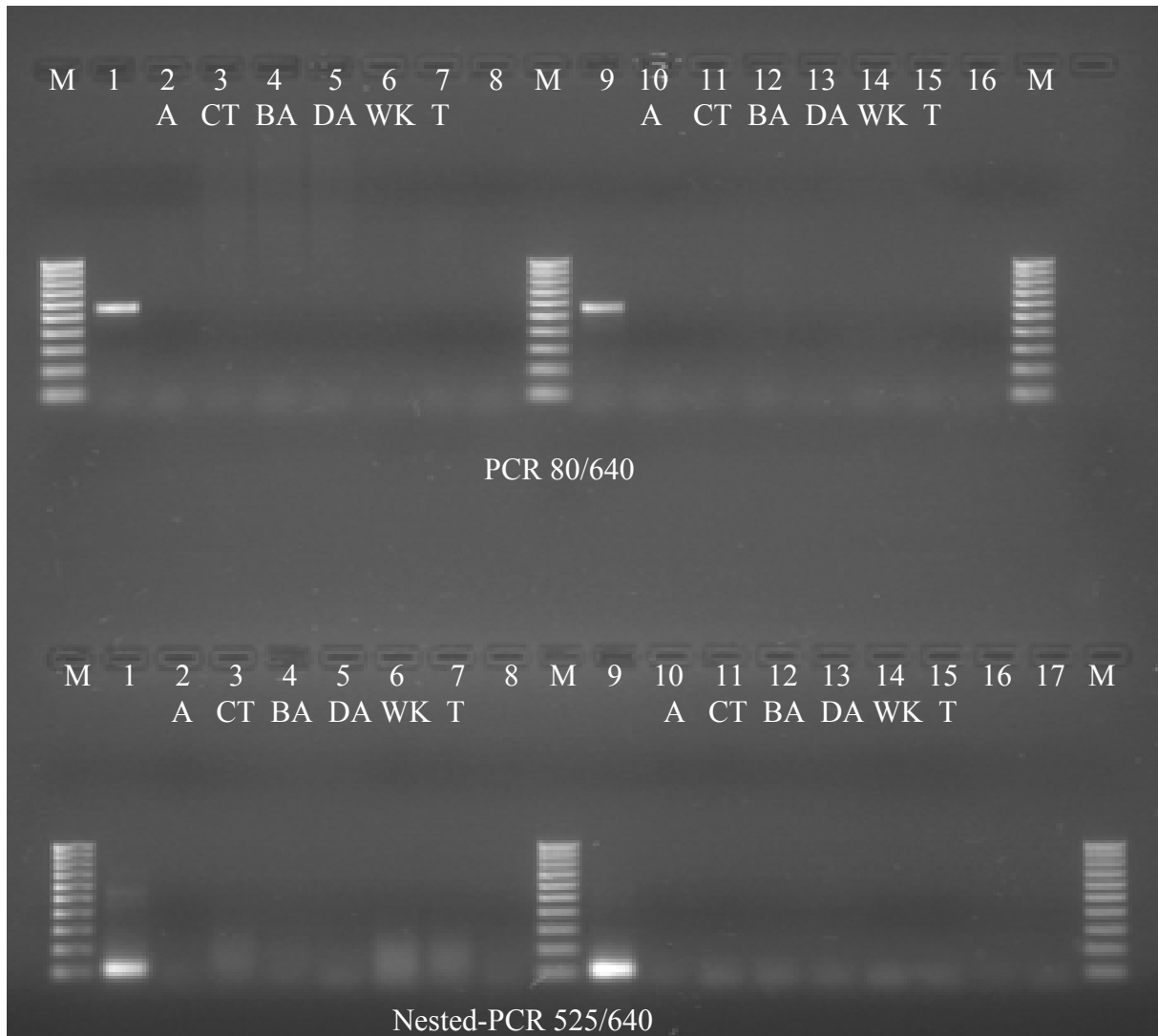


Abbildung 39: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte mit den Proben aus Reserve-Gr.1, Signalkrebs I + Reserve-Gr.6, Kamberkrebs I, 6 versch. Stellen

M: 100 bp DNA-Marker

Spur 1: D_{1/96} 1:10 (Positivkontrolle)

Spur 2 - Spur 7: R-Gr.1, Kamberkrebs Nr.I

Spur 8: Negativkontrolle

Spur 9: D_{1/96} 1:10 (Positivkontrolle)

Spur 10 – Spur 15: R-Gr.6, Kamberkrebs Nr.I

Spur 16: Negativkontrolle

A: Auge; CT: Cephalothorax; BA: Beinansatz; DA: dorsales Abdomen;
WK: weiche Kutikula; T: Telson

Es sind außer bei der Positivkontrolle weder in der „einfachen“ PCR noch in der Nested-PCR Banden vorhanden. Damit sind diese beiden Kamberkrebse nicht mit dem Krebspesterreger *Aphanomyces astaci* infiziert.

Tabelle 16 : Zusammenfassung der Ergebnisse der nicht infizierten SK + KK

(Reserve-Gruppe 1 + Reserve-Gruppe 6);

Vergleich 6 verschiedener Stellen (A; CT; BA; DA; WK; T); Sektion + PCR

	Melanisierung Weiche Kutikula	Melanisierung Gliedermaße	Melanisierung Telson	PCR positiv
SK 1	-	-	-	-
KK 1	+++	-	-	-

SK = Signalkrebs; **KK**= Kamberkrebs; (+) wenig; (++) mittel; (+++) viel ; (-) negativ

A = Auge; CT = Cephalothorax; BA = Beinansatz; DA = dorsales Abdomen;

WK = Weiche Kutikula; T = Telson

3.4 Vergleich 9 verschiedener Stellen beim Roten amerikanischen Sumpfkrebs (*Procambarus clarkii*)

In der vorliegenden Arbeit wurden in die Versuchsgruppen ausschließlich die beiden nordamerikanischen Arten Signalkrebs (*Pacifastacus leniusculus*) und Kamberkreb (*Orconectes limosus*) eingesetzt.

Jedoch ist auch der Rote amerikanische Sumpfkrebs (*Procambarus clarkii*) in Europa bereits weit verbreitet. Daher wurde bei ihm ebenfalls aus verschiedenen Geweben DNA extrahiert und diese zum Vergleich in eine PCR eingesetzt.

Zu den zuvor auserwählten 6 verschiedenen Stellen kamen noch Hepatopankreas(Hepa), Kiemen(Ki) und Muskulatur(Mus) hinzu.

Der zu untersuchende Rote amerikanische Sumpfkrebs (*Procambarus clarkii*) wurde mittels Chloroform euthanasiert und nachfolgend sezirt.

Mit Hilfe des DNeasy[®] Tissue Kit (Qiagen) wurde die DNA isoliert und in die PCR eingesetzt (siehe **Abbildung 40**).

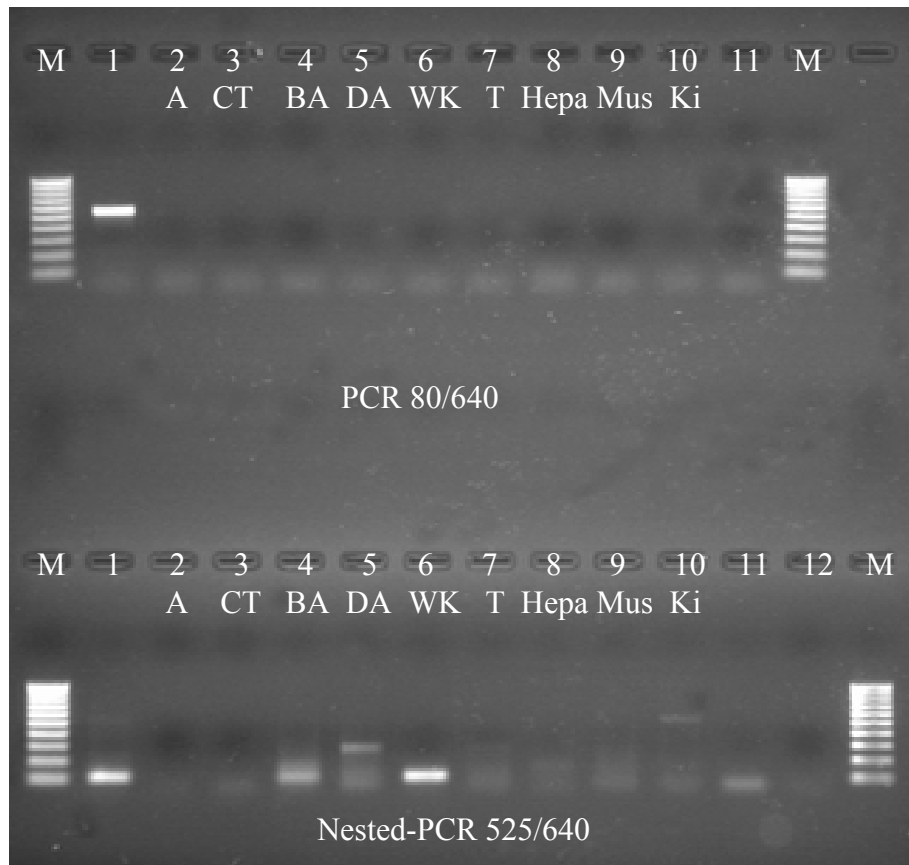


Abbildung 40: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte mit den Proben aus einem Roten amerikanischen Sumpfkrebs, 9 versch. Stellen

M: 100 bp DNA-Marker

Spur 1: $D_{1/96}$ 1:10 (Positivkontrolle)

Spur 2 - Spur 10: Roter amerik. Sumpfkrebs

Spur 11: Negativkontrolle

Spur 12: Negativkontrolle der PCR

A: Auge; CT: Cephalothorax; BA: Beinansatz; DA: dorsales Abdomen;

WK: weiche Kutikula; T: Telson; Hepa: Hepatopankreas, Mus: Muskulatur, Ki: Kiemen

Der Vergleich der 9 verschiedenen Stellen beim Roten amerikanischen Sumpfkrebs zeigt ein ähnliches Bild wie bei den beiden anderen nordamerikanischen Arten. Das stärkste Signal liegt bei der weichen Kutikula vor. Ebenfalls für den Pilznachweis geeignet scheint der Beinansatz zu sein. Beide Banden treten jedoch erst in der Nested-PCR auf.

4. Anwendung der neu entwickelten Methode bei eingesandten Krebsen:

4.1 Untersuchung von 20 eingesandten Signalkrebsen

Aus Österreich wurden 20 Signalkrebse an das Institut für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten der LMU München eingeschickt, um abzuklären ob diese Signalkrebse Träger des Krebspesterregers *Aphanomyces astaci* seien.

Die Größe der Signalkrebse variierte zwischen 9,2 cm – 11,3 cm Länge. Ihr Gewicht lag bei 28,5 g- 53,0 g.

Zunächst wurden die Krebse mittels Chloroform euthanasiert.

Im Anschluss daran wurden sie sezirt und einzelne Segmente ihrer Abdominalkutikula im Lichtmikroskop betrachtet. Dabei konnten bei allen Krebsen Melanisierungen festgestellt werden. Einige wiesen nur sehr kleine, andere dagegen großflächige melanisierte Stellen in der Kutikula auf. Bei etwa 7 Tieren waren mikroskopisch Pilzhyphen zu erkennen.

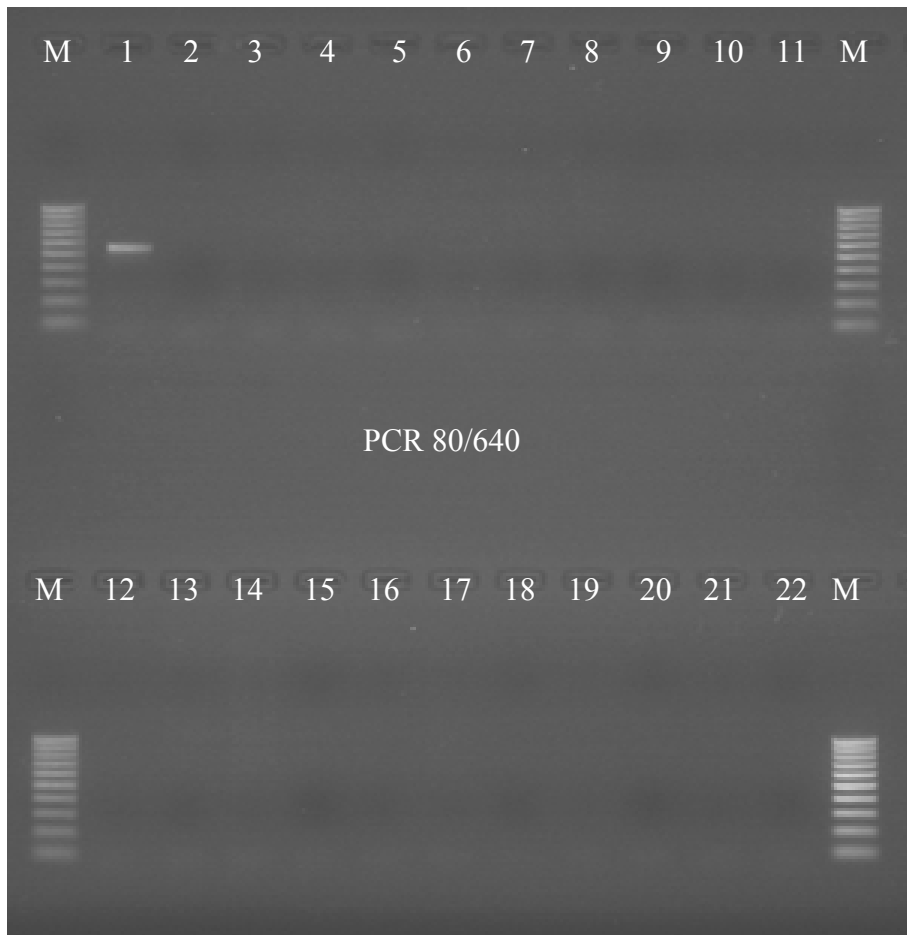


Abbildung 41: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte mit den Proben aus 20 eingesandten Signalkrebsen (Primer 80/640)

M: 100 bp DNA-Marker

Spur 1: D_{1/96} 1:10 (Positivkontrolle)

Spur 2: SK Nr.1

Spur 3: SK Nr.2

Spur 4: SK Nr.3

Spur 5: SK Nr.4

Spur 6: SK Nr.5

Spur 7: SK Nr.6

Spur 8: SK Nr.7

Spur 9: SK Nr.8

Spur 10: SK Nr.9

Spur 11: SK Nr.10

Spur 12: SK Nr.11

Spur 13: SK Nr.12

Spur 14: SK Nr.13

Spur 15: SK Nr.14

Spur 16: SK Nr.15

Spur 17: SK Nr.16

Spur 18: SK Nr.17

Spur 19: SK Nr.18

Spur 20: SK Nr.19

Spur 21: SK Nr.20

Spur 22: Negativkontrolle

Bei der „einfachen“ PCR ist nur bei der Positivkontrolle (*Aphanomyces astaci*) eine Bande vorhanden.

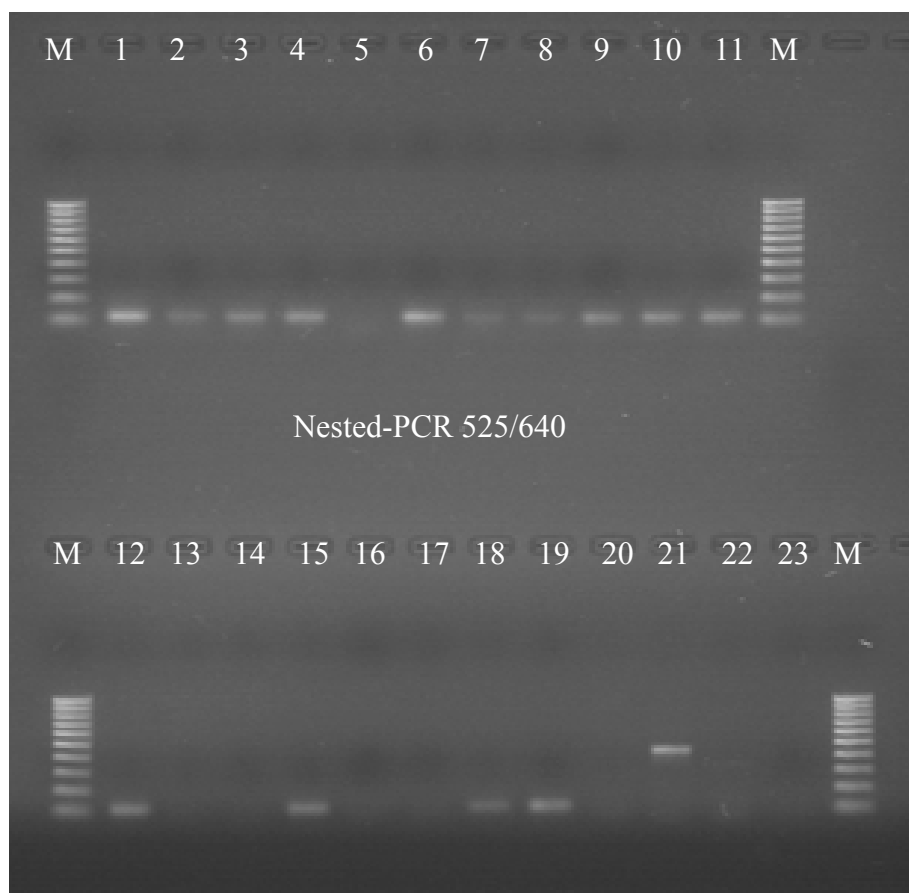


Abbildung 42: Gelelektrophoretische Auftrennung der Nested-PCR-Produkte mit den Proben aus 20 eingesandten Signalkrebsen (Primer 525/640)

M: 100 bp DNA-Marker

Spur 1: D_{1/96} 1:10 (Positivkontrolle)

Spur 2: SK Nr.1

Spur 3: SK Nr.2

Spur 4: SK Nr.3

Spur 5: SK Nr.4

Spur 6: SK Nr.5

Spur 7: SK Nr.6

Spur 8: SK Nr.7

Spur 9: SK Nr.8

Spur 10: SK Nr.9

Spur 11: SK Nr.10

Spur 12: SK Nr.11

Spur 13: SK Nr.12

Spur 14: SK Nr.13

Spur 15: SK Nr.14

Spur 16: SK Nr.15

Spur 17: SK Nr.16

Spur 18: SK Nr.17

Spur 19: SK Nr.18

Spur 20: SK Nr.19

Spur 21: SK Nr.20

Spur 22: Negativkontrolle

Spur 23: Negativkontrolle der Nested-PCR

Bei der Nested-PCR trat außer bei der Positivkontrolle noch bei zahlreichen anderen Spuren ein Signal auf. Die Banden wiesen die für den Krebspesterreger zu erwartende Länge auf. Folglich waren folgende Signalkrebse **Krebspest positiv**: Nr. 1, Nr. 2, Nr. 3, Nr.5, Nr.6, Nr.7, Nr.8, Nr.9, Nr.10, Nr.11, Nr.14, Nr.17, Nr.18.

Somit sind 13 von 20 untersuchten Signalkrebsen mit *Aphanomyces astaci* infiziert.

4.2 Untersuchung einer weiteren Gruppe von eingesandten Signalkrebsen

Des Weiteren wurde eine Gruppe von 20 Signalkrebsen (aus Bayern) eingesandt, um mittels PCR ihren Carrier-Status bezüglich des Krebspesterregers (*Aphanomyces astaci*) zu bestimmen. Es wurden zunächst 8 dieser Krebse untersucht. Sie wiesen eine Länge von 10-12 cm und ein Gewicht von 26-82 g auf.

Die weiteren Untersuchungen entsprechen dem Vorgehen des Kapitels **III.C.4.1**.

Bei der Nested-PCR wiesen 6 der untersuchten Signalkrebse die für den Krebspesterreger charakteristische Bande auf. Folglich konnte diese Gruppe als Träger des Krebspesterregers identifiziert werden.

4.3 Untersuchung von Marmorkrebsen

Es wurden ebenfalls 2 Marmorkrebse, zur Untersuchung auf ihren Carrier-Status betreffend *Aphanomyces astaci*, eingeschickt. Krebs Nr.1 war 7,1 cm lang und 4,2 g schwer. Krebs Nr.2 wies ein Länge von 6,9 cm und ein Gewicht von 3,9 g auf. Beide wurden nach der bereits beschriebenen Methode (siehe **III.C.4.1**) untersucht. Auch hier zeigten sich bei der Nested-PCR starke Banden bei 115 bp. Damit waren auch diese Krebse mit dem Krebspesterreger infiziert.

5. Zusammenfassung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit

Tabelle 17: Zusammenfassung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit

	Insgesamt positive Gruppen	Nachweis des „Carrier-Status“ mittels PCR bei nordamerikanischen Flusskrebsen	Für den Nachweis des Krebspesterreger <i>A.a.</i> mittels PCR am besten geeigneten Krebsbereiche
Auswertung der 8 Gruppen (Versuchs- und Reservegruppen)	6 von 8 untersuchten Gruppen	<u>PCR positiv bei:</u> 24 von 31 untersuchten Krebsen	1.) weiche Kutikula 2.) Telson 3.) Beinansatz 4.) dorsales Abdomen

A.a.: *Aphanomyces astaci*

Für die DNA-Extraktion aus Krebsgewebe wurde das **DNeasy[®] Tissue Kit (Qiagen)** eingesetzt.

IV. DISKUSSION:

Die seit Ende des 19. Jahrhunderts in Europa vorkommenden nordamerikanischen Flusskrebse stellen für die heimischen Flusskrebsearten eine große Gefahr dar. Die drei nordamerikanischen Spezies Signalkrebs (*Pacifastacus leniusculus*), Kamberkreb (*Orconectes limosus*) und Roter amerikanischer Sumpfkreb (*Procambarus clarkii*) können Träger („Carrier“-Krebse) des Pilzes *Aphanomyces astaci*, des Erregers der hochinfektiösen Krebspest, sein. Diese Erkrankung geht beim europäischen Edelkreb (*Astacus astacus*) mit 100% iger Mortalität einher. Die „Carrier“-Krebse hingegen sind latent infiziert. Erst durch Schwächung ihres Immunsystems, z.B. durch den Einfluss von Stressoren, kann es zum Ausbruch der Erkrankung und häufig zum baldigen Verenden der Tiere kommen.

Dies zeigt die Notwendigkeit eine Methode zu entwickeln, um die Träger-Krebse zu identifizieren.

1. Entwicklung einer molekularbiologischen Methode zum Nachweis des Krebspesterregers *Aphanomyces astaci* in nordamerikanischen Flusskrebsen

In den letzten Jahrzehnten waren die Verfahren zum Nachweis des Krebspesterregers *Aphanomyces astaci* sehr zeitintensiv und aufwendig. Zunächst musste der Pilz in verschiedenen Medien angezüchtet werden um anschließend aus ihm Sporen zu gewinnen. Diese wurden daraufhin zur Infektion einer Gruppe gesunder Edelkrebse eingesetzt (ALDERMAN und POLGLASE 1986, CERENIUS et al. 1988, OIDTMANN et al. 1999).

Um den „Carrier“-Status eines nordamerikanischen Flusskrebses bestimmen zu können wurde bislang häufig ein Kontaktversuch durchgeführt, da dieser kostengünstig und einfach in seiner Durchführung war. Die zu untersuchenden Signalkrebse und Kamberkrebse wurden gemeinsam mit gesunden Edelkrebsen in ein Aquarium gesetzt. Falls nach 7-10 Tagen die Edelkrebse erste charakteristische Symptome, wie vermehrtes Kratzen, mangelnder Fluchreflex, reduzierte Abwehr, einzelne Gliedmaßenverluste etc., zeigten und nach 15-20 Tagen ihr Tod eintraf, war hiermit der positive Träger-Status der nordamerikanischen Krebse bewiesen (NYLUND und WESTMAN 2000).

Die Übertragung des Krebspesterregers von nordamerikanischen „Carrier“-Krebsen auf Edelkrebse kann sich bis zu 6 Monaten hinziehen, da die latent infizierten nordamerikanischen Krebse Zoosporen nur zum Zeitpunkt ihrer Häutung (CERENIUS et al. 1984a, OIDTMANN und HOFFMANN 1998) oder bei Ausbruch der Infektion, z.B. durch den Einfluss von Stressoren, freisetzen. Außerdem hängt bei Edelkrebsen der Zeitpunkt des Todes nach Infektion sowohl von der Sporenkonzentration als auch von der Wassertemperatur ab (SCHMID 1998).

Da die oben beschriebene Nachweismethode mindestens zwei Wochen in Anspruch nahm und zudem Tierversuche forderte, war die Entwicklung eines schnelleren, zuverlässigeren und einfacher durchführbaren Verfahrens erforderlich.

Hierfür eignet sich die Polymerasekettenreaktion (PCR). Sie ist in der Regel sehr sensitiv und spezifisch. Ferner stellt sie geringe Anforderungen an das Untersuchungsmaterial und ihre Durchführung benötigt relativ wenig Zeit und Material. Außerdem konnten bereits andere Oomycota und Pilzspezies mittels PCR identifiziert werden (SANDHU et al. 1995, EINSELE et al. 1997, TOOLEY et al. 1997, GRIFFITH und SHAW 1998, GOLBANG et al. 1999, SCHUBERT et al. 1999).

In der Krebspestdiagnostik haben bereits OIDTMANN et al. (2002) Verfahren entwickelt, die auf der PCR basieren.

So konnten Pilze (*Aphanomyces astaci*) in Reinkultur mittels PCR differenziert werden. Das dabei entstandene PCR-Produkt hatte eine Größe von ca. 1050 bp. Erst nach anschließender Restriktionsenzym-Analyse mit 3 verschiedenen Endonukleasen konnte *Aphanomyces astaci* von den zahlreichen anderen *Aphanomyces*-Arten abgegrenzt werden (OIDTMANN et al. 2002).

Um die PCR in der Krebspestdiagnostik von Edelkrebsen einsetzen zu können, mussten zunächst Primer entwickelt werden, die für *Aphanomyces astaci* spezifisch waren. SCHAEFERS (2002) kombinierte verschiedene Primer und setzte anschließend an die PCR ein Aliquot des erhaltenen PCR-Produkts in eine 2.PCR, eine Nested-PCR („verschachtelte“ PCR), ein. Hier wurden ebenfalls verschiedene Primerkombinationen ausgetestet.

Somit wurde einerseits eine (Semi) Nested-PCR entwickelt, die mit anschließender Restriktionsenzym-Verdauung eine Abgrenzung von *Aphanomyces astaci* gegenüber anderen *Aphanomyces*-Arten ermöglichte. Andererseits konnte mit einer Nested-PCR direkt die Krebspest nachgewiesen werden. Durch das Auftreten der für den Krebspesterreger charakteristischen Bande der Größe 115 bp konnte die Aussage Krebspest positiv getroffen werden. Zur Sicherheit konnte wiederum eine Restriktionsenzym-Analyse angeschlossen werden (SCHAEFERS 2002).

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer molekularbiologischen Methode zum Nachweis des Krebspesterregers *Aphanomyces astaci* in nordamerikanischen Flusskrebse. Dafür sollten Primer, die einzig für *Aphanomyces astaci* spezifisch sind, entwickelt werden. Die bereits von OIDTMANN et al. (unveröffentlicht) entwickelten inneren Primer 525/640 wurden dabei übernommen, wohingegen die äußeren Primer neu konstruiert werden mußten. Durch ein Alignment der verschiedenen *Aphanomyces*-Arten konnten die Primer 80/640 als äußere Primer gewählt werden. Außer zu *Aphanomyces astaci* weisen diese Primer noch eine Homologie zum nah verwandten *Aphanomyces invadans* auf. Bislang konnte *Aphanomyces invadans* noch nie aus Krebsgewebe isoliert werden. Es besteht daher die Vermutung, dass diese *Aphanomyces*-Art Krebse nicht infiziert.

Um bei einer positiven PCR mit 100 % iger Sicherheit die Aussage „Krebspest positiv“ treffen zu können kann im Anschluss an die (Semi) Nested-PCR ebenfalls ein Restriktionsenzym-Verdau mit dem Enzym *Hph I* durchgeführt werden. Das PCR-Produkt von *Aphanomyces astaci* lässt sich durch das Enzym in kleinere Fragmente aufspalten wohingegen bei *Aphanomyces invadans* keine Aufspaltung stattfindet.

Bevor mittels PCR eine Amplifikation der Pilz-DNA stattfinden kann, muss diese zuerst aus Krebsgewebe isoliert werden. Dazu eignen sich kommerzielle Extraktions-Kits wie z.B. das DNeasy[®] Tissue Kit (Qiagen). Hierbei wurde zunächst nur die weiche Abdominalkutikula zur DNA-Extraktion eingesetzt. Dieses Gewebe eignet sich hervorragend um die DNA des Krebspesterregers *Aphanomyces astaci* zu isolieren, da sich die weiche Kutikula leicht präparieren lässt und relativ zellarm ist. Außerdem können die einzelnen Segmente, bevor sie zur DNA-Extraktion eingesetzt werden, lichtmikroskopisch auf Pilzhyphen untersucht werden (KLÄRDING 2001).

Die DNA-Extraktion wurde laut Protokoll zur DNA-Isolierung aus Insekten durchgeführt; im Gegensatz zum Standardprotokoll kann hier die doppelte Menge an Gewebe (50 mg) eingesetzt werden.

Bei nordamerikanischen Krebsen stellt sich das Problem, dass meistens nur sehr geringe Mengen an Pilz-DNA im Krebs vorhanden sind. Aufgrund einer angepassten Immunabwehr sind diese Krebse in der Lage den Erreger unter Kontrolle zu halten und ein weiteres Hyphenwachstum zu verhindern. Dagegen breiten sich bei Edelkrebsen die Pilzhyphen, sobald sie die Epikutikula penetriert haben, weiter aus und dringen in tiefere Schichten vor. Der Nachweis der Pilz-DNA ist somit problemlos möglich. Anders ist dies bei den nordamerikanischen Spezies. Hier ist häufig nur eine geringe Menge an Pilz im Krebs vorhanden. Diese Pilz-DNA gilt es zu isolieren. Beim Einsatz von nur 50 mg Gewebe ist daher ein falsch-negatives Ergebnis denkbar. Um dies zu vermeiden müsste demnach der gesamte Krebspanzer zermörsert und in die DNA-Extraktion eingesetzt werden um die Pilz-DNA im Krebs aufzufinden.

Bei einigen Kamberkrebsen wurde diese Hypothese überprüft. Vorab wurde ein Kamberkrebs seziiert, ausgenommen und der leere Krebspanzer gewogen. Anschließend wurde der komplette Panzer (3000 mg) mit einer Skalpellklinge zerkleinert und danach im Mörser unter Zugabe von flüssigem Stickstoff zerrieben. Die in die DNA-Extraktion eingesetzte Menge (3000 mg) entspricht somit der 60-fachen Menge der im Protokoll angegebenen. Daher wurde auch der Lysispuffer entsprechend vervielfacht. Die Inkubationszeit wurde von 90 Minuten auf 180 Minuten hochgesetzt um eine vollständige Auflösung der Zellen zu erreichen. Die Elution der DNA erfolgte laut Protokoll in 100 µl AE-Puffer. Im Anschluss daran wurden 2 µl dieses Eluates in die PCR (80/640) eingesetzt. Vom erhaltenen PCR-Produkt wurde wiederum 1 µl in die Nested-PCR (525/640) übertragen. Das Ergebnis war auch hier Krebspest positiv. Somit konnte die Hypothese, dass der Nachweis von Pilz-DNA auch aus dem gesamten Krebspanzer möglich ist, bestätigt werden. Demnach eignet sich diese Methode der DNA-Extraktion aus dem gesamten Krebspanzer mit nachfolgender PCR ebenfalls zur Krebspestdiagnostik in nordamerikanischen Flusskrebsen.

Einmal wurde sogar ein Krebspanzer mit einem Gewicht von 6600 mg eingesetzt. Dementsprechend wurde die 132-fache Menge an Lysispuffer (23,8 ml) verwendet.

Vorraussetzung für die Ermittlung des Träger-Status bei Signalkrebsen und Kamberkrebse ist der Einsatz frischen Materials. Am besten werden die Krebse lebendig verschickt und kurz vor der Probenentnahme mittels Chloroform getötet. Bei den nordamerikanischen Krebsen stellt der Versand lebendiger Krebse kein Problem dar, da sie meistens jahrelang Träger des Erregers sein können ohne irgendwelche Anzeichen der Krebspest aufzuweisen. Somit können sie lebendig zur Abklärung ihres Träger-Status versendet werden.

Bei einem akuten Edelkrebsterben ist dagegen der schnelle Versand der verendeten Tiere bzw. noch lebender Krebse notwendig um den Erreger isolieren zu können.

2. Geeignete Entnahmestellen zum Nachweis von *Aphanomyces astaci*

Ogleich sich die weiche Kutikula als äußerst geeignet für die Isolation der Pilz-DNA darstellt, wurden noch andere Gewebestellen zur DNA-Extraktion eingesetzt.

KLÄRDING (2001) hat morphologische Untersuchungen bei Edelkrebsen hinsichtlich der Krebspest vorgenommen. Sie konnte Pilzhyphen in der weichen Abdominalkutikula lichtmikroskopisch nachweisen. Hier waren vor allem in der Nähe von intersegmentalen Stegen aus harter Kutikula oder in den lateralen Bereichen Hyphen vorhanden.

Auch Melanisierungen der weichen Abdominalkutikula oder an den Gelenken konnten konstatiert werden, die aber niemals im direkten Zusammenhang mit dem Hyphenwachstum standen.

In der vorliegenden Arbeit hingegen konnte bei der Sektion nordamerikanischer Krebse ein Zusammenhang zwischen den Melanineinlagerungen und dem Hyphenwachstum erkannt werden. (siehe auch **Tabelle 13 III.C.2.1** und **Abbildung 43**)

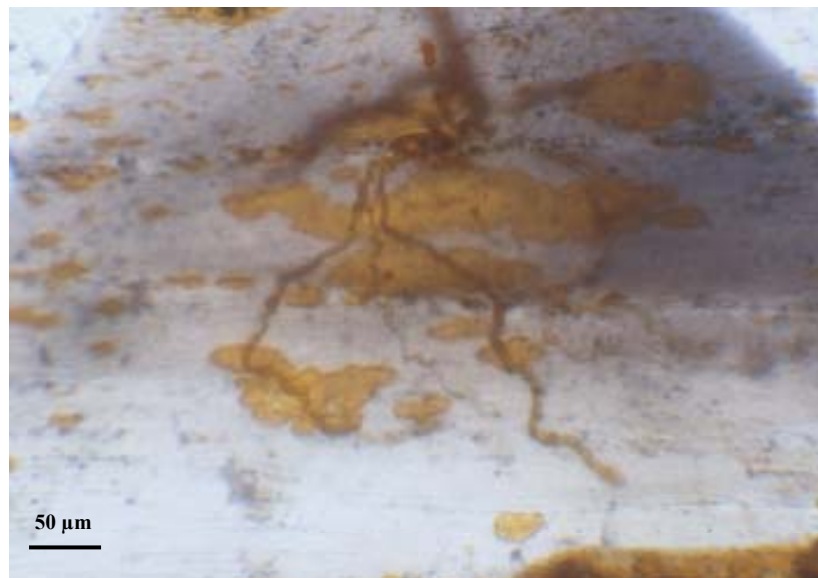


Abbildung 43 : Melanisierte Pilzhyphen beim Kamberkrebs, weiche Kutikula. (Nativpräparat)

Das Hyphenwachstum scheint von den Melanineinlagerungen gestoppt zu werden.

Die nordamerikanischen Krebse weisen fast immer bräunliche Flecken auf. Diese befinden sich größtenteils in der weichen Abdominalkutikula oder im Bereich der proximalen Gelenke der Schreitbeine.

Bereits UNESTAM und AJAXON (1976) haben neben zahlreichen anderen Autoren (SCHIKORA 1906, UNESTAM und SÖDERHÄLL 1977) die aus dünner, weicher Kutikula bestehenden Gelenkverbindungen als Hauptangriffspunkte des Krebspesterregers identifiziert. KLÄRDING (2001) konnte bei der Untersuchung von Edelkrebsen beobachten, dass neben der häufig infizierten weichen Kutikula vor allem Bereiche, die an weiche Kutikula angrenzen, Pilzmyzelien aufwiesen. Mittels histologischer Untersuchungen konnte bei starkem Pilzbefall ein Vordringen der Hyphen bis in das tiefer gelegene Bindegewebe festgestellt werden. Insgesamt konnten Hyphen im Bereich der Schreitbeine (70 % aller untersuchten Krebse), der ventralen Kutikula (58 % aller untersuchten Krebse), der dorsalen weichen Kutikula, der Augen, des Nervensystems, der Muskulatur, der Antennen (in abnehmender Reihenfolge), diagnostiziert werden. Dagegen wiesen der Magen, die Antennendrüsen, die Kiemen und der Darm nur sehr selten Hyphen auf.

In der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls Untersuchungen zum Befall von verschiedenen Krebsbereichen (Auge, Cephalothorax, Beinansatz, dorsales Abdomen, weiche Kutikula und Telson) vorgenommen. Dazu wurden bei nordamerikanischen Krebsen 6 verschiedene Stellen verglichen. Es wurden Krebse aus den Reserve-Gruppen ausgewählt, wobei diese nach den Ergebnissen der vorangegangenen Untersuchungen in

- a) hochgradig infiziert,
- b) mittelgradig infiziert oder
- c) nicht infiziert eingeteilt wurden. (siehe **III.C.3**).

Das Ergebnis der für die PCR geeigneten Krebsbereiche stimmt weitgehend mit dem Ergebnis von KLÄRDING überein. Sowohl die weiche Kutikula als auch die Beinansätze eignen sich sehr gut zum Nachweis von *Aphanomyces astaci*. Auch das dorsale Abdomen und das Telson waren in vielen Fällen positiv. Aus den Tabellen werden ebenfalls die melanisierten Bereiche bei den nordamerikanischen Krebsen ersichtlich.

3. Zusammenhang zwischen Melanisierungen und der Krebspest

NYLUND und WESTMAN (2000) behaupten, dass Melanisierungen bei Signalkrebsen immer ein Anzeichen für das Vorhandensein des Krebspesterregers *Aphanomyces astaci* sei. Sie untersuchten Signalkrebspopulationen in 3 finnischen Seen über einen Zeitraum von 30 Jahren. In einem der Seen lebten neben den Signalkrebsen zusätzlich Edelkrebse. Dies lässt vermuten, dass diese Signalkrebspopulation nicht Träger von *Aphanomyces astaci* ist. Aus diesem See wurden insgesamt 933 Signalkrebse auf Melanisierungen untersucht. Dabei wies keiner von ihnen eine melanierte Stelle auf.

Um eine evtl. über Jahre hinweg erworbene Resistenz der in diesem Gewässer lebenden Edelkrebse gegenüber dem Krebspesterreger auszuschließen wurde folgender Versuch durchgeführt: Es wurden einige Edelkrebse aus diesem See entnommen und mit Signalkrebsen, die zuvor als Träger des Krebspesterregers identifiziert worden waren, in ein Aquarium gesetzt. Nach 8-10 Tagen zeigten die Edelkrebse die für die Krebspest charakteristischen Symptome und nach etwa einer weiteren Woche verendeten sie. Somit wurde die Annahme, dass die in diesem See lebenden Signalkrebse keine Träger von *Aphanomyces astaci*, bestätigt. Dies galt zugleich als Widerlegung der Hypothese von KOBAYASHI und SÖDERHÄLL (1990). Sie vertraten die Meinung, dass jeder Signalkrebs Träger der Krebspest sei.

Außer aus Finnland liegen auch Berichte über krebspest-freie Signalkrebspopulationen aus Frankreich (LAURENT und VEY 1986), Groß-Britannien (LOWERY und HOLDICH 1980), Litauen (CUKERZIS 1980) und Schweden (SVÄRDSON et al. 1991) vor.

In den beiden weiteren von NYLUND und WESTMAN (2000) untersuchten Seen lebten ausschließlich Signalkrebse. Diese wurden jährlich etwa 7-8 Wochen nach ihrer Häutung auf Melanisierungen untersucht. Die bräunlichen Flecken konnten hauptsächlich an den Schreitbeinen (ca. 40%) und an den Scheren (ca.28%) beobachtet werden. Bei diesen Krebsen konnte ebenfalls ein Zusammenhang zwischen Hyphen und Melanin erkannt werden. Da in beiden Seen keine Edelkrebse vorkamen konnte angenommen werden, dass diese Signalkrebse Träger von *Aphanomyces astaci* waren. Um den Beweis zu liefern wurden einige dieser Signalkrebse in ein Aquarium mit gesunden Edelkrebsen gesetzt. Nach der üblichen Inkubationszeit zeigten die Edelkrebse die für die Krebspest typischen Symptome und starben nach 15-20 Tagen, obwohl sich eine Infektion dieser Krebse auch bis zu 6 Monaten hinziehen kann (siehe **IV.1**).

Im Gegensatz dazu zeigte die Kontrollgruppe, in der sich nur Edelkrebse befanden, auch nach 3-7 monatiger Versuchsdauer keinerlei Veränderungen. Bei den untersuchten Signalkrebsen konnte kein anderer Pilz als *Aphanomyces astaci* in den Melanisierungen nachgewiesen werden. Daher können Melanisierungen als Beweis für eine Pilzinfektion herangezogen werden. Trotzdem ist ein Mangel an Melanineinlagerungen keine Garantie dafür, dass der Krebs nicht mit dem Krebspesterreger infiziert ist. Auf jeden Fall sollten bei Neubesiedlung eines Gewässers mit Signalkrebsen nur Krebse ohne Melanisierungen eingesetzt werden (NYLUND und WESTMAN 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls Untersuchungen hinsichtlich des Vorkommens von Melanin im Zusammenhang mit Pilzhyphen vorgenommen.

Hier konnten bei der Betrachtung nordamerikanischer Krebse Melanisierungen aufgefunden werden, bei denen teilweise der anschließende Kontaktversuch mit Edelkrebsen negativ verlief. Auch die im Anschluss durchgeführte PCR, unter Einsatz der aus diesen Krebsen isolierten DNA, wies kein Signal auf und war somit ebenfalls negativ.

Es kann folglich weder das Vorhandensein von Melanisierungen als Nachweis für die Krebspest dienen, noch können Krebse ohne melanierte Stellen als eindeutig „krebsepestfrei“ identifiziert werden.

Melanisierungen sind nicht spezifisch für eine Infektion mit *Aphanomyces astaci*. Sie treten bei zahlreichen Pilzinfektionen (SÖDERHÄLL 1981), bei bakteriellen Infektionen mit gramnegativen Bakterien (SRITUNYALUCKSANA und SÖDERHÄLL 2000) und bei Verletzungen auf.

Um den Krebspesterreger *Aphanomyces astaci* in nordamerikanischen Flusskrebsen nachzuweisen muss folglich entweder ein zeitintensiver Kontaktversuch mit gesunden Edelkrebsen oder ein molekularbiologischer Nachweis mittels PCR durchgeführt werden. Hierbei sollte beachtet werden, dass die PCR zuverlässiger, schneller und spezifischer ist als der Kontaktversuch.

4. Eine einfache und kostengünstige Nachweismethode für die Krebspest ?

In einer französischen Veröffentlichung von NEVEU (2002) wurden Diagnostikmethoden zum Nachweis der Krebspest beschrieben, die in ihrer Durchführung einfach und kostengünstig sind.

Zunächst wurden die Flusskrebse beobachtet. Es wurde auf das Auftreten, der für die Krebspest charakteristischen Symptome geachtet. Die Krebse sind plötzlich tagsüber aktiv (normalerweise nachtaktiv), sind nicht mehr Lichtscheu und verstecken sich nicht.

Es wurden verschiedene Tests entwickelt um die Krebspest nachzuweisen.

Test Nr.1: In einem Aquarium befindet sich bei Tageslicht der zu untersuchende Krebs. Eine plötzliche Bewegung in seiner Nähe löst bei ihm keinen Fluchtreflex aus.

Test Nr.2: Die Augen ziehen sich bei Berührung nicht mehr zurück. Zu Beginn der Erkrankung kann der Test auch nur einseitig positiv ausfallen. Um Sicherheit beim Ergebnis zu erlangen sollte dieser Test bei mehreren Krebsen durchgeführt werden. Fällt der Test negativ aus, so empfiehlt es sich ihn nach einigen Tagen zu wiederholen.

Erreicht der Erreger das Nervensystem treten folgende Symptome auf: taumeln, umfallen und auf dem Rücken liegen. Häufig kommt es auch zu einzelnen Gliedmaßenverlusten.

Um den Krebspesterreger zu diagnostizieren wurde der verendete Krebs zunächst in Wasser mit 1 % Formalin und etwas Toluidinblau für einige Stunden gelegt. Danach wurde der Krebs seziiert und die hyphenprädestinierten Stellen, wie die weiche Abdominalkutikula, die Gelenkmembranen und die Augenoberfläche, lichtmikroskopisch betrachtet. Das Toluidinblau färbt das Pilzmycel blau. Bei 40- und 100-facher Vergrößerung sind die für *Aphanomyces astaci* charakteristischen Hyphen (gleichmäßig, unseptiert, Durchmesser von 6-8 µm) erkennbar. Außerdem sind die aus Primärsporen bestehenden Sporenbälle am Sporangiumende sichtbar.

Um die Pilze lichtmikroskopisch identifizieren zu können eignen sich nur frisch tote Krebse, da ansonsten eine Überwucherung mit Saprophyten (Sekundärerreger) stattfindet.

Eine weitere Möglichkeit des Erregernachweises stellt der Kontaktversuch dar.

NEVEU hat 3 verschiedene Versuchsansätze beschrieben.

- a) In einem Kontaktbecken werden gesunde Edelkrebse (oder Dohlen- bzw. Galizierkrebse) gemeinsam mit den zu untersuchenden Krebsen gehalten. In 2 anderen Becken befinden sich die Kontrollgruppen. Wenn nach 1-2 Wochen im Kontaktbecken die ursprünglich gesunden Edelkrebse verenden, liegt der Verdacht der Krebspest nahe.

- b) Zwei Aquarien werden parallel angeordnet und mit einer Wasserpumpe miteinander verbunden, so dass ein Wasseraustausch von einem Becken ins andere stattfindet. In das eine Becken werden gesunde Edelkrebse gesetzt und in das andere die zu untersuchenden Krebse. Falls nach 2-3 Wochen die Edelkrebse sterben ist eine Infektion der anderen Krebse mit *Aphanomyces astaci* wahrscheinlich, da die begeißelten Zoosporen mit dem Wasser von einem Becken ins anderen gelangt sind.
- c) Aus einem verdächtigen Gebiet werden regelmäßig Käfige, Kescher und Netze entfernt und mit gesunden, empfänglichen Krebsen in Berührung gebracht. Verenden diese nach wenigen Wochen, lässt dies wiederum eine Infektion mit *Aphanomyces astaci* vermuten.

Die letztgenannte Methode könnte einfach in die Praxis umgesetzt werden. Da sie kostengünstig und einfach durchführbar ist, würde sie sich vor allem für die Anwendung in Signalkrebs besiedelten Gebieten oder in Signalkrebszuchten eignen.

Im Allgemeinen kann bei einer 100% igen Mortalität immer vermutet werden, dass es sich hierbei um die Krebspest handelt.

Um ein Gewässer krebspestfrei zu bekommen müssen für mindestens 2 Wochen alle Krebse entfernt werden. Ursache hierfür ist die bis zu 14-tägige Überlebenszeit der Zoosporen im Wasser.

Zoosporen können flussabwärts mit der Strömung gelangen. Eine Verbreitung des Erregers ist ebenfalls flussaufwärts möglich. Hierfür müssen infizierte Flusskrebse stromaufwärts wandern. Vermutlich ist eine Verbreitung der Zoosporen auch durch Fische möglich. Auf Schuppen von Salmoniden konnte *in vitro* sogar eine Weiterentwicklung von Zoosporen beobachtet werden (AHNE und HALDER, 1988).

Außerdem muss beachtet werden, dass jeder Wassertropfen, der aus einem infizierten Gebiet stammt die Krankheit übertragen kann. So können auch im Wasser lebende Säugetiere (Ratten etc.) und Vögel (Enten, Wasserhühner etc.) die Krankheit von einem Gewässer ins andere übertragen. Um eine Übertragung mit Netzen, Gummistiefeln und Gerätschaften zu vermeiden muss auf eine gründliche Desinfektion dieser unbelebten Vektoren geachtet werden.

Die Krebspest kann erst nach Ausbruch der Krankheit diagnostiziert werden. Durch die Behandlung mit Malachitgrün kann die Sporenproduktion bei infizierten Flusskrebsen verhindert werden, um diese als Speisekrebse zu vermarkten. Der Pilz wird durch diese Behandlung jedoch nicht abgetötet (NEVEU, 2002).

Die in der Veröffentlichung von NEVEU (2002) aufgeführten Methoden eignen sich gewiss zum Nachweis des Krebspesterregers doch müssen auch einige kritische Punkte betrachtet werden.

So könnten beispielsweise bei den Kontaktversuchen nur ein Teil der eingesetzten Edelkrebse verenden. Dann würde sich die Frage stellen ob diese Krebse aufgrund der Krebspest gestorben sind oder ob eine andere Ursache hierfür verantwortlich ist.

Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Kontaktversuchen konnte bei einer Gruppe (Gruppe 8) ein Edelkrebsterben erst an Tag 55 und Tag 69, nach Erstkontakt mit den Kamberkrebse, konstatiert werden. Die nachfolgende Sektion und lichtmikroskopische Untersuchung ließ Pilzhyphen erkennen. Anschließend wurde aus der weichen Kutikula DNA extrahiert und davon ein Aliquot in die PCR eingesetzt. Das Ergebnis war Krebspest positiv. Die Zeitspanne von 55 bzw. 69 Tagen überschreitet bei weitem die von NEVEU angegebenen 2-3 Wochen. Ursache für den verzögerten Krebspestausbuch ist die nur temporäre Zoosporenfreisetzung der nordamerikanischen Krebse. Diese sind häufig latent infiziert und erst bei der Häutung, die bei adulten Krebsen zweimal jährlich stattfindet, (CERENIUS et al. 1984a, OIDTMANN und HOFFMANN 1998) oder bei Ausbruch der Krebspest aufgrund Immunsupprimierung, werden die infektiösen Sporen freigesetzt.

Folglich kann nach der kurzen Zeit von 2-3 Wochen (NEVEU, 2002) keine sichere Aussage über den Trägerstatus von nordamerikanischen Flusskrebse gemacht werden.

Auch der mikroskopische Nachweis von *Aphanomyces astaci*-Hyphen ist unsicher. Es bedarf viel Erfahrung um diese von anderen Pilzhyphen unterscheiden zu können. Selbst einem erfahrenen Wissenschaftler wird diese Unterscheidung schwer fallen.

Dieser Nachweis genügt daher nicht um die Krebspest eindeutig zu diagnostizieren.

Sicher ist der Krebspesterregers nur mittels PCR oder durch Pilzanzucht und anschließender Infektion von gesunden Krebsen zu identifizieren. Das in der vorliegenden Arbeit entwickelte Nachweisverfahren (DNA-Extraktion & PCR) weist zahlreiche Vorteile im Gegensatz zu den oben genannten Methoden auf. Allerdings müssen hierfür etwas höhere Kosten in Kauf genommen werden. So beläuft sich eine molekularbiologische Untersuchung (DNA-Extraktion, PCR, Agarosegel) eines Flusskrebse auf ca. 10 €.

Die Bestimmung des Träger-Status eines nordamerikanischen Flusskrebse und der Krebspestauchweis beim Edelkrebs können mit der entwickelten Methode in nur 12 Stunden erfolgen. Diese schnelle und zuverlässige Nachweismethode eignet sich hiermit sehr gut für die Diagnostik.

5. Marmorkrebse

Vor wenigen Wochen wurde in der Presse von den zur parthenogenetischen Fortpflanzung („Jungfernzeugung“) befähigten Marmorkrebsen berichtet. An der Humboldt-Universität Berlin konnten G. SCHOLTZ und seine Kollegen zum ersten Mal die eigengeschlechtliche Fortpflanzung eines weiblichen Flusskrebses bestätigen (Nature, Bd.421, S.806, 2003).

Es handelt sich hierbei um die so genannten Marmorkrebse, die ihren Namen aufgrund ihrer meist bräunlich marmorierten Panzerfärbung erhalten. Sie stammen vermutlich aus den USA und wurden in den 90 er Jahren als Aquarienkrebse nach Deutschland importiert. Genetische Untersuchungen haben gezeigt, dass sie mit dem in Florida heimischen *Procambarus fallax* nah verwandt sind. Daher wird angenommen, dass die Marmorkrebse ebenso, wie zahlreiche andere nordamerikanische Flusskrebsarten, potentielle Überträger des Krebspesterreger *Aphanomyces astaci* sind. Eine Gefahr entsteht hier bereits beim Aussetzen eines Weibchens in die Natur, da dieses zur eigengeschlechtlichen Fortpflanzung befähigt ist und eine neue Population aufbauen kann.

V. ZUSAMMENFASSUNG:

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war den Krebspesterreger *Aphanomyces astaci*, in den drei nordamerikanischen Flusskrebsarten Signalkrebs (*Pacifastacus leniusculus*), Kamberkrebs (*Orconectes limosus*) und Roter Amerikanischer Sumpfkrebs (*Procambarus clarkii*) nachzuweisen. Diese Flusskrebsarten sind zwar gegen die Krebspest resistent, können aber als latent infizierte Tiere Ausscheider des Erregers sein und somit die für die Krebspest empfänglichen Edelkrebse (*Astacus astacus*) infizieren. Bei dieser in Europa heimischen Art geht die Erkrankung mit 100 % iger Mortalität einher. Daher ist die Bestimmung des Träger-Status der nordamerikanischen Krebse von großer Bedeutung um eine weitere Verbreitung dieser hochinfektiösen Erkrankung in europäischen Gewässern zu verhindern.

Im Vergleich zu den Edelkrebsen konnten bereits bei der makroskopischen und post sectionem bei der mikroskopischen Betrachtung der nordamerikanischen Flusskrebse Unterschiede festgestellt werden. Die letztgenannten weisen im Bereich der weichen Abdominalkutikula sowie an den dünnen Gelenkhäuten der Schreitbeine häufig Melanisierungen auf. Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung kann eine Wachstumshemmung der Pilzhyphen durch Melanineinlagerungen beobachtet werden. Unmittelbar nach der Invasion des Pilzes wird das Immunsystem aktiviert und verhindert normalerweise einen Krankheitsausbruch. Lediglich bei Einfluss von Stressoren kommt es zur Immunsuppression nordamerikanischer Krebse und daraufhin nach dem Auftreten der für die Krebspest typischen Symptome häufig zum Tod.

Um mittels PCR *Aphanomyces astaci* in den nordamerikanischen Krebsen nachzuweisen musste zunächst die Pilz-DNA extrahiert werden. Dazu wurde das DNeasy[®] Tissue-Kit (Qiagen) verwendet. Es wurden unterschiedliche Flusskrebsgewebe zur DNA-Extraktion eingesetzt um die am besten geeignete Stelle zu finden. Die bereits bei Edelkrebsen verwendete weiche Abdominalkutikula erwies sich auch bei den nordamerikanischen Krebsen als äußerst zweckmäßig. Des weiteren konnte bei DNA-Extraktionen aus den Beinansätzen, dem dorsalen Abdomen und dem Telson der Erreger in der nachfolgenden PCR nachgewiesen werden.

Da die nordamerikanischen Flusskrebse aufgrund ihres angepassten Immunsystems häufig nur sehr geringe Mengen an Pilz-DNA aufweisen, stellt der Nachweis hier ein Problem dar.

Bei nur 50 mg eingesetzter Kutikula, laut Insekten-Protokoll des Tissue Kits, ist unsicher ob gerade in diesem kleinen Gewebestück Pilz-DNA vorhanden ist. Daher wurden auch

Extraktionsversuche vorgenommen bei denen ein kompletter Krebspanzer eines Kamberkrebse (3000 mg) zur DNA-Isolierung eingesetzt wurde. Die benötigte Lysis-Puffermenge wurde dementsprechend erhöht und die Inkubationszeit wurde verlängert. Das Ergebnis der PCR war bei diesem Krebs positiv. Trotzdem wurde beim Großteil der Kamberkrebse nur die weiche Kutikula in die DNA-Extraktion eingesetzt. Hierfür wurden Kutikula-Segmente ausgewählt, die bereits im Lichtmikroskop Melanisierungen oder sogar Pilzhyphen aufwiesen. Bei zahlreichen Krebsen war das Ergebnis der nachfolgenden PCR ebenfalls positiv.

Zusammenfassend wird somit deutlich, dass der molekularbiologische Nachweis des Krebspesterreger *Aphanomyces astaci* auch bei nordamerikanischen Flusskrebse möglich ist. Sowohl die DNA-Extraktion als auch die PCR, mit teilweise neu entwickelten Primern, können zur Feststellung des „Carrier-Status“ eines nordamerikanischen Krebses dienen.

VI. SUMMARY

Development of a molecular method for the detection of crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci* in North American crayfish (*Pacifastacus leniusculus*, *Orconectes limosus*, *Procambarus clarkii*)

The objective of the present study was to develop a method for the detection of the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci* in three North American crayfish species (*Pacifastacus leniusculus*, *Orconectes limosus*, *Procambarus clarkii*).

Those species are very little susceptible for crayfish plague but they can still release the pathogen and transmit the fungus to the highly susceptible crayfish species, e.g. noble crayfish (*Astacus astacus*). The mortality of noble crayfish can reach up to 100 % after infection. This is the reason why the identification of the fungus is so important. It is necessary to find the North American crayfish which are carrier of the fungus, to avoid the spread of the disease.

Compared to infected noble crayfish in North American carrier crayfish differences could be seen by looking at them macroscopically and microscopically. In North American crayfish melanized spots can be observed in the area of the cuticle of the ventral abdomen as well as in the thin cuticle of the joints of the walking legs. As soon as the fungus enters the crayfish the immune system is activated. By looking at the cuticle through the microscope it can be observed that the melanin stops fungal hyphae from growing. A latent infection of the North American species may become acute when the immune system is suppressed, e.g. due to stress. Then the crayfish shows external symptoms and dies due to the crayfish plague.

In order to detect *Aphanomyces astaci* by PCR in North American crayfish the fungal DNA first had to be isolated. For this purpose the DNeasy[®] Tissue-Kit (Qiagen) was used. Different tissues were used for DNA extraction in order to find the best areas for the DNA isolation. For noble crayfish the thin cuticle of the ventral abdomen was used for DNA extraction and it could be shown that the same type of tissue could be used to detect *Aphanomyces astaci* in North American crayfish. The fungus could also be detected by PCR after isolating DNA out of the proximal parts of the walking legs, the dorsal abdomen and the uropod. Because the immune system of North American crayfish can control the growth of *Aphanomyces astaci* often only very little fungal DNA can be isolated. It may be difficult to isolate the DNA from only 50 mg of tissue. This amount of tissue corresponds to the amount required for the protocol for DNA extraction in insects.

Furthermore the present study investigated if it was possible to isolate the DNA of a whole exoskelett (3000 mg) of a crayfish. The amount of the lysisbuffer was adjusted and the incubation-time extended. The result of the PCR in this crayfish was also positive.

However, most of the time only the thin cuticle of the ventral abdomen was used for DNA extraction. For this purpose, preferably cuticle pieces with melanized spots or fungal hyphae were chosen.

The study presented, demonstrated that the detection of the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci* by PCR is also possible in North American crayfish. The method developed constitutes to identify the North American carrier-crayfish.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Literaturangaben:

- ABRAHAMSSON, S. A. A.** (1966): Dynamics of an isolated population of crayfish *Astacus astacus* (L.) Oikos 17, 96-107
- ACKEFORS, H.** (2000): Freshwater crayfish farming technology in the 1990s: a European and global perspective. *Fish and Fisheries* 1, 337-359
- 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., POLGLASE, J. L., FRAYLING, M. und HOGGER, J.** (1984): Crayfish plague in Britain. *Journal of Fish Disease* 7, 401-405
- ALDERMAN, D. J. und POLGLASE, J. L.** (1986): *Aphanomyces astaci*: isolation and culture. *Journal of Fish Disease* 9, 367-379
- 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., HOLDICH, D. M. und REEVE, I. D.** (1990): Signal crayfish as a vector in crayfish plague in Britain. *Aquaculture* 86, 3-6
- BACHERE, E., MIALHE, E. und RODRIGUEZ, J.** (1995): Identification of defence effectors in the haemolymph of crustaceans with particular reference to the shrimp *Penaeus japonicus* (Bate): prospects and applications. *Fish and Shellfish Immunology* 5: 597-612
- BANG, F. B.** (1983): Crustacean disease responses. In: The biology of Crustacea (Herausgeber: A. J. Provenzano) 6, 114-153. Academic Press, London

- BARAN, I. und SOYLU, E.** (1989): Crayfish plague in Turkey. *Journal of Fish Diseases* 12, 193-197
- BAUCHAU, A. G.** (1981): Crustaceans. In: Invertebrate blood cells. (Herausgeber: N. A. Ratcliffe und A. F. Rowley) Academic Press, London: 385-420
- BAUSEWEIN, S.** (1999): Etablierung einer molekularen Nachweismethode von *Aphanomyces astaci* (Oomycetes). Diss. med. vet. LMU München
- 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 Bayrischen Landesamtes für Umweltschutz 11, 69
- BOHL, E.** (1999): Crayfish stock situation in Bavaria (Germany) – attributes, threats and chances. *Freshwater Crayfish* XII, 765-777
- BRINK, P.** (1977): Developing crayfish populations. *Freshwater Crayfish* 3:211-228
- 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
- CERENIUS, L. und SÖDERHÄLL, K.** (1984a): Repeated zoospore emergence from isolated spore cysts of *Aphanomyces astaci*. *Experimental Mycology* 9, 259-263
- 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 adaption to parasitism in *Aphanomyces*. *Experimental Mycology* 9, 259-263

- 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: Crustacean issues 11. (Herausgeber: F. Gherardi und D. M. Holdich). 149-159
- 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
- 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 clarkia*. *Journal of Crustacean Biology* 13, 403-408
- 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
- FETZNER, J. W. und CRANDALL, K. A.** (1999): Genetic Variability Within and Among Populations of the Golden Crayfish (*Orconectes luteus*): A Comparison Using Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLPs) and Mitochondrial 16s Gene Sequences. In: *Freshwater Crayfish XII*, 396-412
- FULLER, M. S. und JAWORSKI, A. E.** (1987): Zoospore fungi in teaching and research. Southeastern Publishing Cooperation: Athen
- 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
- 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
- HALDER, M. und AHNE, W.** (1988): Virologische und mykologische Untersuchung an Krebspestbeständen verschiedener Herkunft. Bayerische 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
- HÄLL, L. und UNESTAM, T.** (1980): The effect of fungicides on the survival of crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*, Oomycetes, growing on fish scales. *Mycopathologia* 72, 131-134

- HAGER, J.** (1996): Edelkrebse, Biologie – Zucht – Bewirtschaftung. Leopold Stocker Verlag: Graz
- HOFER, B.** (1906): Handbuch der Fischkrankheiten. Schweizerbartsche Verlag: Stuttgart
- 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
- HOLDICH, D. M.** (2002): Biology of Freshwater Crayfish. Blackwell Science Ltd.: Oxon
- 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
- HUNER, J. V.** (1989c): Freshwater Crayfishes in North America. In: Freshwater Crayfish Aquaculture (Herausgeber: Jay V. Huner, PhD 1994). 6
- 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. 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
- JOHANSSON, M. W. und SÖDERHÄLL, K.** (1989): A cell adhesion factor from crayfish haemocytes has degranulating activity towards crayfish granular cells. *Insect Biochemistry* 19, 183-190

- JOHANSSON, M. W., KEYSER, P., SRITUNYALUCKSANA, K. und SÖDERHÄLL, K.** (2000): Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture* 191, 45-52
- 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.** (1997): Amerikanische Flusskrebse – eine tödliche Gefahr für unsere heimischen Arten. *Fischer und Teichwirt* 2, 58-62
- KLÄRDING, K.** (2001): Morphologische Untersuchungen zur Krebspest (Erreger: *Aphanomyces astaci*, Oomycetes) bei Edelkrebsen (*Astacus astacus*). Diss. med. vet. LMU München
- LAUBIER und LINQUIST** (1990): Cultivating of Freshwater Crayfishes in Europe. In: *Freshwater Crayfish Aquaculture*. (Herausgeber: Jay V. Huner, Phd. 1994) 169
- 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 the white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organism* 25, 133-141
- MANNFELD, W.** (1942): Die Krebspest im Generalbezirk Lettland in den Jahren 1924-1938. *Zeitschrift für Fischerei* 40, 395-417
- 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

NCBI GENBANK: Taxonomy Browser (2001): [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

NYBELIN, O. (1936): Untersuchungen über die Ursache der in Schweden gegenwärtig vorkommenden Krebspest. *Mitteilungen der Anstalt für Binnenfischerei* 9, 3-29. Drottningholm, Stockholm.

NYBELIN, O. (1934): Nya undersökningar över kraftpestens orsak. *Ny Svensk Fiskeritidskrift* (1934), 110-114

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. (1980): Wound reactions and *Aphanomyces astaci* growth in crayfish cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology* 36, 187-197

NYLUND, V., KIRJAVAINEN, J., TOLONEN, J. und WETSMAN, K. (1993): The spread of crayfish plague (*Aphanomyces astaci*) and its effects in the Noble Crayfish (*Astacus astacus*) population in the Lake Ormajärvi waterway in Finland in 1988-1991. *Freshwater Crayfish IX*, 273-279

OIDTMANN, B. und HOFFMANN, R. (1998): Die Krebspest. In: Flusskrebse Österreichs. (Herausgeber: E. Eder und W. Hödl). 187-195. Gutenberg: Linz

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

OIDTMANN, B., HEITZ, E. und HOFFMANN, R. W. (2001): Zur Bedeutung von Fischen bei der Übertragung der Krebspest (*Aphanomyces astaci*, Oomycetes). In: Fischkrankheiten. EAFP-Schrift zur VIII. Tagung der Deutschen Sektion der European Association of Fish Pathologists (EAFP) am 19.21. September 2000 in Potsdam, Brandenburg. 119-122

- OIDTMANN, B., HEITZ, E., ROGERS, D., HOFFMANN, R. W.** (2002): Transmission of crayfish plague. *Diseases of Aquatic Organisms* Vol. 52, 159-167
- OIDTMANN, B., BAUSEWEIN, S., HÖLZLE, L., HOFFMANN, R. und WITTENBRINK, M.** (2002): Identification of crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci* by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *Veterinary Microbiology* 85, 183-194
- OIDTMANN, B., SCHAEFERS, N.; CERENIUS, L., SÖDERHÄLL, K. und HOFFMANN, R. W.** (zur Publikation eingereicht): Detection of genomic DNA of crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci* (Oomycete) in clinical samples by PCR
- PECKNY, 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., CERENIUS, L. und SÖDERHÄLL, K.** (1987): The influence of haematocyte number on the resistance of freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus* Dana, to the parasitic fungus *Aphanomyces astaci*. *Journal of Fish Diseases* 10, 417-477
- 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.** (1983): *Pacifastacus leniusculus* Dana and its resistance to the parasitic fungus *Aphanomyces astaci* Schikora. *Freshwater Crayfish* V, 292-298
- PERSSON, M. und SÖDERHÄLL, K.** (1986): CaCl₂ –induced germination and peptidase secretion in *Aphanomyces astaci*. *Experimental Mycology* 10, 205-213
- PERSSON, M., VEY, A. und SÖDERHÄLL, K.** (1987b): Encapsulation of foreign particles in vitro by separated blood cells from crayfish, *Astacus leptodactylus*. *Cell Tissue Res.* 247, 409-415

- PÖCKL, M.** (1998): Funktionelle Morphologie und Anatomie der Flusskrebse. In: Flusskrebse Österreichs. (Herausgeber: E. Eder und W. Hödl). Stapfia 58, zugleich Kataloge des Österreichischen Landesmuseums: Gutenberg, Linz
- PÖCKL, M.** (1998): Häutung und Wachstum von Flusskrebsen. In: Flusskrebse Österreichs. (Herausgeber: E. Eder und W. Hödl). Stapfia 58, zugleich Kataloge des Österreichischen Landesmuseums: Gutenberg, Linz
- 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
- 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 der Binnenfischerei* 10, 1-21. Drottningholm, Stockholm
- 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
- SCHAEFERS, N.** (2002): Entwicklung einer molekularbiologischen Methode zum Nachweis von *Aphanomyces astaci* Schikora (Oomycota) aus Krebsgewebe (*Astacus astacus*). Diss. med. vet. LMU München
- SCHÄPERCLAUS, W.** (1935): Die Ursache des pestartigen Krebssterbens. *Zeitschrift für Fischerei und deren Hilfswissenschaften* 33, 343-366
- SCHÄPERCLAUS, W.** (1979): Fischkrankheiten. Akademie Verlag, Berlin
- SCHÄPERCLAUS, W.** (1991): Fish diseases (Fischkrankheiten), Volume 2. 5th Edn. Amerind Publishing Co. Pvt. Ltd.: New Delhi

- SCHIKORA, F.** (1906): Die Krebspest. *Fischerei-Zeitung* 9, 529-532, 549-553, 561-566, 581-583
- SCHMID, I.** (1998): Untersuchungen zur Diagnose und Differentialdiagnose des Krebspesterreger *Aphanomyces astaci* (Oomycetes) bei Edelkrebsen (*Astacus astacus* L.). Diss. med. vet. LMU München
- SCHOLTZ, G.** (1999): Freshwater crayfish evolution. *Freshwater crayfish* XII, 37-48
- SCHOLTZ, G.** (2003): Parthenogenesis in an outsider crayfish. *Nature*, Bd. 421, S. 806, 2003
- SCHUBERT, R., BAHNWEIG, 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
- SEEGERT, A.** (1997): Krankheiten der Flusskrebse – Eine Literaturstudie. Diss. med. vet., LMU München
- 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.** (1983a): β -1, 3-glucan activation of crustacean haemocytes in vitro and in vivo. *Biol. Bull.* 164, 299-314
- SMITH, V. J. und SÖDERHÄLL, K.** (1983b): Induction of degranulation and lysis of haemocytes of the freshwater crayfish *Astacus astacus* by components of the prophenoloxidase activating system in vitro. *Cell Tissue Res.* 233; 295-303
- SMITH, V. J. und SÖDERHÄLL, K.** (1984): Crayfish pathology: an overview. *Freshwater Crayfish* VI, 199-211

- SMOLIAN, K.** (1925): Der Flusskrebs, seine Verwandten und die Krebsgewässer. In: Demoll und Meier, Handbuch der Binnenfischerei Mitteleuropas, Bd. 5, Stuttgart
- 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.** (1983): β -1,3 -glucans enhancement of protease activity in crayfish haemocyte lysate. *Comp. Biochem. Physiol. B* 74, 221-224
- SÖDERHÄLL, K.** (1988): Fungal parasites and other diseases of freshwater crayfish. In: Rapautlous 222: K'eskis-Soumen Kalastuspiirin Kalastumoimisto Tiedros nro.5: (Herausgeber: J. Kovonen und R. Lappalainen), 23-46, Jyväskylä Finland
- SÖDERHÄLL, K.** (2002): Immune Reactions. In: Biology of Freshwater Crayfish (Herausgeber: David M. Holdich, Blackwell Science 2002). 439-464
- 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. (Herausgeber: M. S. Fuller und A. Jaworski). South Eastern Publishing Corp.
- SÖDERHÄLL, K. und CERENIUS, L.** (1992): Crustacean immunity. *Annual Review of Fish Diseases* 2, 3-23
- SÖDERHÄLL, K. und CERENIUS, L.** (1998): Role of 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. In: 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. (Herausgeber: D. M. Holdich und R. S. Lowery). 213-235. Croom Helm Ltd.: London
- SÖDERHÄLL, K. und SMITH, V. J.** (1986): In: The prophenoloxidase activating system (Herausgeber: M. Brehélin) The biochemistry of its activation and role in arthropod cellular immunity, with special reference to crustaceans. In: Immunity of invertebrates (Herausgeber: M. Brehélin) Springer Verlag, Berlin Heidelberg, Germany, 208-223
- SÖDERHÄLL, K. und UNESTAM, T.** (1979): Activation of crayfish serum prophenoloxidase: The specificity of cell wall glucan activation and activation by purified fungal glycoproteins. *Can. J. Microbiology*, 25, 404-416
- SRITUNYALUCKSANA, K. und SÖDERHÄLL, K.** (2000): The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture* 191, 53-69
- STORCH, V. und WELSCH, U.** (1999): Anatomy of male *Astacus astacus*, dorsal view. In: Biology of Freshwater Crayfish. (Herausgeber: D. M. Holdich). 54
- STUCKI, T.P. und STAUB, E.**(1999): Distribution of crayfish species and legislation concerning crayfish in Switzerland. In: Crustacean issues 11. (Herausgeber: F. Gherardi und D. M. Holdich). 141-147
- SVENSSON, E. und UNESTAM, T.** (1975): Differential induction of zoospore encystment and germination in *Aphanomyces astaci*, Oomycetes. *Physiologia Plantarum* 35, 210-216
- 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

- TROSCHER, H. J.** (1997): In Deutschland vorkommende Flusskrebse: Biologie, Verbreitung und Bestimmungsmerkmale. *Fischer und Teichwirt* 9, 370-376
- UNESTAM, T.** (1965): Studies on the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci*: II. Some factors affecting growth in vitro. *Physiologia Plantarum* 18, 483-505
- UNESTAM, T.** (1966b): Chitinolytic, cellulytic, and pectinolytic activity in vitro in 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.** (1973a): Significance of diseases on freshwater crayfish. *Freshwater crayfish* I, 136-150
- UNESTAM, T.** (1973b): Fungal diseases of crustacean. *Rev. Med. Vet. Mycol.* 8: 1-20
- 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 crustacean. In: *Pathogenesis of invertebrate microbial diseases.* (Herausgeber: E. W. Davidson). 485-507 Allanheld, Osmun & Co: New Jersey

- UNESTAM, T. und AJAXON, R.** (1976): Phenol oxidation in soft cuticle and blood of crayfish compared with that in other arthropods and activation of the phenol oxidases by fungal and other cell walls. *Journal of Invertebrate Pathology* 27, 287-295
- 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 SÖDERHÄLL, K.** (1977): Soluble fragments from fungal cell walls elicit defence reactions in crayfish. *Nature* 167, 45-46
- UNESTAM, T. und WEISS, D. W.** (1970): The host-parasitic 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
- VEY, A., SÖDERHÄLL, K. und AJAXON, R.** (1987): Susceptibility of *Orconectes limosus* Raff. to the crayfish plague, *Aphanomyces astaci* Schikora. *Freshwater Crayfish VII*, 284-291
- VOGT, G.** (2002): Functional Anatomy. In: *Biology of Freshwater Crayfish* (Herausgeber: David M. Holdich, Blackwell Science 2002). 53-151
- VON LUKOWICZ, M.** (1999): Freshwater crayfish in the fishery legislation of the federal states (Bundesländer) of Germany. *Freshwater Crayfish XII*, 890-898
- WEBSTER, J.** (1980): *Introduction to funghi*. 2nd Edition. Cambridge University Press: London, New York
- WESTMAN, K. et al.** (1990): Cultivation of Freshwater Crayfishes in Europe. In: *Freshwater Crayfish Aquaculture* (Herausgeber: Jay V. Huner, PhD 1994). 169
- WESTMAN, K.** (1991): The crayfish fishery in Finland: its past, present and future. *Finnish Fisheries Research* 18, 7213-7218

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 amplifications. (Herausgeber: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky und T. J. White). 315-322. Academic press: San Diego, CA

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 Süßwasserfischseuche, Muskelkrankheiten und zur Schaffung seuchenfreier Fischhaltungsbetriebe und Gebiete (Fischseuchenverordnung) Fassung vom 17. August 1998, BGBl S. 1 2175. 1998

Verordnung zum Schutz wildlebender Tier- und Pflanzenarten (Bundesartenschutzverordnung- BArtSchV) vom 19. Dezember 1986, BGBl 1 S. 2705, zuletzt geändert durch Verordnung vom 6. Juni 1997, BGBl 1 S. 1327. 1997

IIX. ANHANG:Sequenzen der verwendeten Primer:**80 er Primer:**

5' - GCT TGT GCT GAG GAT GTT CT - 3'

640 er Primer:

5' - CTA TCC GAC TCC GCA TTC TG - 3'

525 er Primer:

5' - AAG AAG GCT AAA TTG CGG TA - 3'

143 er Primer:

5' - TGC CTT ATC AGC T(AGCT)T CGA TTG TAG - 3'

145 er Primer:

5' - TTC AG(AGCT) TTT GCA ACC ATA CTT CCC - 3'

IX. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
A	Auge
A.a.	<i>Aphanomyces astaci</i>
Aph.astaci	<i>Aphanomyces astaci</i>
Aqua dest.	Aqua destillata
Aqua inject.	Aqua injectabila
BA	Beinansatz
bp	Basenpaare
C	Cytosin
°C	Grad Celcius
CT	Cephalothorax
DA	dorsales Abdomen
DK	Dohlenkrebs
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<u>d</u> esoxyribon <u>u</u> cleic acid)
dNTP	<u>D</u> esox <u>y</u> nukleosid <u>t</u> riphosphat
EDTA	<u>E</u> thylend <u>a</u> min <u>t</u> etra <u>a</u> acetat
EK	Edelkrebs
F	Forward
G	Guanin
GK	Galizierkrebs
KK	Kamberkrebs
L	Liter
μ	mikro (10 ⁻⁶)
m	milli (10 ⁻³)
M	molar, mol/l
Min.	Minuten
PCR	Polymerasekettenreaktion (<u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
PG1	<u>P</u> epton- <u>G</u> lukose- <u>1</u> -Medium/Agar
ProPO	<u>P</u> rophenol <u>o</u> xidase
R	Reverse
RFLP	<u>R</u> estriktions <u>f</u> ragment- <u>L</u> ängenpolymorphismus
S.	<i>Saprolegnia</i>

SK	Signalkrebs
T	Telson
T	Thymin
TAE	<u>T</u> ris- <u>A</u> acetat- <u>E</u> DTA
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
U	Unit
UV	Ultra Violett
V	Volt
WK	Weiche Kutikula

X. DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. habil. R. Hoffmann bedanken für die Überlassung des Dissertationsthemas, die freundliche Unterstützung und für die eingehenden Korrekturen dieser Arbeit.

Meiner Betreuerin Frau Dr. B. Oidtmann möchte ich ganz herzlich für ihre wissenschaftliche und freundliche Betreuung, sowie für ihre stete Hilfsbereitschaft danken.

Für die Bereitstellung der Edelkrebse möchte ich Herrn Dr. M. Keller danken.

Zudem möchte ich allen Mitarbeitern des Instituts für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten der LMU München für ihre freundliche Unterstützung und gute Zusammenarbeit danken. An dieser Stelle möchte ich mich besonders bedanken bei Christine Kühnhauser-Vogt, Antoinette von Sigriz-Pesch, Josef Feiling und unserem Fischwirt André Hohenegger für die gute Versorgung der Flusskrebse.

Ein großer Dank gilt auch meinen ehemaligen und momentanen Kollegen, die mir den Einstieg in die Molekularbiologie erleichtert haben und mir jederzeit freundlich und hilfsbereit zur Seite standen: Nicole Schaefers, Noppadon Sukrakanchana, Dr. Sascha Hallett und Hatem Soliman.

Nicht zu vergessen meine Freunde und teilweise ehemaligen Kollegen: Siv Finstad, Dr. Andreas Bischof, Miriam Küppers, Sandra Heyer und Gisela Olbrich.

Ihnen danke ich für ihre Unterstützung, ihre Aufmunterung und ihre Freundschaft.

Für die ausgiebigen Korrekturvorschläge, sowie für das Formatieren dieser Arbeit und das Beistehen in den letzten Wochen danke ich besonders meinen Freunden/Kollegen Michael Meixner, Sarah Jousen und Verena Weber.

Einen Dank möchte ich auch der Josie für ihre Geduld und die vielen schönen Stunden im Englischen Garten aussprechen.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Eltern, deren liebevolle und tatkräftige Unterstützung die Erfüllung meines Traumberufes und die Anfertigung dieser Arbeit erst ermöglicht haben.

XI. LEBENSLAUF

Persönliche Daten:

Name: Annabelle Elke Magali Culas
Geburtsdatum: 06. Oktober 1974
Geburtsort: Bühl/Baden
Staatsangehörigkeit: Deutsch/Französisch
Eltern: Jean-Marc Culas
Ute Culas, geb. Kirchner

Schulbildung:

1980-1981 École maternelle (Franz. Grundschule), Baden-Baden
1981-1985 Vincenti-Grundschule, Baden-Baden
1985-1994 Markgraf-Ludwig-Gymnasium, Baden-Baden
Juni 1994 Allgemeine Hochschulreife

Studium:

1995-2001 Studium der Veterinärmedizin an der Justus-Liebig-Universität
Gießen
SS 1998 Auslandssemester in Frankreich an der
École Vétérinaire de Nantes
Juli 2001 Staatsexamen
Sept. 2001 Approbation
seit Nov. 2001 Anfertigung der vorliegenden Dissertation
im Institut für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten
der LMU München