

**UNTERSUCHUNG AUTOCHTHONER UND
ALLOCHTHONER KREBSARTEN HEIMISCHER
GEWÄSSER AUF PILZINFEKTIONEN
UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG
VON *APHANOMYCES ASTACI*;
KLASSIFIZIERUNG DES ERREGERS MITTELS
MODERNER MOLEKULARBIOLOGISCHER
METHODEN**

Forschungsprojekt Nr. 1362

1. Jänner 2004 bis 1. Oktober 2006



Zusammenfassung

Im vorliegenden Forschungsprojekt ist es gelungen aus symptomlosen burgenländischen Signalkrebsen den Krebspesterreger *A. astaci* zu isolieren und molekularbiologisch zu definieren. In weiteren Studien wurde erstmals eine vollständig beschriebene Glykosyl-Hydrolase Familie 18, Klasse V - Chitinase des Oomyceten *A. astaci* (Gb04) mit Hilfe der 5', 3'-RACE-PCR (rapid amplification of cDNA ends-PCR) aus der Gesamt-RNA isoliert und analysiert.

Aufgrund der für das Krankheitsgeschehen „Krebspest“ unverzichtbaren Funktion der Chitinase wurde dieses Gen als zentraler Schwerpunkt für die molekularbiologische Diagnostik herangezogen.

In einem qPCR-Assay wurde auf Grundlage der Chitinase ein *A. astaci* - spezifisches Primerset mit Oligonukleotiden aus der ITS-Region in einer Duplex-Reaktion kombiniert und evaluiert. Mit Hilfe dieses Tests konnte der Erreger zweifelsfrei in Freilandproben aus verschiedenen Bundesländern, wie z.B: Salzburg, Kärnten und dem Burgenland, detektiert werden.

Auf Protein-Ebene wurde basierend auf einem Strukturmodell der katalytischen Domäne der Chitinase spezifisch gerichtete Antikörper produziert. Eingesetzt im Westernblot konnte das Enzym extrazellulär detektiert werden.

Weiters gelang die Isolierung und Charakterisierung zweier als N-Acetylhexosaminidasen fungierender extrazellulärer, chitinolytischer Enzyme von *A. astaci*. Sie sind hauptverantwortlich für die substratunabhängige, konstitutive chitinolytische Aktivität, welche auch als diagnostisches Kriterium für *A. astaci* herangezogen wird.

Das extrazelluläre chitinolytische Enzymsystem von *A. astaci* kann somit wie folgt beschrieben werden:

Chitinase dient zur Aufspaltung von Chitin in Dimere von N-Acetylglucosamin, während die entgeltige Aufspaltung in Monomere durch die N-Acetylhexosaminidasen erfolgt.

Summary

In the present research project we succeeded to isolate the crayfish plague agent *A. astaci* from healthy signal crayfish and to define it molecular-biologically.

In other studies we described for the first time the complete sequence of a Glycosyl-Hydrolase family 18, class V - chitinase of the oomycete *A. astaci* (Gb04). This gene was isolated out of total RNA by 5', 3'-RACE-PCR (rapidly amplification of cDNA ends-PCR).

Because of the essential function of the chitinase for the illness event "crayfish plague", the main focus of our molecular biological diagnostic was laid on this gene. In a qPCR-assay on basis of the chitinase an *A. astaci* - specific primerset together with oligonucleotides from the ITS region was applied in duplex reactions and evaluated. With the help of this test we managed to detect *A. astaci* in samples from different Austrian provinces, like Salzburg, Carinthia and Burgenland.

On protein level we created a structural model of the catalytic domain of the chitinase. Based on that, we made specifically directed polyclonal antibodies against the protein, which were used to detect the enzyme in the media by Westernblot.

Furthermore we isolated and characterised two N-acetylhexosaminidases, which both function as extracellular, chitinolytic enzymes of *A. astaci*. They are responsible for the substrate-independent, constitutive chitinolytic activity of the agent, which is one diagnostic criterion for *A. astaci*.

The extracellular chitinolytic system of *A. astaci* can be described in the following way:

Chitinase degrades chitin to the dimeres of N-acetylglucosamine, while the final degradation to monomers is made by N-acetylhexosaminidases.

**UNTERSUCHUNG AUTOCHTHONER UND ALLOCHTHONER KREBSARTEN
HEIMISCHER GEWÄSSER AUF PILZINFEKTIONEN
UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG VON *APHANOMYCES ASTACI*;
KLASSIFIZIERUNG DES ERREGERS MITTELS MODERNER
MOLEKULARBIOLOGISCHER METHODEN**

DNA - TEIL

GH-18 Chitinase-Gen Identifizierung

Für die Entwicklung einer diagnostischen Methode basierend auf qPCR wurde Hauptaugenmerk auf eine Chitinase der GH-18 Familie gelegt, welche als Pathogenitätsfaktor während dem Infektionsgeschehen von tragender Bedeutung ist.

Die konstitutive Expression dieses Gens ermöglichte es mittels 5', 3' RACE PCR die jeweiligen Enden der mRNA zu isolieren und zu sequenzieren (Abb 1 und 2). Darauf folgend konnte die neu gewonnenen Informationen für die Amplifikation des gesamten Gens (1800bp) im Genom herangezogen werden (Abb.3).

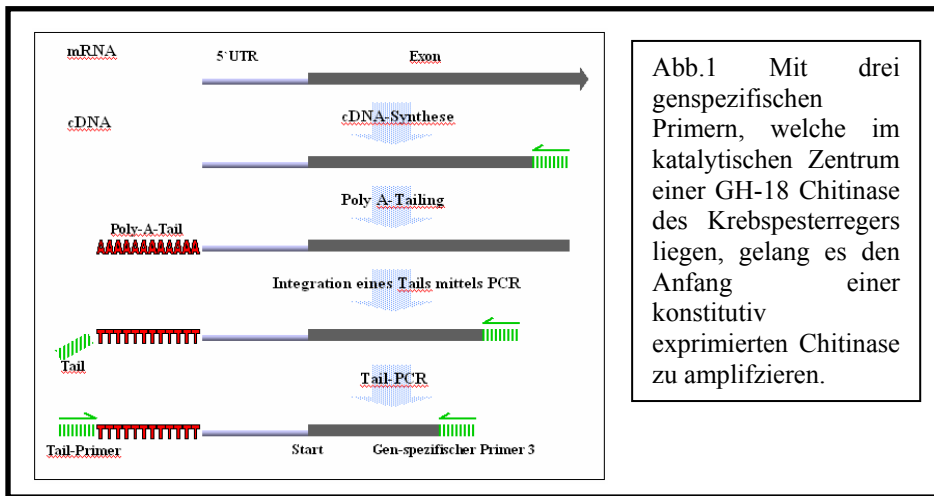


Abb.1 Mit drei genspezifischen Primern, welche im katalytischen Zentrum einer GH-18 Chitinase des Krebspesterregers liegen, gelang es den Anfang einer konstitutiv exprimierten Chitinase zu amplifizieren.

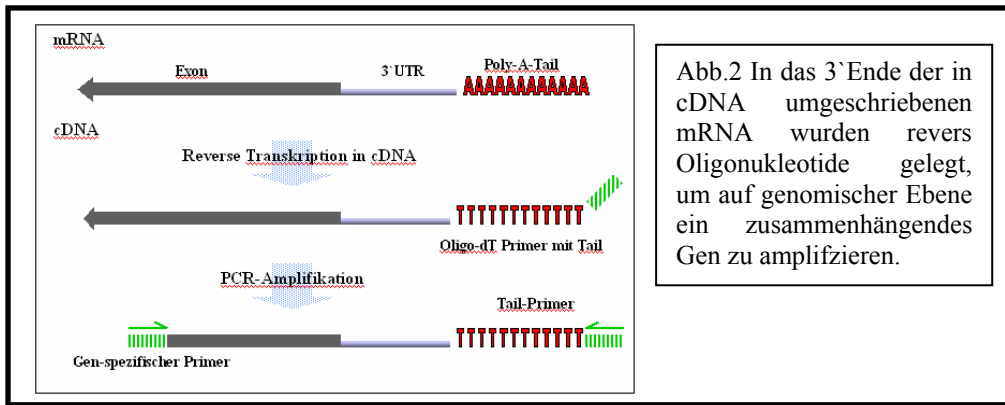


Abb.2 In das 3' Ende der in cDNA umgeschriebenen mRNA wurden revers Oligonukleotide gelegt, um auf genomischer Ebene ein zusammenhängendes Gen zu amplifizieren.

Chi2 A. astaci Gb04 (DQ 295065)

```

MTMIAKSAALVAMTSSVEAKLKNVYVYIEWAIYGRKFGIFDLD
WDKITHINYAFGKPNPDGTVGVHDGYAAVQNRFPGRGDSWNDQGNL
YGNFQGGFKQKQKARGTKFGLSIGGWTLSDKFS SI ASETGRRTFAK
SSVKLMLDLGLDFLIDWBYPEVEGGNDSPPVPHHPDDIKNYVLLLSA
IRDEFKTLFPWKAELSVAS PAGPDKYRHWDFTAICGQLDFINIMTYDL
AGSWSKYTDHQANLYEDPNHPGA VKHPQRRANYIKGCCPSDKIVLGI
PAYGRSFEQSNGLYSNFTKPTKGSWVAGNDGKGVWDYKELPHPGATE
IYDEKLGATYSYDPTSKIPTSIEGPKSLAQKLDYIKQYNLGGTMFWS
GDADAKSGSPRSLITQVYNTFGRANMAFEDNMLNYPTSQYANIRAGA
AVTSAVPTSSPVAPVTTVAPVTVSEVPTSSPPLYNCRSRDLGGPR
HVFPQPDCNCRSRDLGGPVTSSPDAPVTTVAPVTSVAHVTCSSYAP
VTSSAVPETTPVEPVTTEATPAPTGGPITNPLETLAPTTAAAGDQC
KGNKNVCFWFLTGQTVDHSSQANCLFTSFIWCP
    
```

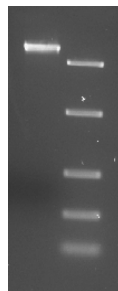


Abb.3 Zeigt die vollständige Aminosäuresequenz des klonierten Chitinase-Gens mit identifiziertem Signalpeptid (grün), Substrat-Bindungsstelle (gelb) und katalytischem Zentrum (rot). C-terminal fallen repetitive Sequenzen (blau geschrieben) auf, die vermutlich eine PEST-Domäne, ähnlich zu Insekten-GH18 Chitinasen, darstellen. Abb.4 Gel-Foto mit 1800bp-Bande. (Marker: 50bp-200bp-400bp-850bp-1500bp)

Sequenzierung des katalytischen Zentrums einer GH-18 Chitinase von Oomyceten und Echten Pilzen

Für das Design von *A. astaci* - spezifischen Primersets für die Diagnostik ist es notwendig die entsprechenden Chitinasegene anderer Oomyceten und Pilze zu kennen (siehe auch S.6). Um an diese Sequenzinformationen zu gelangen, wurden in konservierten Regionen der GH-18 Chitinase Sequenzier-Primer gelegt (Abb.5).

```

Aphanocladium album
      Length = 423

Score = 179 bits (455), Expect = 1e-43
Identities = 96/211 (45%), Positives = 124/211 (58%), Gaps = 17/211 (8%)

Query: 143 KAVAGDSWNDQGNLSLYGNFGQGFQKQKARGTKFGLSIGGWTLSDDQFSSIASTETGRRTF 202
          K AGDSWND G + YG Q + K++ R K LSIGGWT S F + AS+ R+TF
Sbjct: 91 KHYAGDSWNDVGTNAYGCVKQLYLLKKQNRNMKVMLSIGGWTWSTNFPAAASSAATRKTF 150

Query: 203 AKSSVKLMLDLGLDFLDIDWEYPVEGGNDSPVPVPHRPDDIKNYVLLLSAIRDEFKTLPWK 262
          A+S+V M D G D +DIDWEYP + +N VLLL A+R E + +
Sbjct: 151 AQSavgfMkDwGfdGIdIdweYPADA-----TQAQNMVLLLQAVRSELDsYAAQ 199

Query: 263 AE-----LSVASPAGPDNYRHWDFTAICGQLDFINIMTYDLAGSWSKYTDHQANLYEDP 316
          LS+A+PAGPDNY F + LD+IN+M YD AGSWS YT H AN+Y +P
Sbjct: 200 YAKGHHFLLSIAAPAGPDNYNKLKFAELGKVLVDYINLMAYDYAGSWSNYTGHDANIYANP 259

Query: 317 NHPPGAKYSXHNAVQDYIKGGCPSDKIVLGI 347
          +P Y+ +AVQ YI GG P++KIVLG+
Sbjct: 260 QNPnATpYnTDDAVQAYINGGVPANKIVLGM 290
    
```

Abb.5 Beispiel eines BLAST-Suchlaufes mit der Aminosäure-Sequenz der ausschnittsweise gezeigten GH-18 Chitinase von *A. astaci*. Orange eingefärbt sind jene Aminosäurenabfolgen, in deren kodierenden Bereichen Oligonukleotide gelegt wurden.

Primerset (Grundlage: Aminosäuresequenz)

SEQ685f CCGGAGACTCGTGGAAACGAC (Bereich: **DSWND** in der AS-Sequenz) und **SEQ1159r** TTGCTCCAGCTGCCCGC (Bereich **AGSW** in der AS-Sequenz)

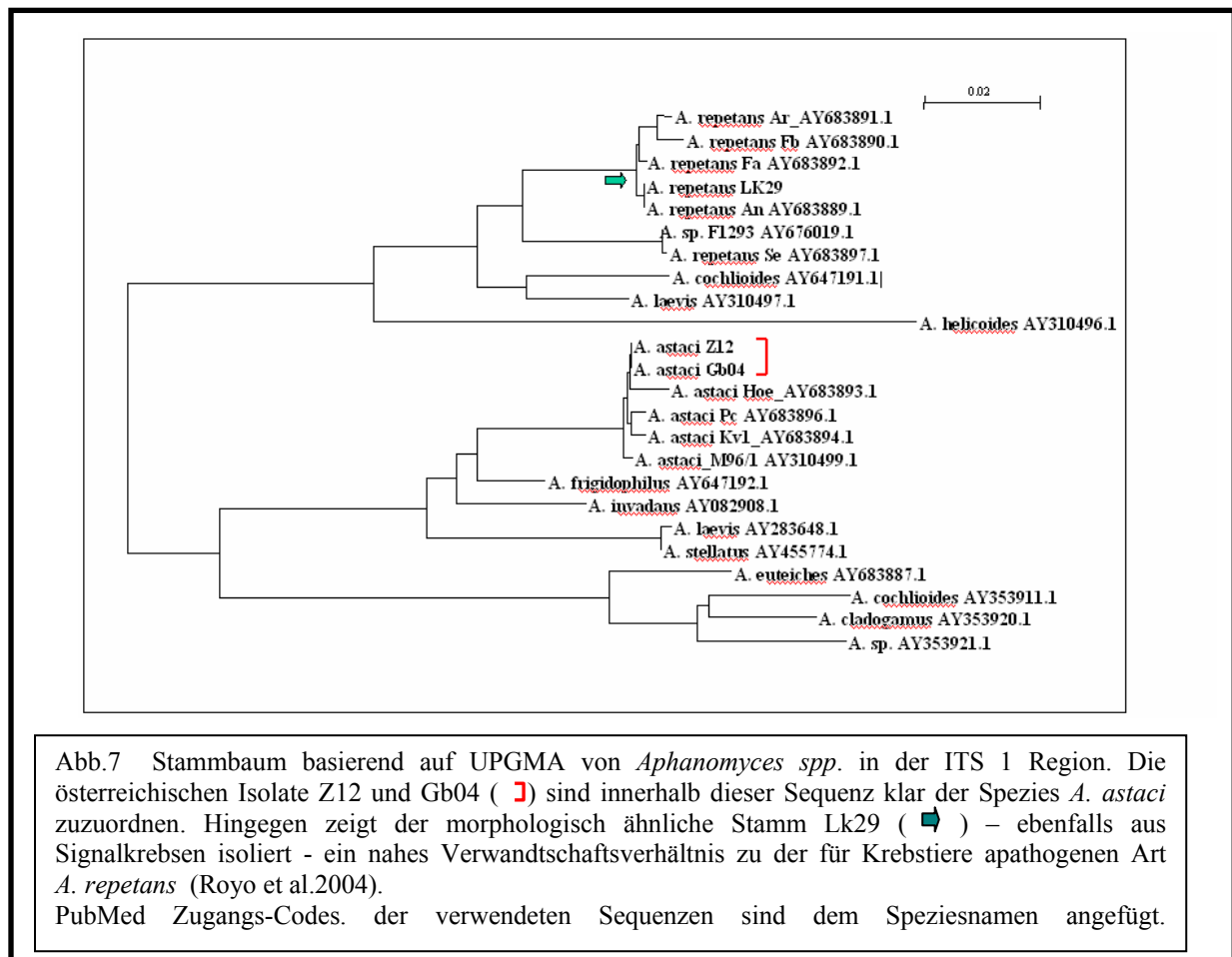
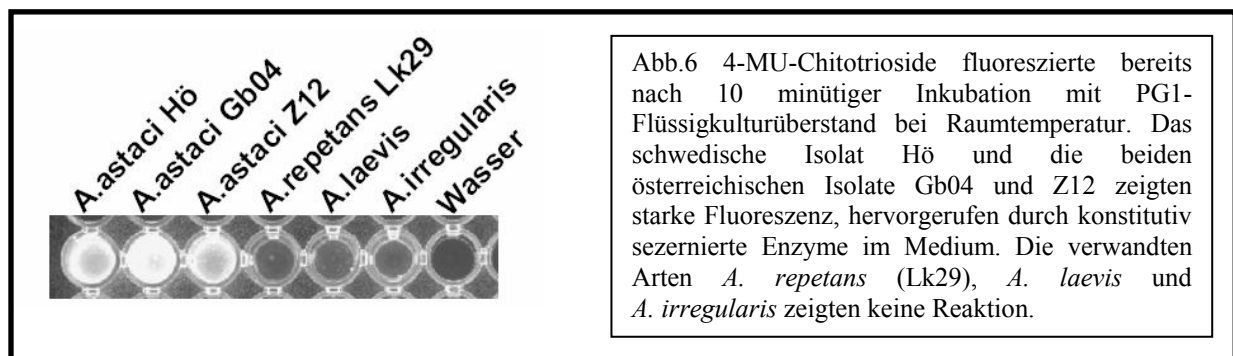
Mit den oben genannten Primern wurde ein rund 450 bp Fragment mit den hochkonservierten Bereichen: Substrate *binding site I*, *active site* des Chitinase-Enzyms von folgenden Oomyceten-Spezies amplifiziert: *Aphanomyces astaci* Hö, *L1*, *Kv*, *Pc*, *Sv*, *Ti*, *Yx*, und *Ra*; *Saprolegnia parasitica*; *Aphanomyces helicoides*; *Aphanomyces laevis*; *Achlya racemosa*; *Leptolegnia caudata*

SEQuniF CGCCGGAGAYTCTTGGAA YGA (xx**DSWND**)
SeQuniR CCAGCATAGTCGTAGGCCAT (**MTDYAG**)

Mit diesen Primern konnten die konservierten Bereiche des Chitinase-Gens von *Fusarium solani* und *Trichosporon cutaneum* amplifiziert werden. (siehe auch Anhang)

Kultivierung und Identifizierung österreichischer Krebspest-Isolate

Aus melanisierten Flecken der Signalkrebs-Kutikula gelang es 2004 drei - dem Krebspesterreger morphologisch ähnliche - Oomyceten zu isolieren. Folgende Analysen, wie der Fluoreszenz-Test mit dem synthetischen Substrat 4-Methylumbelliferyl-Chitotrioside (Abb.6), haben gezeigt, dass die Isolate Gb04 (Ganaubach) und Z12 (Zöbern-Bach) eindeutig der Spezies *A. astaci* zugeordnet werden können. Das aus dem Leitha-Kanal stammende Isolat Lk29 (Abb.7) konnte der erst 2004 neu beschriebenen Aphanomyces-Art *A. repetans* zugeordnet werden.



Spezifisches Primer-Design im sequenzierten GH-18 Chitinase-Gen von *A. astaci*

Die durch Sequenzier-Primer gewonnenen Sequenzinformationen der unterschiedlichsten, zum Teil apathogenen Oomyceten und Pilze wurden in einem Alignment zusammengefasst. Inseln der höchsten Inhomologie zu dem Chitinase-Gen des Krebspesterregers wurden erfasst und zum Design der diagnostischen Primer herangezogen.

Oomyceten:

chÖ (schwed. Isolat)/cGb04 (öst. Isolat) = *A. astaci*
cAhel = *A. helicoides*
cAlae = *A. laevis*
cLk29 = *A. repetans*
cLep = *Leptolegnia caudata*
cAch = *Achlya racemosa*
cSap = *Saprolegnia parasitica*

echte Pilze:

cTri = *Trichosporon cutaneum*
cFuso = *Fusarium solani*

chiDiagnose-f

 →

CHÖ.TXT	(334)	g	agttgagcgtggcgctcc	cccgccggcccggacaactaccgccactggga
CGB04.TXT	(334)	.	.	.
CAHEL.TXT	(334)	.	c.c.	t.c.
CALAE.TXT	(334)	.	c.c.	t.c.
CLK29.TXT	(334)	.	c.c.	t.c.
CLEP.TXT	(315)	.	c.c.	aa.a
CACH.TXT	(325)	.	c.c.	gtta.t
CSAP.TXT	(325)	.	c.c.	gt.a
CTRI.TXT	(301)	.	c.c.	gcg
CFUSO.TXT	(319)	.	c.c.c	aga.gcta

←

chiDiagnose-r

CHÖ.TXT	(384)	ctttaccgccatctgcccga	ctggactttatcaacatcatgac	c
CGB04.TXT	(384)	.	.	.
CAHEL.TXT	(384)	.	cc.t.g	cac
CALAE.TXT	(384)	.	cc.t.tg	cac
CLK29.TXT	(384)	.	cc.t.ag	cac
CLEP.TXT	(365)	t.	cc.g.g.g	t.g
CACH.TXT	(375)	.	cc.gt.gg.g	tc.g
CSAP.TXT	(375)	.	c.gt.g.g	tc.g
CTRI.TXT	(351)	.	c.gt.g.g	tc.g
CFUSO.TXT	(369)	.	g.ccg.g.gga.c.gt.cc	ctgg.c

chiDiagnose-f: agttgagcgtggcgctcc (17bp) Tm:57
chiDiagnose-r: gtcatgatggtgataaagtccaa (23bp) Tm:55

Abb.8 Die oben beschriebenen Primer wurden mit **BO 525** und **BO 640** (Oidtmann et al., 2004), welche in der ITS (Internal Transcript Spacer) Region von *A. astaci* liegen und ein 115bp Fragment amplifizieren, in Duplex-PCR evaluiert.

Überlegung

*Da erfahrungsgemäß die Kultivierung von *A. astaci* aus Krebs-Nekrobiopsien (speziell Signalkrebsproben) sehr schwierig und zufällig ist und zudem noch ein enormer Arbeitsaufwand hinzukommt, ist die Suche nach molekularbiologischen Diagnostik-Alternativen sinnvoll. Eine solche Alternative stellt die Real-Time PCR dar:*

1. Mit Hilfe der PCR kann im Vergleich zur herkömmlichen Erreger-Isolierung der Arbeits- und Zeitaufwand stark verringert werden und durch den Nachweis des Erreger-Erbgutes präzisiert werden. Eine diagnostische Aussage ist dadurch binnen eines Tages möglich.
2. Durch Einsatz der Real-Time PCR in diesem Bereich kommt es zusätzlich durch Wegfall einzelner Arbeitsschritte, wie z.B: gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte, zu einer noch schnelleren diagnostischen Aussage (rund 2h Zeitersparnis). Zudem fallen durch Einsparung von Material weniger Kosten an.
3. Die Evaluierung der PCR durch Fluoreszenzmessungen der qPCR-Maschine wird objektiver und genauer. Das Ablesen der Ergebnisse vom Gel ist meist sehr subjektiv. Generell ist das RealTime-Verfahren sensitiver als die konservative PCR, da durch Fluoreszenzmessungen auch wenige Amplifikationsprodukte sichtbar gemacht werden, die auf dem Gel mit Ethidium-Bromid-Färbung noch nicht optisch wahrnehmbar sind.
4. Mit dem zeitgleichen Einsatz von 2 Primersets in einer Reaktion (Duplex-PCR), welche 2 verschiedene DNA-Abschnitte des Krebspesteregers vervielfachen, wird die diagnostische Aussage mit Hilfe der anschließenden Schmelzkurvenanalyse noch genauer. So ist es wahrscheinlicher auch jene Erreger-Stämme zu erfassen, die Mutationen in einem der beiden DNA-Abschnitte aufweisen (es ist bekannt, dass gewisse Oomyceten-Spezies allein innerhalb der ITS-Sequenz bis zu 6% divergieren; Matsumoto et al. 2000).

Ausgehend von den oben angeführten Überlegungen kombinierten wir die zwei beschriebenen Primersets (S.7) und evaluierten die optimalsten Bedingungen (im Text fett geschrieben) für diese Duplex-Reaktion in der Real-Time PCR.

Evaluierung der diagnostischen qPCR

Ingredientien

MgCl₂-Gradient (Duplex-PCR) bei 53°C

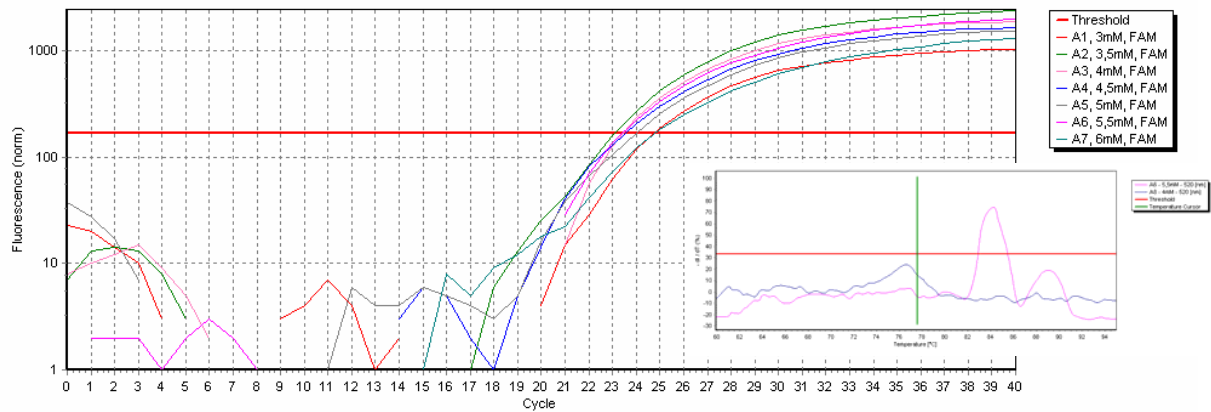


Abb.9 Sowohl in Singplex-Reaktionen der 2 Primerpaare, als auch in Duplex-PCR wurden die frühesten Ct-Werte bei 3,5 mM Endkonzentration an MgCl₂ erreicht. Die Schmelzkurven der NTC (dunkelblau) und einer Positivkontrolle (rosa) sind im kleinen Bild zu erkennen. Ein Primer-Dimer mit der Schmelztemperatur 76,5°C ist in der NTC Reaktion erkennbar, hebt sich aber von den wesentlich wärmeren PCR-Produkten der Duplex-Reaktion (83,8° C und 88,5°C) klar ab.

dNTPs-Gradient (Duplex-PCR) bei 60°C und 5mM MgCl₂

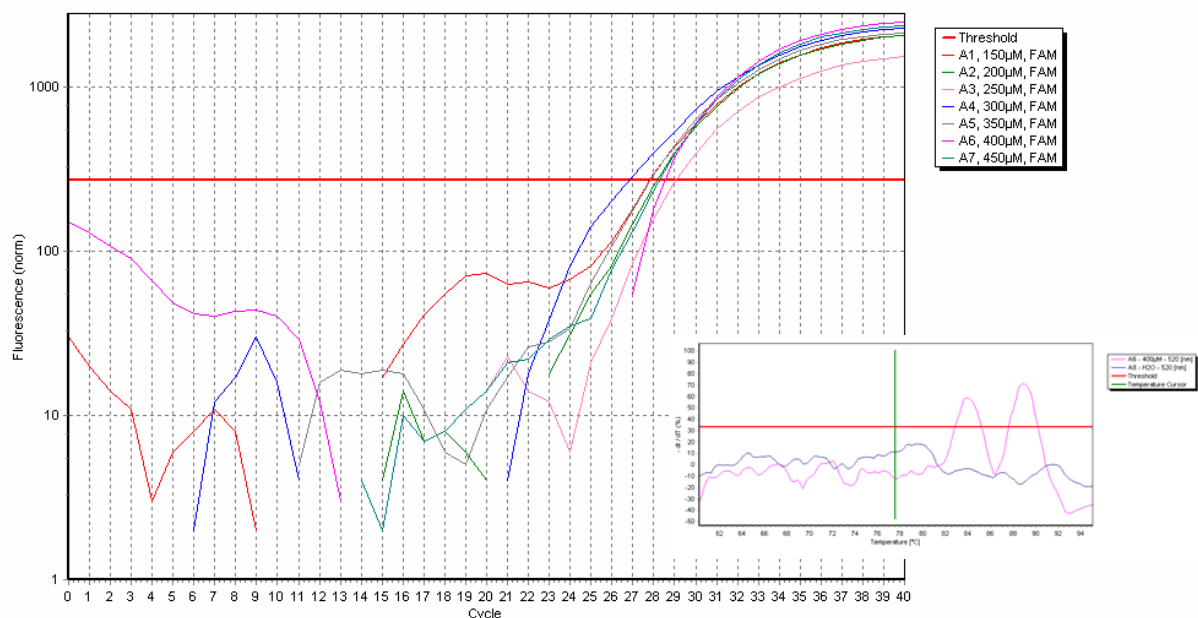


Abb.10 In Duplex-PCR-Reaktionen mit hohem MgCl₂-Gehalt zeigte sich, dass eine Endkonzentration von 150µM dNTPs ausreichend für eine stabile Amplifikation war. **Eine Endkonzentration von 400µM Nukleotide wurde – aufgrund des steilsten Fluoreszenzanstieges – in das PCR – Mastermix – Standardprotokoll übernommen.**

EvaGreen-Gradient bei 53°C

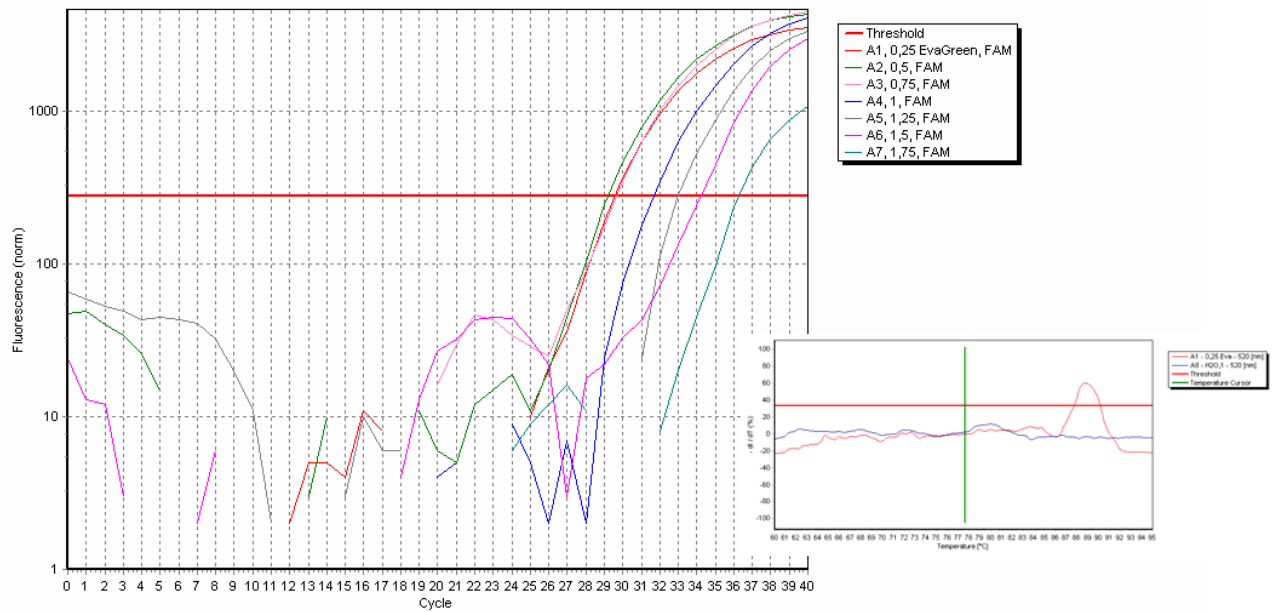


Abb.11 In der Singleplex-Reaktion mit dem Primerpaar chiDiagnose.f und chiDiagnose.r stellte sich heraus, dass EvaGreen zwischen 0,25-0,75x des 20x Stocks die besten Ergebnisse brachte. (kleines Bild NTC blau, Positiv-Kontrolle rot)

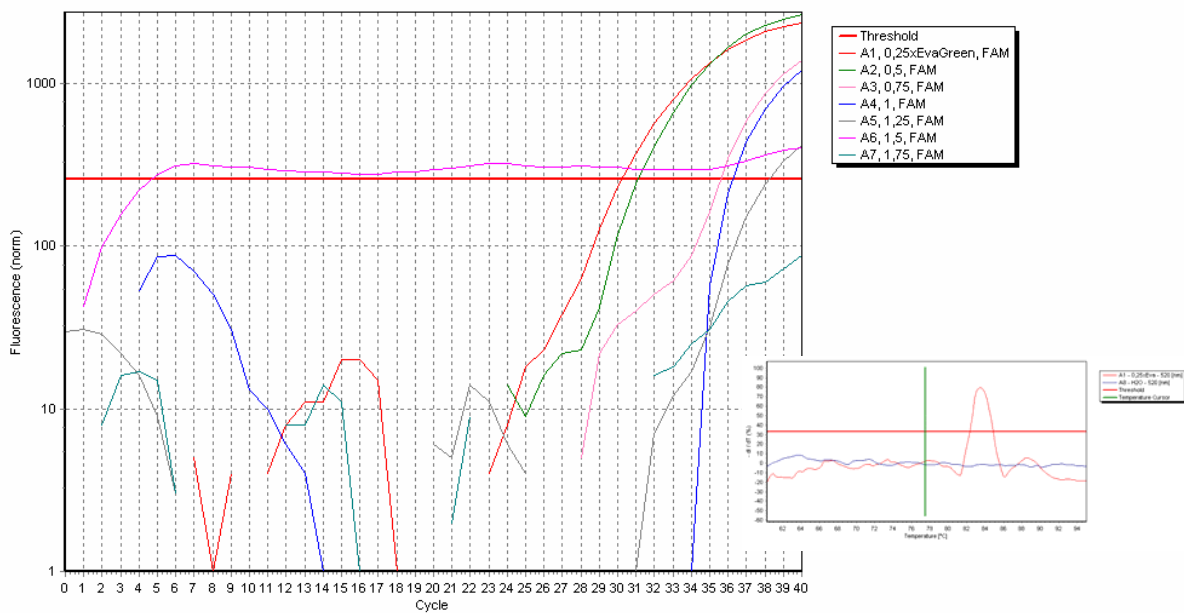


Abb.12 In Duplex-PCR bestätigte sich das Ergebnis der Singleplex-PCR. Auch hier konnten die frühesten Ct-Werte zwischen 0,25x bis 0,75x EvaGreen erzielt werden. **Für die diagnostische Anwendung der Duplex-PCR wurde die EvaGreen-Endkonzentration auf 0,5x festgelegt.** (kleines Bild: NTC blau, Positiv-Kontrolle rot).

chiDiagnose-Primer Endkonzentration (Duplex-PCR, 60°C)

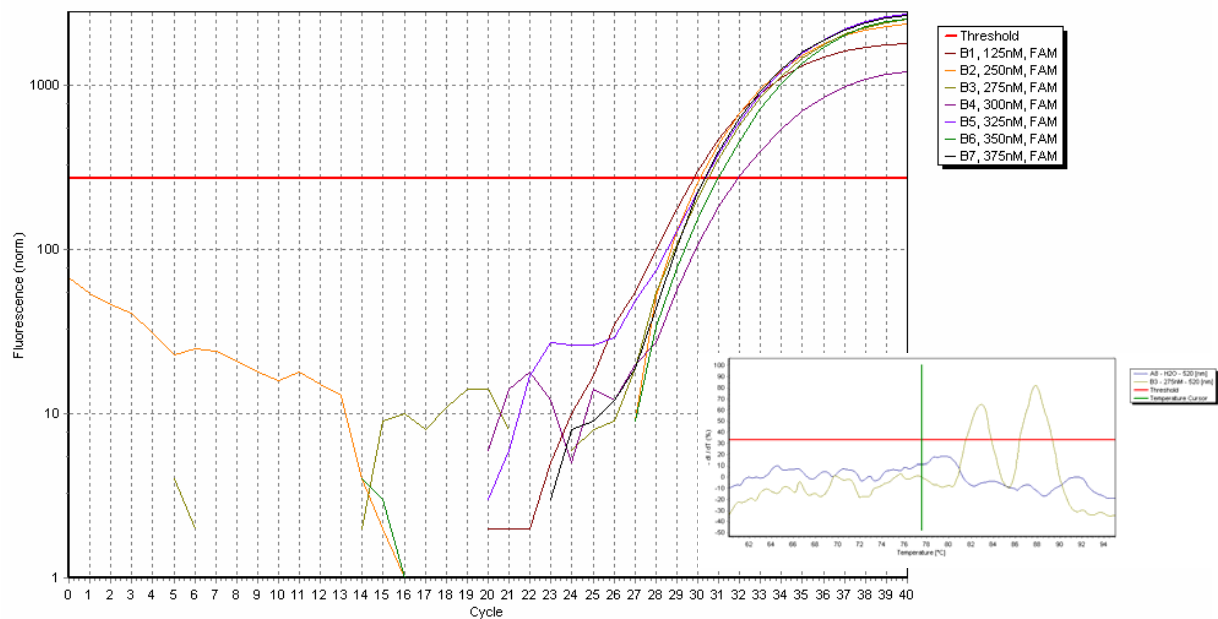


Abb.13 In der Schmelzkurvenanalyse zeigte sich, dass sich erst ab 250 nM Endkonzentration der Chitinase-Primer ein Gleichgewicht zwischen den Produktsignalen der IST (125 nM)- und Chitinase-Primern einstellt. Ab 325nM überwiegen Chitinase-Amplifikate. **Für das Standardprotokoll wurde eine Endkonzentration von 275 nM Chitinase Primer (chiDiagnose.f/r) übernommen.**

Des weiteren wurden folgende Polymerasen für den Duplex-Einsatz getestet:

HOTFIREPol DNA Polymerase (Solis BioDyne)

Smart Taq Polymerase

IQ Multiplex Powermix (BIO-RAD)

DyNAmo HS SYBR Green qPCR Kit (Finnzymes)

Die stabilsten Ergebnisse konnten mit **HOTFIREPol DNA Polymerase** und **Smart Taq Polymerase** im Hot-Start erreicht werden.

DyNAmo HS SYBR Green qPCR Kit amplifizierte hingegen in der Duplex-Reaktion stets nur ein Produkt, was wahrscheinlich auf dem im Kit enthaltenen Dye **SYBR-Green** zurückzuführen ist. (Giglio et al., 2003)

IQ Multiplex Powermix produzierte in der Duplex-PCR zwar die zwei erwünschten Schmelzkurven, jedoch bestand eine höhere Neigung zur Dimerbildung in den einzelnen Reaktionen. (Daten nicht gezeigt).

PCR-Programm

Annealing-Temperatur-Gradient (DUPLEX-PCR) von 53°C-60°C

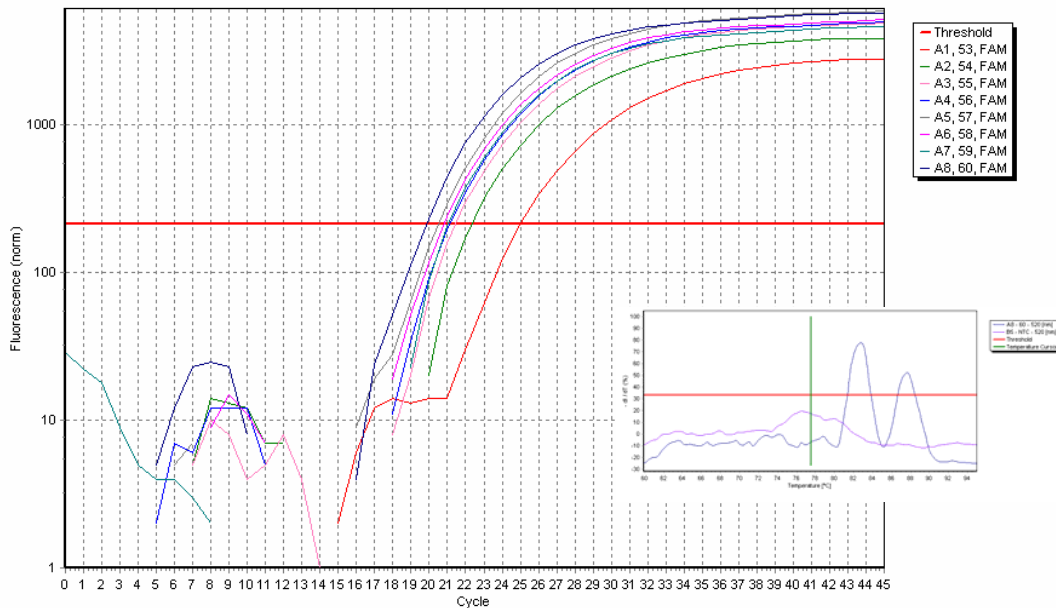


Abb.14 Im Temperaturbereich von 57°C bis 60°C zeigt die Duplex-PCR die niedrigsten Ct-Werte. **Ein Annealing bei 60°C brachte das früheste Signal.** Die NTC zeigt im Schmelzkurvenprofil eine Primer-Dimerbildung (lila), welche in der Postiv-Kontrolle (dunkelblau) nicht zu sehen ist.

Temperatur-Anpassungen (Denaturierung/Annealing/Elongation)

Annealing-Zeitdauer: 10s-15s-20s

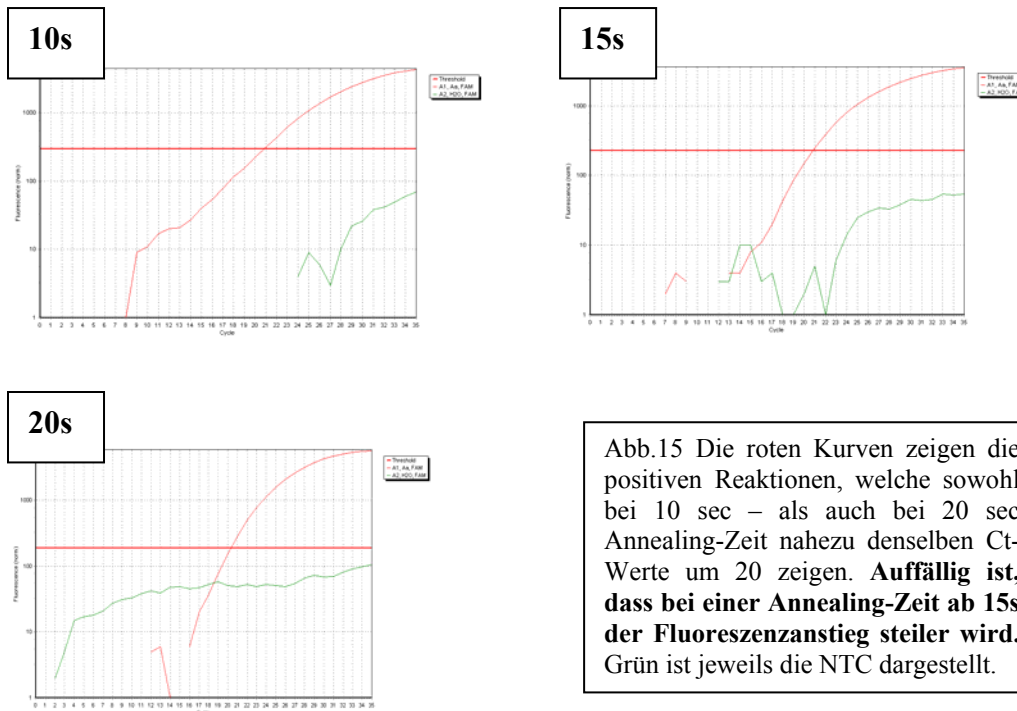


Abb.15 Die roten Kurven zeigen die positiven Reaktionen, welche sowohl bei 10 sec – als auch bei 20 sec Annealing-Zeit nahezu denselben Ct-Werte um 20 zeigen. **Auffällig ist, dass bei einer Annealing-Zeit ab 15s der Fluoreszenzanstieg steiler wird.** Grün ist jeweils die NTC dargestellt.

Denaturierung

Die Ergebnisse der einzelnen Protokolle (10s-15s-20s) zeigten, dass eine Denaturierungszeit von 15s ausreichend für die stabile Amplifikation der beiden Fragmente ist.

Elongation

Die „Elongation“ in der Duplex-Reaktion wurde bei 68°C und 72°C beurteilt. **Beide Temperaturbereiche zeigten im Ergebnis keinen Unterschied.**

(Daten nicht gezeigt)

Spezifität/Effizienz

Spezifitätsnachweis mit häufig isolierten Oomyceten und Echten Pilzen:

Oomyceten:

A. astaci Gb04 (Aa); Positiv-Kontrolle

A. repetans Lk29 (Ar Lk29), apathogen

A. laevis (Al), apathogen

A. irregularis (Ai), apathogen

Saprolegnia sp. (S), 20% pathogen

L. caudata (L), apathogen

Echte Pilze:

A. fumigatus (Af), apathogen

F. solani (F), 50% pathogen

T. cutaneum (T), pathogen

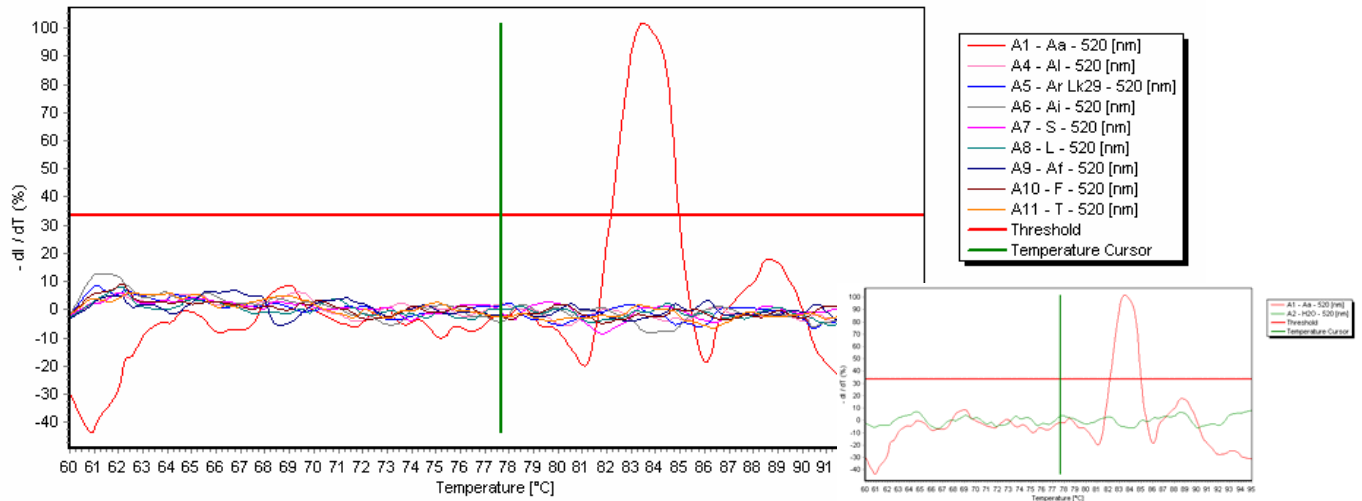


Abb.16 Die Schmelzkurve der Positiv-Kontrolle hebt sich deutlich von den Schmelzkurven der negativen zum Teil sehr nahen Verwandten des Krebspesterreger ab. Das kleine angefügte Bild zeigt NTC und Positivkontrolle der PCR.

Zusätzlich ist in Abb.17 das Vorhandensein von DNA in den jeweiligen Erbgut-Extraktionen durch eine PCR mit ITS-Sequenzierprimern dargestellt (1. *A. laevis*, 2. *A. repetans*, 3. *A. irregularis*, 4. *Saprolegnia* sp., 5. *L. caudata*, 6 *S. parasitica*, 0 NTC A. *A. fumigatus*, B. *F. solani*, C. *T. cutaneum*, 0 NTC). Abb.18 zeigt 300ng Krebs-DNA (*Cherax quadricarinatus*) Endkonzentration in 20 µl Reaktionsansatz als Negativ-Kontrolle im Vergleich zu den 2 Schmelzkurvenpeaks der Positiv-Kontrolle.

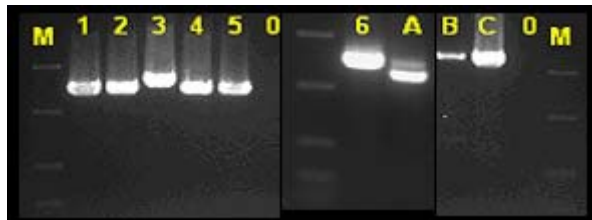


Abb.17

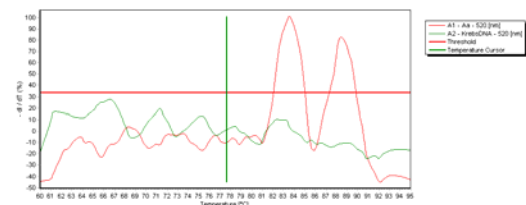


Abb.18

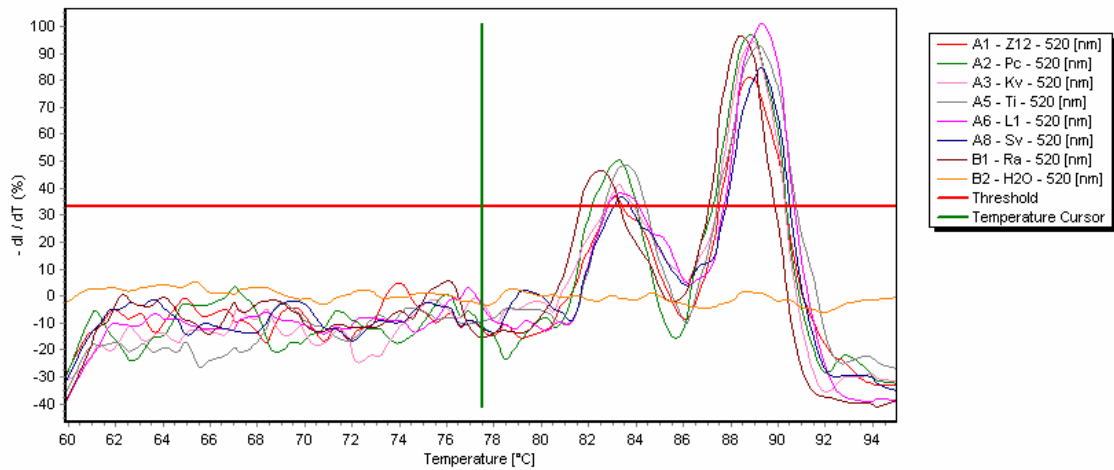


Abb.19 Bei allen bislang untersuchten *A. astaci* Spezies (Vertreter aller vier mittels RAPD-PCR eingeteilten Gruppen, Huang et al. 1994), welche in Duplex-PCR eingesetzt wurden, stellten sich in der Schmelzkurvenanalyse zwei konstante Peaks im entsprechenden Temperaturbereich von 82-84° C für das ITS-Produkt und von 88-90 °C für das Chitinase-Produkt dar. Orange dargestellt ist die NTC.

Standardkurve zur Effizienzbestimmung (Duplex-PCR)

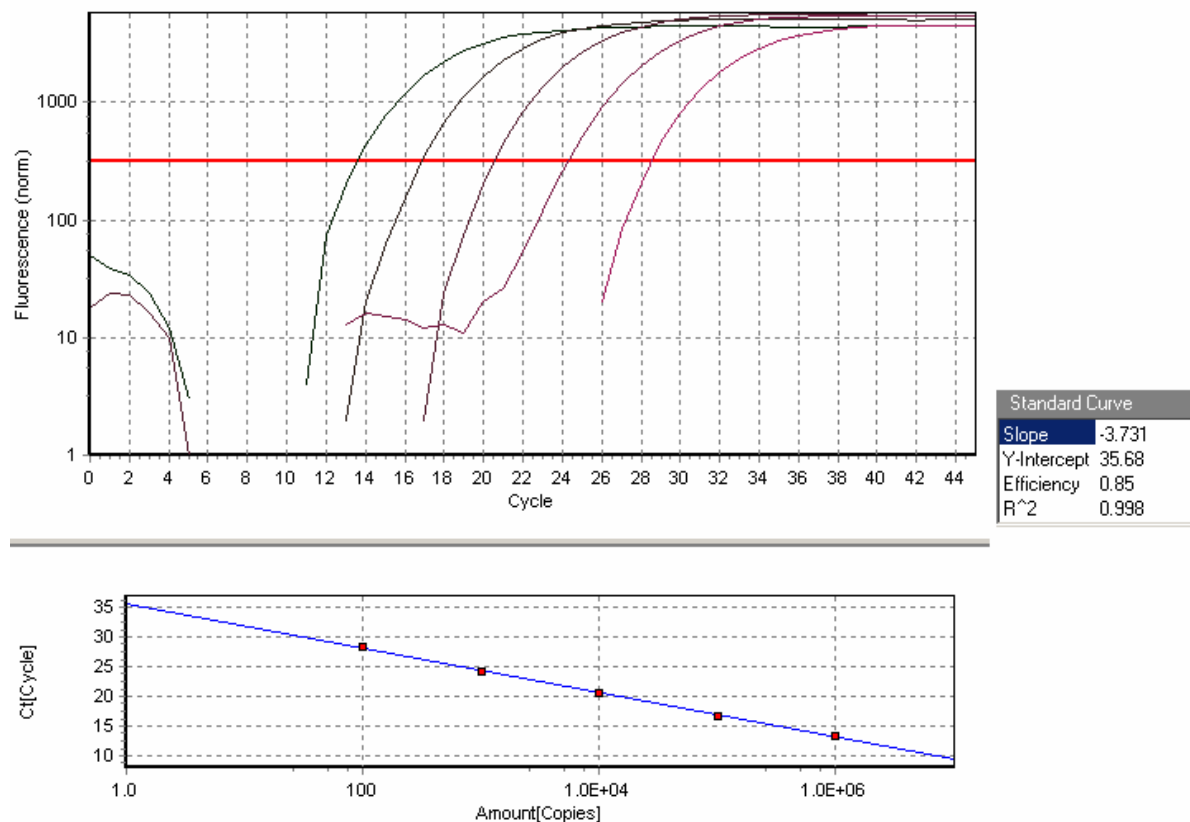


Abb.20 zeigt bei Einsatz einer genomischen DNA-Verdünnungsreihe eine konstante Amplifikations-Effizienz von 85% unter evaluierten Bedingungen. Beim Einsatz von etwa 1 ng genomischer DNA amplifizierten die beiden Primersets ab Zyklus 29 die erwarteten Produkte aus dem Chitinase-Gen und der ITS-Region.

Freilandproben-Ergebnisse

Land	Ort	Gewässer	Art	Anzahl	Kultur	PCR
Salzburg		Gewässer				
	Kaprun					
03.06.2004		Neuwirth Teich	SK	14	neg.	
20.09.2005		Bach neben Neuwirth Teich	SK	9	k.l.	neg.
18.09.2005		Golfplatzteich 7	EK	2	k.l.	neg.
20.09.2005		Golfplatzteich 4	EK	1	k.l.	neg.
20.09.2005		Neuwirth Teich	SK	24	k.l.	neg.
	Zell/See					
18.-28.09.2005		Zeller-See	KK	51	k.l.	pos.
	Saalfelden					
19.09.2005		Schwaighofer-Teich	SK	12	k.l.	neg.
19.09.2005		Streitberger Teich	SK		k.l.	neg.
19.09.2005		Fischzucht Kehlbach	SK	7	k.l.	pos.
26.09.2005		Harhambach-OL	SK	8	k.l.	pos.
26.09.2005		Harhambach-UL	SK	8	k.l.	pos.
19.09.2005		A-Bach Biotop	SK	10	k.l.	neg.
19.09.2005		A-Bach-oh Tennishalle	SK	10	k.l.	pos.
19.09.2005		Oedter-Teich	SK	12	k.l.	neg.
26.09.2005		Brandlhof-Teich	SK	10	k.l.	neg.
	Oberösterreich					
	Freistadt					
27.08.2004		Stampfenbach	SK	19	neg.	
	Niederösterreich					
	Sietzenberg					
11.06.2004		Schlossteich	EK	1	neg	
	Bruck/Leitha					
11.10.2004		Leitha-Kanal	SK	20	neg	
	Burgenland					
	Königsdorf					
09.06.2004		Limbach	SK	1	neg	
	Königsdorf					
27.09.2004		Rittschein	SK	2	neg	
	Königsdorf-Heiligenkreuz					
26.09.2004		Untere Lafnitz	SK	8	neg	
	Hagensdorf oh Ara					
09.06.2004		Strem	SK	1	neg	
	Dt. Bieling					
09.06.2004		Teiche Dt. Bieling	SK	7	neg	
	oh Hammer					
14.07.2004		Vogelsang/Großb.	SK	22	neg	
	Weißbachel-Günseck					
15.07.2004		Grusaubach	SK	MP		
	oh Weißbachel					
15.07.2006		Steindlgraben	SK	MP 8	neg	
	oh Lockenhaus					
15.07.2006		Roter Graben	SK	MP		

	Günseck						
27.07.2006		Güns	SK	5		neg	
31.08.2004		Schirmitzbach	SK	1		neg	
	Güns						
27.08.2004		Weißbach	SK	13		neg	
	Hammerteich						
19.08.2004		Schweingraben	SK	9		neg	
16.08.2004		Güns-Fluss	SK	2		neg	
09.08.2004		Teich OL Güns	SK	6		neg	
29.07.2004		Ganaubach	SK	9		pos.	
	Zöbern						
15.07.2004		Zöbern-Bach	SK	4		pos.	
	oh Schlaining						
18.07.2004		Tauchenbach	SK	2		neg	
	Welgersdorf						
03.08.2005		Tauchenbach	SK	2		k.l.	pos.
	Dornau						
03.08.2005		Tauchenbach	SK	3		k.l.	neg.
	Großpetersdorf						
03.08.2005		Tauchenbach	SK	4		k.l.	pos.
	Riedlingsdorf						
08.08.2005		Pinka-OL	SK	2		k.l.	pos.
	Oberwart						
12.08.2005		Zichenbach/Tschabach	SK	7 (15)		k.l.	pos.
	Eisenzicken						
14.08.2005		Zickenbach	SK	3		k.l.	neg.
	Blumau						
16.09.2005		Rabnitz-OL	SK	7 (12)		k.l.	pos.
	Ungarn						
	Körmend bis Mündung in die Raab						
14.09.2005		Pinka-UL	SK	2		k.l.	pos.
	Kärnten						
	Velden						
08.06.2005		Bäckerteich	EK	1(4)		k.l.	pos.
	Wien						
	21. Bezirk						
20.10.2004		Donauauen	GSK	1		neg.	

Legende

EK...Edelkrebs
 SK...Signalkrebs
 KK...Kamberkrebs
 GSK...Galizischer Sumpfkrebs
 k.l.....keine Inkubation
 neg....negativ
 pos....positiv
 MP...Mischprobe (Steindlgraben, Roter-Graben, Grusaubach)

*Zeitangaben sind nicht chronologisch geordnet;
 Gewässernamen sind Angaben des jeweiligen Proben-Einsenders*

**UNTERSUCHUNG AUTOCHTHONER UND ALLOCHTHONER KREBSARTEN
HEIMISCHER GEWÄSSER AUF PILZINFEKTIONEN
UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG VON *APHANOMYCES ASTACI*;
KLASSIFIZIERUNG DES ERREGERS MITTELS MODERNER
MOLEKULARBIOLOGISCHER METHODEN**

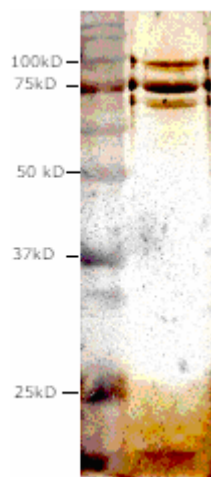
PROTEIN - TEIL

Unser Projekt, die Diagnose von *A. astaci* mittels PCR, bezieht sich auch auf eine Teilsequenz der putativen Chitinase AaChi1 (AJ416354 bzw. CAC95177) von *A. astaci*. Zur Evaluierung, ob es sich bei dieser Sequenz um die eines real existierenden Proteins handelt, untersuchten wir den Organismus auch mit biochemischen Methoden.

Im Zuge unserer Analysen haben wir uns auch mit der Frage beschäftigt, ob die Chitinase AaChi1 von *A. astaci* für ein wesentliches Unterscheidungsmerkmal zu anderen Arten, nämlich der konstitutiven und somit vom Vorhandensein von Chitin unabhängigen Expression von Chitin abbauenden extrazellulären Enzymen, verantwortlich ist.

A. Chitinbindende Eigenschaften extrazellulärer Proteine von *A. astaci*

Extrazelluläre Proteine wurden auf ihre chitinbindende Eigenschaft mittels Inkubation mit Chitinbeads und anschließender Elution mit SDS-Puffer untersucht (Abb.21). Dabei konnten einige Proteinbanden (100 kD, 70 kD, 65 kD) mit chitinbindenden Eigenschaften ermittelt werden.



M . Hö

Abb.21
Chitinbindende,
extrazelluläre Proteine
von *A. astaci* (**M:**
Marker; Hö: *A. astaci*
Kultur des Stammes
Hö)

Weitere Analysen ergaben, dass sowohl die 70 kD als auch die 65 kD Proteine schwächer bindend sind als die 100 kD Bande und sich mit erhöhter Salzkonzentration von Chitin lösen lassen, während die 100 kD Bande nur unter denaturierenden Bedingungen zu eluieren war.

B. Antikörperproduktion gegen Chitinase AaCh1 mittels sequenzspezifischer Peptide

Zur Detektion des zur AaCh1 gehörenden Proteins wurde die Strategie der Produktion von Antikörper gegen spezifische Sequenzabschnitte gewählt. Ausgangspunkt war eine detaillierte Analyse der publizierten Teilsequenz der putativen Chitinase AaChi1, um mögliche antigen wirkende Sequenzabschnitte identifizieren zu können. AaChi1 ließ dabei nur eine teilweise Sequenz-Homologie zu anderen Chitinase-Enzymen der Familie 18 erkennen. Im speziellen fehlte eine N-terminale Übereinstimmung in den ersten beiden der für die Struktur wichtigen acht β -Faltblätter. Ebenso fehlte eine Sequenzhomologie für das achte β -Faltblatt. Es war daher nur möglich, eine Fragment-Struktur eines Chitinase-Enzyms der Familie 18 mittels Homology-Modellings darzustellen. Von den sonst für TIM-Barrel Proteine, wie den Chitinase 18-Enzymen, so signifikanten 8 β -Faltblättern waren somit nur 5 darzustellen. Für das Peptid-Design konzentrierten wir uns daher auf diesen signifikanten und verifizierbaren Sequenzbereich. Folgende Sequenzabschnitte wurden als Peptide für die anschließende Antikörper-Produktion ausgesucht:

1. Peptid 1: DEFKTLPWKAE (aa 254 – 265)
2. Peptid 2: LYEDPNHPPGAKY (aa 312 – 324)

Beide Sequenzabschnitte entsprechen außerhalb liegenden und damit für Antikörper leicht zugänglichen Proteinregionen. Beide Sequenzen sollten für *A. astaci* spezifisch genug sein, um die Möglichkeit von Kreuzreaktionen der gewonnen Antikörper mit Chitinasen anderer verwandter Spezies zu minimieren.

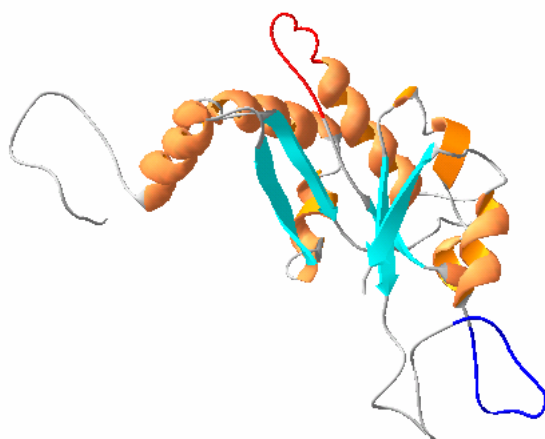


Abb.22 Modell der AaChi1-Chitinase (Hellblau: β -Faltblätter; orange: α -Helices; rot: aa 254 – 265 [Peptid 1]; blau: aa 312 – 324 [Peptid 2])

Die Herstellung von gegen diese Peptide gerichteten Antikörpern ermöglichte die Suche nach dem Enzym mittels Westernblot. Fündig wurden wir im extrazellulären Medium von *A. astaci* Flüssigkulturen. Proteinextrakte von zehn Tage wachsenden *A. astaci* Kulturen zeigten eine 100 kD Doppelbande am Westernblot (Abb.23a).

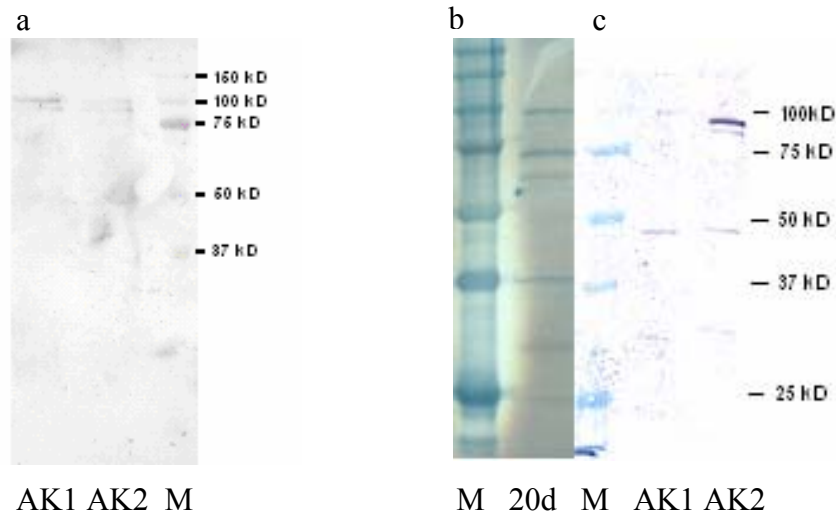


Abb.23 Westernblot mit sequenzspezifischen AK
a: Westernblot 10d alte Kultur, b: SDS-PAGE 20d alte Kultur, c: Westernblot 20d alte Kultur AK1:Antikörper gegen Peptid 1 gerichtet; AK2: Antikörper gegen Peptid 2 gerichtet

Ältere Kulturen wiesen mehrere detektierbare Banden auf (Abb.23c): Neben der wieder deutlich sichtbaren 100 kD Doppelbande noch eine 45 kD und eine 30 kD Bande. Weiters zeigte sich eine stark Chitin-bindende Eigenschaft für das der 100 kD Doppel-Bande entsprechende Protein.

Zusammenfassend ergibt sich folgendes Bild:

Das 100 kD Protein zeigt:

1. starke chitinbindende Eigenschaften, und
2. wird von beiden gegen die AaChi1-Sequenz designten Antikörper am Westernblot erkannt

C. Vergleich AaChi1- Sequenz mit neu gewonnener vollständiger Sequenzinformation von *A. astaci*-Chitinase

Die von uns ermittelte Chitinase-Sequenz zeigt nun sehr große Homologien zu der Teilsequenz AaChi1. Auffallend ist dabei die weit höhere Analogie im DNA-Bereich als auf Protein-Ebene. Zusätzlich zeigt die neue Sequenz über den gesamten, für die katalytische Glykosyl-Hydrolase-Domäne codierenden Bereich eine hohe Homologie zu anderen verwandten Chitinasen auf. So sind alle strukturgebenden acht β -Faltblattmotive eindeutig identifizierbar. Auch war mit dieser Sequenz das Homology-Modelling deutlich erfolgreicher (Abb.24). Alle strukturrelevanten Bereiche waren vorhanden und die Darstellung einer vollständigen Glykosylhydrolase Domäne im Modell möglich. Auch die Zuordnung zu der Klasse V dieser Chitinasen aufgrund der Existenz einer zwischen dem siebenten und achten β -Faltblatt eingeschobenen α + β -Domäne konnte gemacht werden.

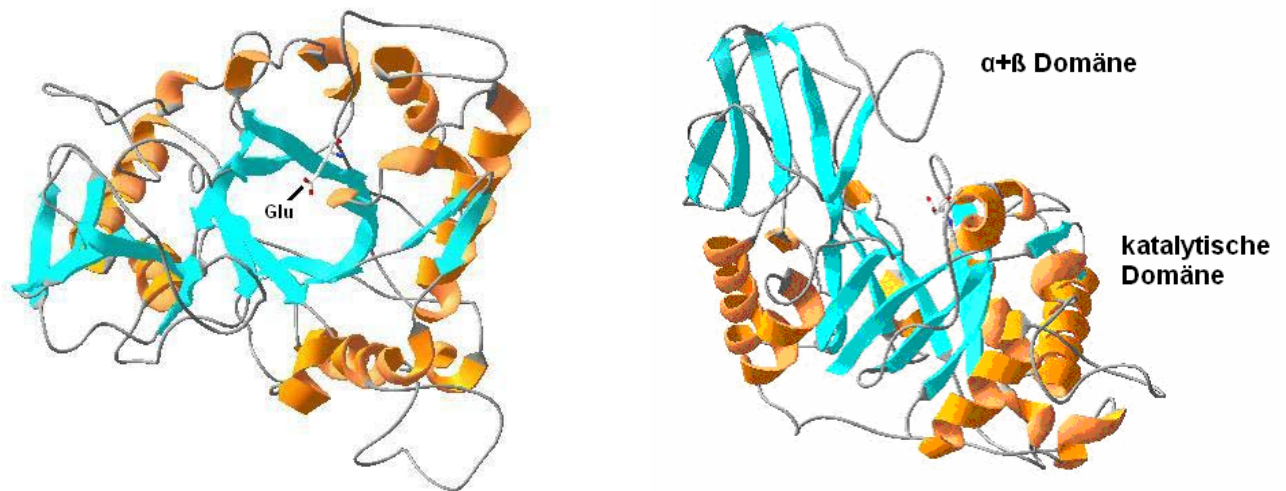


Abb.24 Strukturmodell der Glykosyl-Hydrolase-Domäne der *A. astaci* Chitinase (Hellblau: β -Faltblätter; orange: α -Helices; Glu: Für katalytische Aktivität essentielle Glutaminsäure im katalytischen Zentrum des Enzyms)

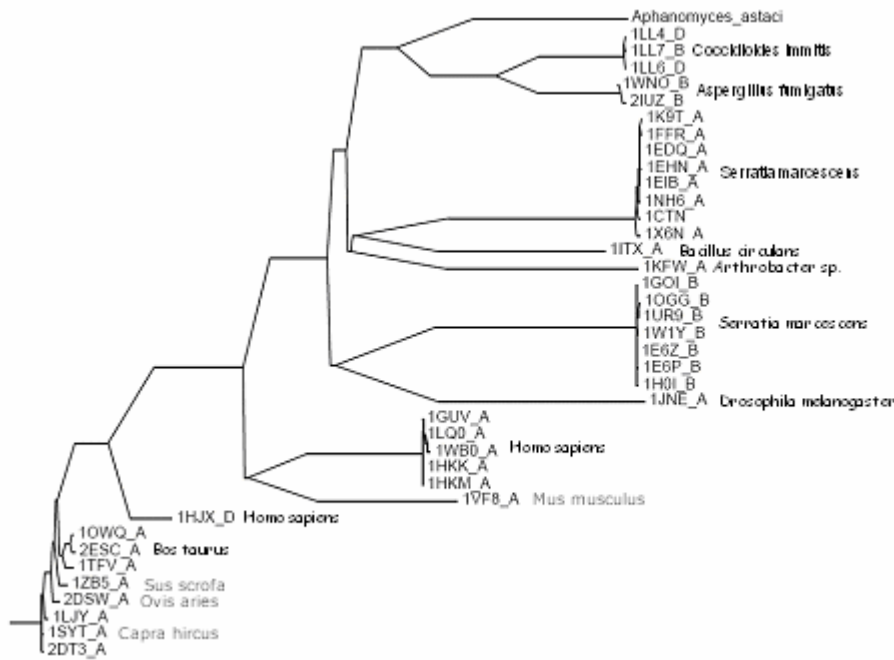


Abb.25 Stammbaum bekannter Strukturen von Chitinasen der Familie 18

Genauere Analysen der Sequenzinformationen zeigten, dass einige zusätzliche Basen im AaChi1-Gen für einen Frame-shift und die daher folgende Inhomologie im Aminosäurealignment verantwortlich zeichnet. Mögliche Erklärungen dafür wären, neben Sequenzierungsfehlern, stamm- beziehungsweise speziesspezifische Mutationen oder Genvariationen.

Auffallend ist jedenfalls eine leichte Sequenzvariation genau an der Stelle, die für das Design des Peptides 2 gewählt wurde (Abb.6).

AaChi1	L	Y	E	D	P	N	H	P	P	G	A	K	Y
Chitinase	L	Y	E	D	P	N	H	P	G	A	V	K	H

Abb.26 Sequenzvergleich zwischen AaChi1 und Chitinase

Aufgrund der Tatsache, dass als Epitop wirkende Strukturen nur die Größe von etwa vier Aminosäurenreste aufweisen, ist die wechselweise Erkennung der auf beide Sequenzen beruhenden Strukturelementen mittels der gewonnen Antikörper aber gegeben.

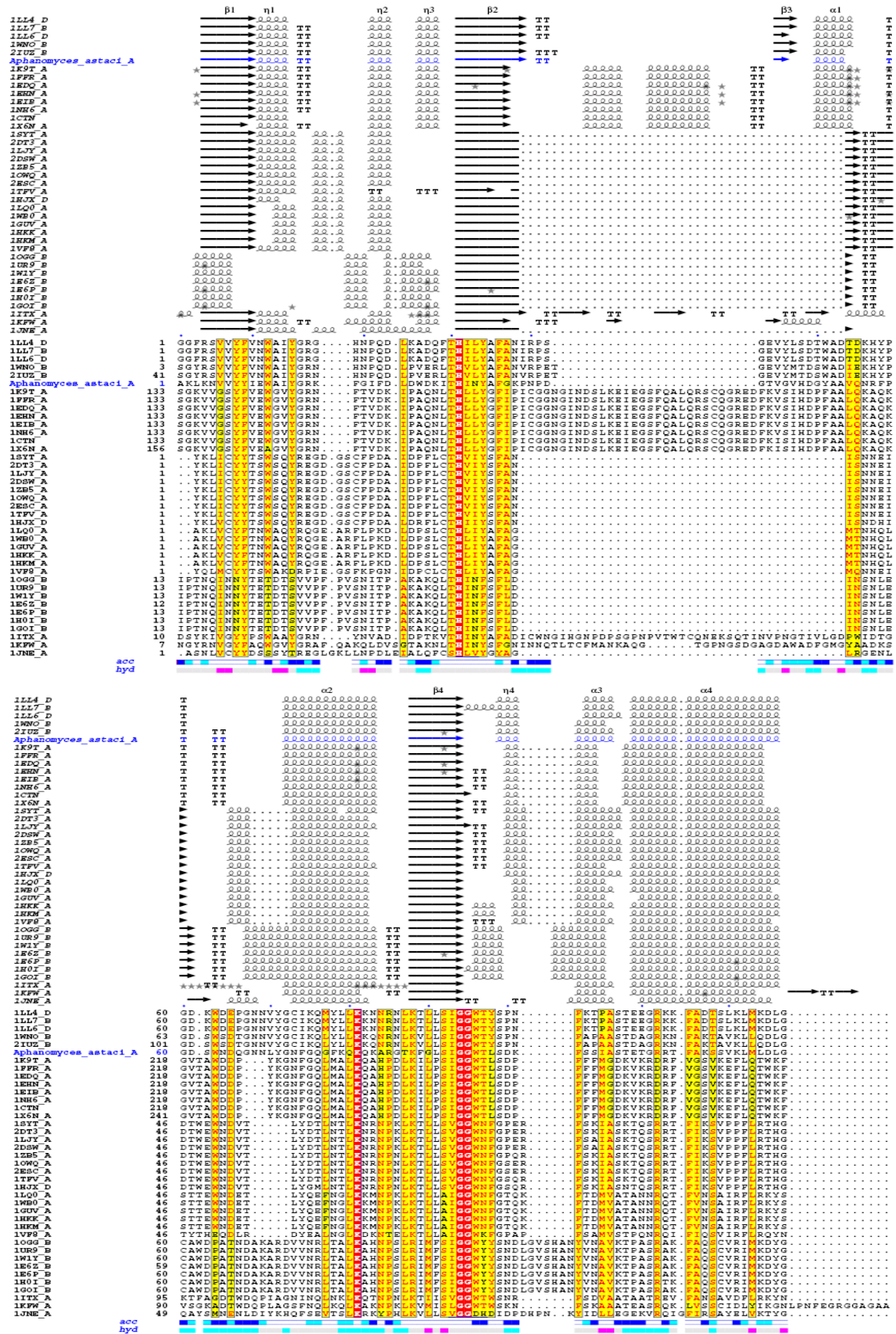


Abb.27 Struktur- und Sequenz-Alignment der *A. astaci* Chitinase mit verwandten Chitinase-Strukturen

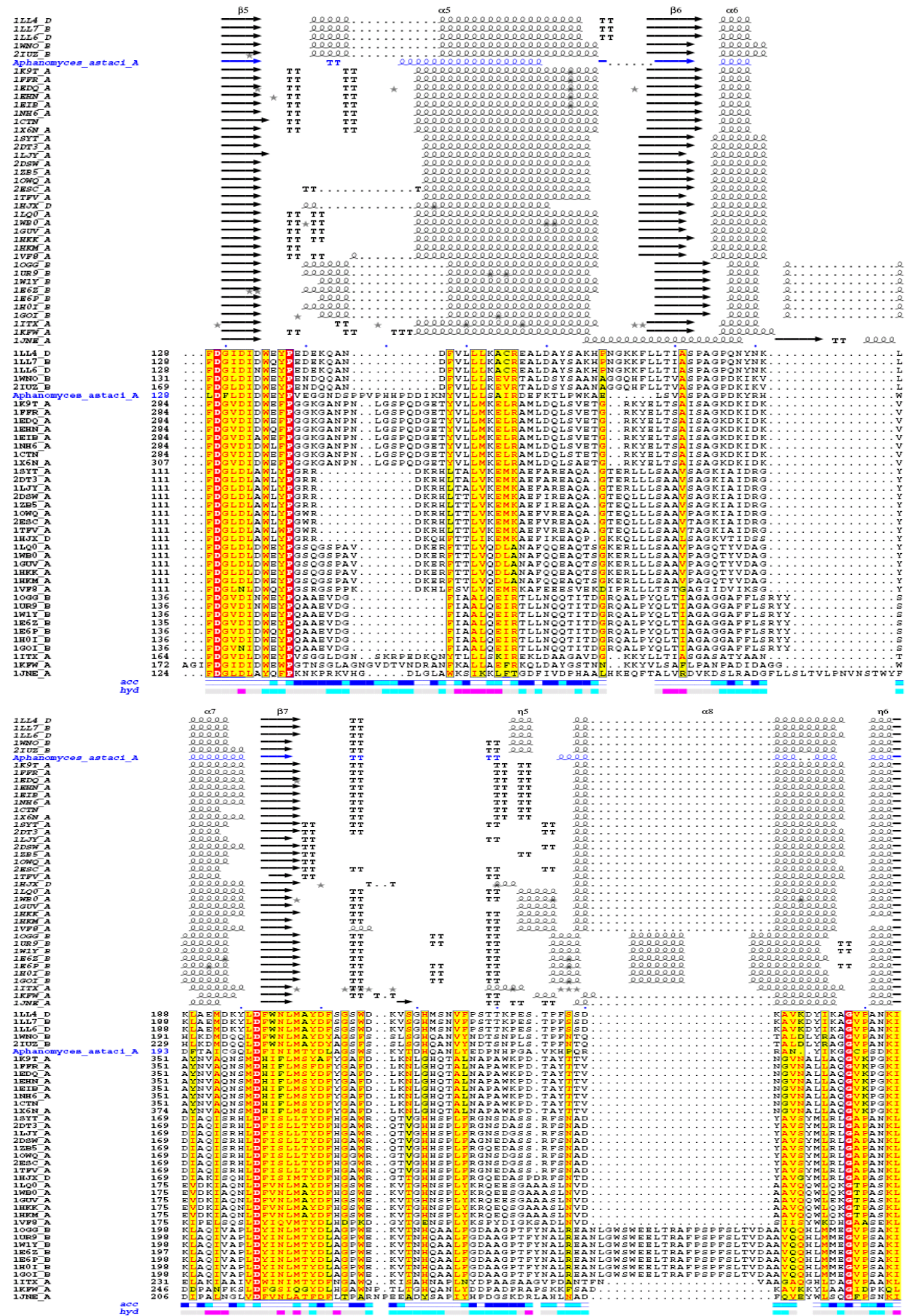


Abb.27 Struktur- und Sequenz-Alignment der *A. astaci* Chitinase mit verwandten Chitinase-Strukturen

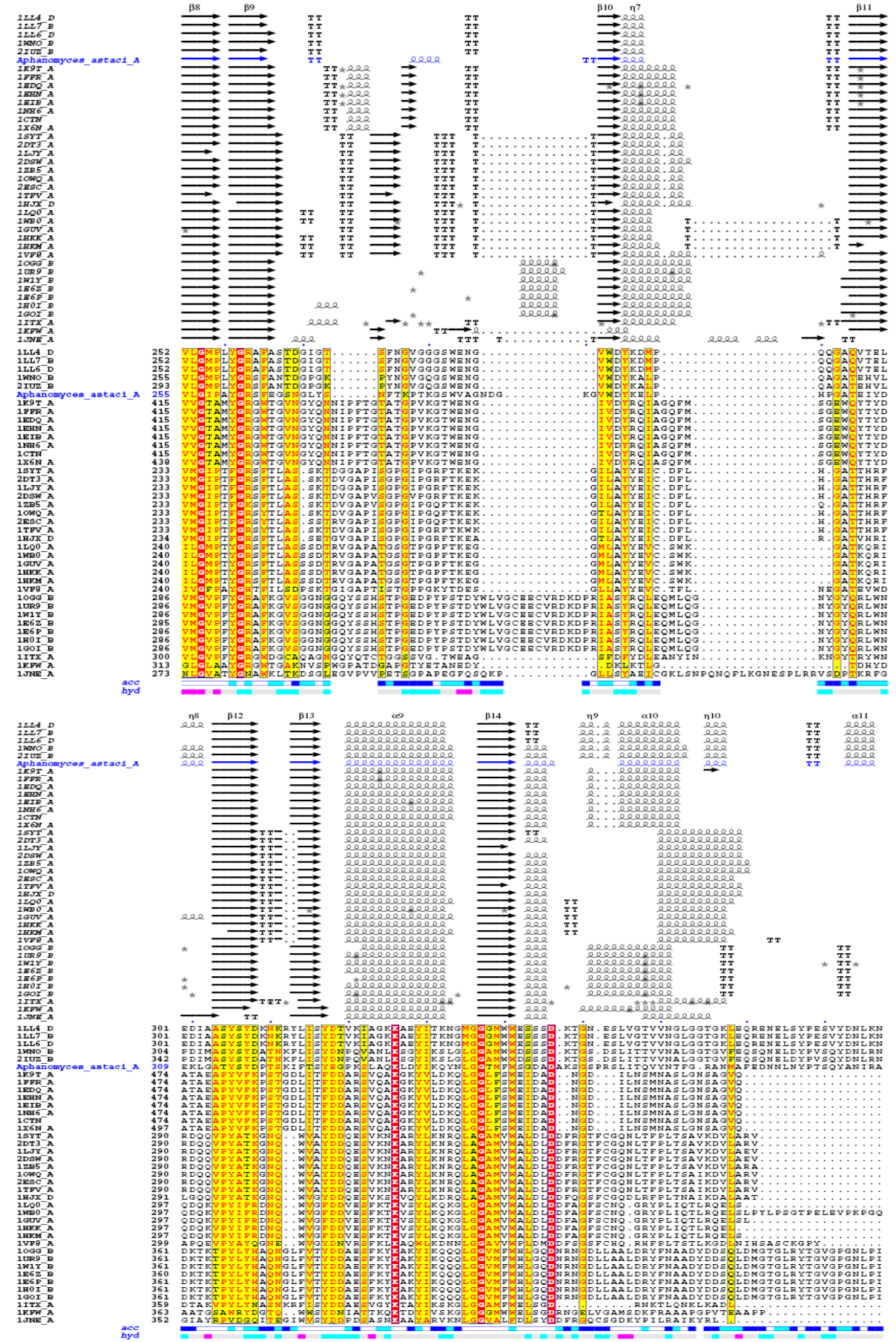


Abb.27 Struktur- und Sequenz-Alignment der *A. astaci* Chitinase mit verwandten Chitinase-Strukturen

Es liegt hiermit erstmals eine vollständige Sequenzinformation über ein Chitinasegen bei *Aphanomyces astaci* vor. Die codierende Sequenz lässt sich dabei in vier Abschnitte einteilen:

1. **Signalpeptid:** Die Identifizierung eines N-terminal gelegenen Signalpeptides lässt als Bestimmungs- und Wirkungsort für diese Chitinase den extrazellulären Bereich erwarten.
2. **Die katalytische Domäne:** Sie kann der Familie der Glykosyl-Hydrolasen Familie 18 Klasse V zugeordnet werden. Sie zeigt eine hohe phylogenetische Nahebeziehung zu Chitinasen Echter Pilze wie *Aspergillus* und *Trichoderma*. Augenscheinlich ist dabei auch die gute Konservierung in wichtigen strukturgebenden Sequenzabschnitten, im Besonderen in den Bereichen, die den für diese Chitinase-Familie charakteristischen acht β -Faltblättern entsprechen. Das Vorkommen der für die enzymatische Aktivität nötigen Glutaminsäure im aktiven Zentrum des Proteins erlaubt es, seine tatsächliche katalytische Funktionstüchtigkeit als Chitin-spaltendes Enzym zu vermuten.
3. **S-T Domäne:** Der katalytischen Domäne folgt eine Region mit auffallender Homologie zu Chitinasen einiger Insekten wie z.B. *Bombyx mori* (PEST-Domäne). Sie könnte einen Ort möglicher O-Glykosylierungen darstellen, wie er in diesen verwandten Chitinasen postuliert und beobachtet wird. (Abdel-Banat et al. 2001)
4. **Chitinbindende Domäne** Am Ende der codierenden Sequenz liegt eine potentielle chitinbindenden Domäne.

Folgende Punkte sprechen nun für eine Nahebeziehung der neu gefundenen, vollständigen Sequenz dieser Chitinase mit der gefundenen 100 kD Bande:

- Die Anfärbung am Westernblot mit 2 sequenzspezifischen Antikörpern
- Der extrazelluläre Bereich als Identifizierungsort korreliert mit dem Vorhandensein eines Signalpeptids bei der Chitinase
- Die chitinbindenden Eigenschaften und die postulierte chitinbindende Domäne der Chitinase
- Das hohe Molekulargewicht kann durch mögliche Glykosylierungen speziell in der S-T Domäne erklärt werden

D. Isolierung und Charakterisierung anderer chitinolytischer Enzyme von *A. astaci*

Weitere an Chitin bindende Proteine in der Größenordnung von 70 kD und 65 kD konnten mittels Affinitätschromatographie an Chitinbeads isoliert und charakterisiert werden. Ihre enzymatische Aktivität wurde an verschiedenen Substraten untersucht. So spalten beide das Dimer von N-Acetylglucosamin (Chitobiose) zum Monomer (Abb.30, 31), sowie die künstlichen Substrate 4-Methylumbelliferyl-N-Acetyl- β -D-Galactosamin, 4-Methylumbelliferyl-N-Acetyl- β -D-Glucosamin und 4-Methylumbelliferyl- β -D-N,N',N''-triacetylchitotrioside (Abb.32). Beide verfügen somit über eine N-Acetylglucosaminidase- und eine leichte N-Acetylgalactosaminidase-Aktivität und sind somit als N-Acetylhexosaminidasen bezeichnerbar.

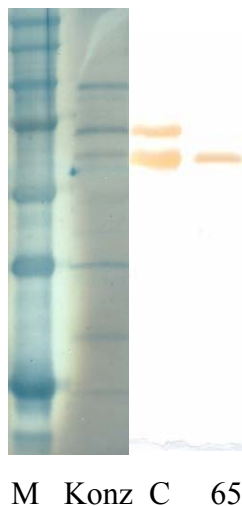


Abb.28 SDS-PAGE des isolierten 65 kD Proteins M: Marker, Konz: extrazelluläres Konzentrat, C: Chitinolytisch aktive Proteine (70 und 65 kDa), 65: isoliertes 65 kD Protein



Abb.29 SDS-PAGE des isolierten 70 kD Proteins M: Marker, 70: isoliertes 70 kD Protein

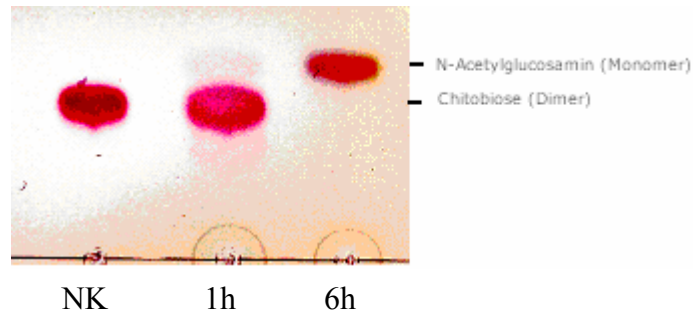
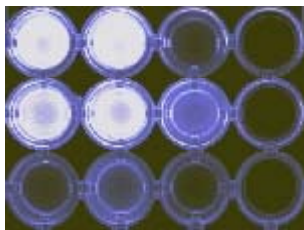


Abb.30 Dünnschichtchromatographische Überprüfung der enzymatischen Aktivität des 70 kD Proteins. NK: Nullkontrolle (Chitobiose); 1h: Nach einstündiger Inkubation von Chitobiose mit 70 kD Protein; 6h: Nach sechsständiger Inkubation von Chitobiose mit 70 kD Protein



Abb.31 DC-Überprüfung der enzymatischen Aktivität des 65 kD Proteins
1h: Nach einstündiger Inkubation von Chitobiose mit 65 kD Protein



Substrat: 4-Methylumbelliferyl-β-D-*N,N',N''*-triacetylchitotrioside

Substrat: 4-Methylumbelliferyl-N-Acetyl-β-D-Glucosamin

Substrat: 4-Methylumbelliferyl-N-Acetyl-β-D-Galactosamin

65 70 70v NK

Abb.32 Überprüfung der enzymatischen Aktivität der 65 kD und 70kD Proteine mit synthetischen Substraten (Obere Reihe: Als Substrat diente 4-Methylumbelliferyl-β-D-*N,N',N''*-triacetylchitotrioside, Mittlere Reihe: Als Substrat diente 4-Methylumbelliferyl-N-Acetyl-β-D-Glucosamin, Untere Reihe: Als Substrat diente 4-Methylumbelliferyl-N-Acetyl-β-D-Galactosamin; 65: Reaktion mit 65 kD Protein, 70: Reaktion mit 70 kD Protein, 70v Reaktion mit 70 kD Protein 1:10 verdünnt)

Neben der gleichen Substratspezifität verfügen beide Proteine über gleiche pH- und Temperaturmaxima ihrer Aktivität. Sie verhalten sich auch identisch bei verschiedenen chromatographischen Trennungsversuchen (kationische und anionische Ionenaustauschchromatographie, Hydrophobic interaction chromatography und Hydroxylapatit-Chromatographie). Einzig in der unterschiedlich starken Bindung an Chitin

konnte ein Unterschied festgestellt werden. So bindet das 70 kD Protein entschieden stärker an Chitin und kann erst mit höheren Salzkonzentrationen eluiert werden.

Zur weiteren Identifizierung wurden beide Proteinbanden N-terminal nach Edman sequenziert. Hier ergab nur die Sequenzierung der 70 kD Bande ein Resultat mit einer klaren Sequenz. Die Suche nach Homologien zu bekannten Sequenzen ergab jedoch keine ausreichend signifikante Ähnlichkeit zu irgendwelchen bekannten Proteinsequenzen. Die Analyse anderer Organismen mit chitinolytisch aktiven Enzymen zeigt jedoch, dass vor allem Proteine der Glykosyl-Hydrolase Familie Typ 20 solche Chitobiase-Aktivitäten übernehmen.

E. ELISA-Entwicklung zur Detektion von *A. astaci*

Da die beiden gefundenen N-Acetylhexosaminidasen die am stärksten exprimierten extrazellulären Proteine darstellen und gleichzeitig die nicht Chitin induzierte, extrazelluläre chitinolytische Aktivität von *A. astaci* als Identifikationskriterium gilt, planen wir die Entwicklung eines ELISA-Testverfahrens zur Detektion von *A. astaci* mittels Einsatzes von Antikörpern, die gegen diese Proteine gerichtet sind.

Da die Bewilligung des Tierversuchsantrags für die Fortführung des Projektes unumgänglich war, konnte mit der Produktion der Antikörper nach dessen Genehmigung am 21. Juni 2006, der Lieferung der Kaninchen am 21. Juli 2006 und einer einwöchigen Adaptierungszeit am 28. Juli 2006 begonnen werden. Die Gewinnung der Antikörper aus den Seren startete somit erst am 2. Oktober.

Anhang

DNA-Sequenzen/Aminosäure-Sequenzen

Chitinase

Aphanomyces astaci Stämme :

Substrate binding site I (xxxxxxxLSIGGWT), catalytic domain (21xDIDWEYP), Substrate binding site II partial (LDFINIMTYDLAAGSWS)

Yx (Schwedisches Isolat)

GACTCGTGGAACGACCAAGGCAACAGCTTGTACGGCAACTTTGGCCAAGGGTTC
AAGCAAAGCAAAGGCTCGCGGCACCAAGTTCGGTCTGTCCATTGGCGGGTGG
ACGTTGAGCGACCAGTTCAGCTCCATCGCGAGCACGGAAACAGGCCGCCGCACG
TTTGCCAAGAGCTCGGTGAAGCTCATGCTGGACCTGGGGTTGGACTTTCTTGACA
TTGACTGGGAGTACCCCGTGGAAGGAGGCAACGACTCGCCCCCGGTCCCCCATCG
CCCCGACGACATCAAGAACTACGTGTTGCTGCTGAGCGCGATCCGCGACGAGTTC
AAGACGCTGCCGTGGAAGGCCGAGTTGAGCGTGGCGTCCCCCGCCGGCCCGGAC
AACTACCGCCACTGGGACTTTACCGCCATCTGCGGCCAATTGGACTTTATCAACA
TCATGACGTACGAC

D S W N D Q G N S L Y G N F G Q G F K Q K Q K A R G T K F G L
S I G G W T L S D Q F S S I A S T E T G R R T F A K S S V K L M
L D L G L D F L D I D W E Y P V E G G N D S P P V P H R P D D I
K N Y V L L L S A I R D E F K T L P W K A E L S V A S P A G P D
N Y R H W D F T A I C G Q L D F I N I M T Y D

PC (Schwedisches Isolat)

GACTCGTGGAATGACCAAGGCAACAGCTTGTACGGCAACTTTGGCCAAGGGTTCA
AGCAAAGCAAAGGCTCGCGGCACCAAGTTCGGTCTGTCCATTGGCGGGTGGGA
CGTTGAGCGACCAGTTCAGCTCCATCGCGAGCACGGAAACAGGCCGCCGCACGTT
TGCCAAGAGCTCGGTGAAGCTCATGCTGGACCTGGGGTTGGACTTTCTCGACATT
GACTGGGAGTACCCCGTGGAAGGCCGCAACGACTCGCCCCCGGTCCCCCATCGCC
CCGACGACATCAAGAACTACGTGTTGCTGCTGAGCGCGATCCGCGACGAGTTCAA
GACGCTGCCGTGGAAGGCCGAGTTGAGCGTGGCGTCCCCCGCCGGCCCGGACAA
CTACCGCCACTGGGACTTTACCGCCATCTGCGGCCAATTGGACTTTATCAACATC
ATGACGTACGACTTGGCGGGCA

D S W N D Q G N S L Y G N F G Q G F K Q K Q K A R G T K F G L
S I G G W T L S D Q F S S I A S T E T G R R T F A K S S V K L M
L D L G L D F L D I D W E Y P V E G G N D S P P V P H R P D D I
K N Y V L L L S A I R D E F K T L P W K A E L S V A S P A G P D
N Y R H W D F T A I C G Q L D F I N I M T Y D L A G

SV (Schwedisches Isolat)

GACTCGTGGAATGACCAAGGCAACAGCTTGTACGGCAACTTTGGCCAAGGGTTCA
AGCAAAAGCAAAAGGCTCGCGGCACCAAGTTCGGTCTGTCCATTGGCGGGTGGGA
CGTTGAGCGACCAGTTCAGCTCCATCGCGAGCACGGAAACAGGCCGCCGCACGTT
TGCCAAGAGCTCGGTGAAGCTCATGCTGGACCTGGGGTTGGACTTTCTTGACATT
GACTGGGAGTACCCCGTGGAAGGCGGCAACGACTCGCCCCCGGTCCCCCATCGCC
CCGACGACATCAAGAACTACGTGTTGCTGCTGAGCGCGATCCGCGACGAGTTCAA
GACGCTGCCGTGGAAGGCCGAGTTGAGCGTGGCGTCCCCCGCCGGTCCGGACAA
CTACCGCCACTGGGACTTTACCGCCATCTGCGGCCAATTGGACTTTATCAACATC

**D S W N D Q G N S L Y G N F G Q G F K Q K Q K A R G T K F G L
S I G G W T L S D Q F S S I A S T E T G R R T F A K S S V K L M
L D L G L D F L D I D W E Y P V E G G N D S P P V P H R P D D I
K N Y V L L L S A I R D E F K T L P W K A E L S V A S P A G P D
N Y R H W D F T A I C G Q L D F I N I**

Ti (Schwedisches Isolat)

TGGAACGACCAAGGCAACAGCTTGTACGGCAACTTTGGCCAAGGGTTCAAGCAA
AAGCAAAAGGCTCGCGGCACCAAGTTCGGTCTGTCCATTGGCGGGTGGACGTTGA
GCGACCAGTTCAGCTCCATCGCGAGCACGAAACAGGCCGCCGCACGTTTGCCAA
GAGCTCGGTGAAGCTCATGCTGGACCTGGGGTTGGACTTTCTTGACATTGACTGG
GAGTACCCCGTGGAAGGAGGCAACGACTCGCCCCCGGTCCCCCATCGCCCCGAC
GACATCAAGAACTACGTGTTGCTGCTGAGCGCGATCCGCGACGAGTTCAAGACGC
TGCCGTGGAAGGCCGAGTTGAGCGTGGCGTCCCCCGCCGGCCCGGACAACACTACC
GCCACTGGGACTTTACCGCCATCTGCGGCCAATTGGACTTTATCAACATCATGAC
GTACGACTTGGCGG

**W N D Q G N S L Y G N F G Q G F K Q K Q K A R G T K F G L S I
G G W T L S D Q F S S I A S T E T G R R T F A K S S V K L M L D
L G L D F L D I D W E Y P V E G G N D S P P V P H R P D D I K N
Y V L L L S A I R D E F K T L P W K A E L S V A S P A G P D N Y
R H W D F T A I C G Q L D F I N I M T Y D L A**

Ra (aus Schweden erhalten)

GACTCGTGGAATGACCAAGGCAACAGCTTGTACGGCAACTTTGGCCAAGGGTTCA
AGCAAAAGCAAAAGGCTCGCGGCACCAAGTTCGGTCTGTCCATTGGCGGGTGGGA
CGTTGAGCGACCAGTTCAGCTCCATCGCGAGCACGGAAACAGGCCGCCGCACGTT
TGCCAAGAGCTCGGTGAAGCTCATGCTGGACCTGGGGTTGGACTTTCTCGACATT
GACTGGGAGTACCCCGTGGAAGGAGGCAACGACTCGCCCCCGGTCCCCCATCGC
CCCGACGACATCAAGAACTACGTGTTGCTGCTGAGCGCGATCCGCGACGAGTTCA
AGGCGCTGCCGTGGAAGGCCGAGTTGAGCGTGGCGTCCCCCGCCGGCCCGGACA
ACTACCGCCACTGGGACTTTACCGCCATCTGCGGCCAATTGGACTTTATGAA

**D S W N D Q G N S L Y G N F G Q G F K Q K Q K A R G T K F G L
S I G G W T L S D Q F S S I A S T E T G R R T F A K S S V K L M
L D L G L D F L D I D W E Y P V E G G N D S P P V P H R P D D I
K N Y V L L L S A I R D E F K A L P W K A E L S V A S P A G P D
N Y R H W D F T A I C G Q L D F M**

L1 (Schwedisches Isolat)

TGGAATGACCAAGGCAACAGCTTGTACGGCAACTTTGGCCAAGGGTTCAAGCAA
AAGCAAAAGGCTCGCGGCACCAAGTTCGGTCTGTCCATTGGCGGGTGGACGTTGA
GCGACCAGTTCAGCTCCATCGCGAGCACGGAAACAGGCCGCCGCACGTTTGCCA
AGAGCTCGGTGAAGCTCATGCTGGACCTGGGGTTGGACTTTCTCGACATTGACTG
GGAGTACCCCGTGGAAGGCGGCAACGACTCGCCCCCGGTCCCCCATCGCCCCGAC
GACATCAAGAACTACGTGTTGCTGCTGAGCGCGATCCGCGACGAGTTCAAGACGC
TGCCGTGGAAGGCCGAGTTGAGCGTGGCGTCCCCCGCCGGTCCGGACAACACTACCG
CCTACTGGGACTTTACCGCCATCTGCGGCCAATTGGACTTTATCAACATCATGACG
TACGACTAGG

W N D Q G N S L Y G N F G Q G F K Q K Q K A R G T K F G L S I
G G W T L S D Q F S S I A S T E T G R R T F A K S S V K L M L D
L G L D F L D I D W E Y P V E G G N D S P P V P H R P D D I K N
Y V L L L S A I R D E F K T L P W K A E L S V A S P A G P D N Y
R H W D F T A I C G Q L D F I N I M T Y D

Kv (Schwedisches Isolat)

TCGTGGAATGACCAAGGCAACAGCTTGTACGGCAACTTTGGCCAAGGGTTCAAGC
AAAAGCAAAAGGCTCGCGGCACCAAGTTCGGTCTGTCCATTGGCGGGTGGACGTT
GAGCGACCAGTTCAGCTCCATCGCGAGCACGGAAACAGGCCGCCGCACGTTTGC
CAAGAGCTCGGTGAAGCTCATGCTGGACCTGGGGTTGGACTTTCTCGACATTGAC
TGGGAGTACCCCGTGGAAGGCGGCAACGACTCGCCCCCGGTCCCCCATCGCCCCG
ACGACATCAAGAACTACGTGTTGCTGCTGAGCGCGATCCGCGACGAGTTCAAGAC
GCTGCCGTGGAAGGCCGAGTTGAGCGTGGCGTCCCCCGCCGGTCCGGACAACACTAC
CGCCACTGGGACTTTACCGCCATCTGCGGCCAATTGGACTTTATCAACTACATAC
G

S W N D Q G N S L Y G N F G Q G F K Q K Q K A R G T K F G L S
I G G W T L S D Q F S S I A S T E T G R R T F A K S S V K L M L
D L G L D F L D I D W E Y P V E G G N D S P P V P H R P D D I K
N Y V L L L S A I R D E F K T L P W K A E L S V A S P A G P D N
Y R H W D F T A I C G Q L D F I N Y I

Gb04 (österreichisches Isolat; Burgenland; Signalkrebs)

GACTCGTGGAACGACCAAGGCAACAGCTTGTACGGCAACTTTGGTCAAGGGTTCA
AGCAAAAGCAAAAGGCTCGCGGCACCAAGTTCGGTCTGTCCATTGGCGGGTGGGA
CGTTGAGCGACAAGTTCAGCTCCATCGCGAGCACAGAAACAGGCCGCCGCACGT
TTGCCAAGAGCTCGGTGAAGCTCATGCTGGACCTGGGGTTGGACTTTCTTGACAT
TGACTGGGAGTACCCCGTGGAAGGAGGCAACGACTCGCCCCCGGTCCCCCATCGC
CCCGACGACATCAAGAACTACGTGTTGCTGCTGAGCGCGATCCGCGACGAGTTCA
AGACGCTGCCGTGGAAGGCCGAGTTGAGCGTGGCGTCCCCCGCCGGCCCGGACA
ACTACCGCCACTGGGACTTTACCGCCATCTGCGGCCAATTGGACTTTATCAACAT
CATGACGTACGACTTGGCGGGCACT

D S W N D Q G N S L Y G N F G Q G F K Q K Q K A R G T K F G L
S I G G W T L S D K F S S I A S T E T G R R T F A K S S V K L M
L D L G L D F L D I D W E Y P V E G G N D S P P V P H R P D D I

**K N Y V L L L S A I R D E F K T L P W K A E L S V A S P A G P D
N Y R H W D F T A I C G Q L D F I N I M T Y D L A G**

andere pathogene Erreger:

***Fusarium solani* (CBS 181.29)**

GATTCTTGGAATGATTCCGGCACCAACCTTTATGGTTGCATGAAGCAGCTCAACC
TCCTCAAGAGGCGCAACCGTAATCTCAAGATCCTCCTCTCAGTCGGAGGATGGAC
CTACAGCAGCAACTTCAAGGCTCCCGCTAGCACCCCGCAGGGTTCGTGACACGTTT
GCCAGAAGCTGTGTGCGACTTGCTCAAGACCCTTGGGTTTGACGGTATCGACATTG
ATTGGGAGTACCCCCAAGATGCAAACGAGGCAAGAAATTATGTGCGAGCTGCTGG
CTGCCGTTCCGCGAGGCCATGGACGCCTATGCCAGACCTTGAGCCGACCTCACCA
CTTTGAGCTCACCGTGGCTTGCCCCGCGGGCGCGCAGAACTTCCAGAAGCTAGAC
GTCCGCGGCATGGACCGGTACCTGGATTTCTGGAACCTCATGGCCA

**D S W N D S G T N L Y G C M K Q L N L L K R R N R N L K I L L
S V G G W T Y S S N F K A P A S T P Q G R D T F A R S C V D L L
K T L G F D G I D I D W E Y P Q D A N E A R N Y V E L L A A V
R Q A M D A Y A Q T L S R P H H F E L T V A C P A G A Q N F Q
K L D V R G M D R Y L D F W N L M A**

***Trichosporon cutaneum* (syn.:*beigelii*;DSM 70675)**

TTCGGGCACGCCAACCAAGATGAAAAAGACGCACCGGCACGCCAAGTTTGGGCTC
TCGATCGGCGGCTGGACGCTCAGCGGTCTCTTTAGCGGCTTTGCGGCGACCGAGA
TGGGCCCGCCGAACATTCGCGTCCAGCGCTGTCCAGCTCATGCTCGACCTTGGCCT
CGATTTTCATCGACATTGACTGGGAGTACCCGGTCGCGGGCGGCAATGCGATTCCG
CACGCACCCGACGATATGGCCAACCTTTGTGTTGCTTCTGCAGGCCATCCGTGACG
CATATGCGTCACTGCCCTTCCCTCGCCGAGCTTAGTGTCGCGTACCCGGCCGGGCC
CGAGAACTACGCGCACTGGGACTTTCCGTCCGTGTGCGGGCTGGTCGACCACGTC
AACTTGATGGCCTACGACTATGCCTG

**F G H A N K M K K T H R H A K F G L S I G G W T L S G L F S G
F A A T E M G R R T F A S S A V Q L M L D L G L D F I D I D W E
Y P V A G G N A I P H A P D D M A N F V L L L Q A I R D A Y A S
L P F L A E L S V A S P A G P E N Y A H W D F P S V C G L V D H
V N L M A Y D Y A W**

Saprolegnia parasitica (CBS 540.67)

GACTCGTGGAACGACGTCGGCAACAACGTATATGGGCAGTTTGGCCATGCCAAC
AAGATGAAGAAGGTCCATCGGCACGCCAAGTTTGGCCTCTCGATCGGTGGCTGGA
CGCTCAGCGGCCTCTTTAGTGGCTTTGCAGCCACCGAGATGGGCCGTCGTACCTTT
GCTTCCAGTGCTGTCCAGCTCATGCTCGACCTTGGCCTCGACTTTATCGATATTGA
TTGGGAGTACCCGGTCTCGGGCGGCAATGCGATTCCGCACTCGCCCGACGACATG
GCCAACTTTGTGCTCTTGCTCCAAGCCCTTCGTGACGCGTACGCGTCGCTGCCGTT
TCTCGCCGAGCTCAGTGTCGCGTCCGCGCCGGGCCCAGAACTACGTCAACTGG
GACTTCCCGTCCGTGTGCGGCCTCGTCGACCACGTCAACTTGATGGCGTACGACC
TCGCGGGCAGCTGG

D S W N D V G N N V Y G Q F G H A N K M K K V H R H A K F G
L S I G G W T L S G L F S G F A A T E M G R R T F A S S A V Q L
M L D L G L D F I D I D W E Y P V S G G N A I P H S P D D M A N
F V L L L Q A L R D A Y A S L P F L A E L S V A S P A G P E N Y
V N W D F P S V C G L V D H V N L M A Y D L A G S W

Wundinfektionpilze (apathogen)

Aphanomyces laevis (CBS 107.52)

GACTCCTGGAACGACCAAGGCAACAACCTCTACGGTAACTTCGGCCAAGGCAAC
AAGCTCAAGAAGCAGTTCCGCGGCACCAAGTTTCGGTCTCTCCATCGGTGGCTGGA
CTCTCAGTGACCAATTCAGCGGCATCGCCAGCACCGAAGCTGGTTCGTCGCAAGTT
CGCCAAGAGCTCCGTTCGACCTCATGTTGGACTTGGGTCTCGACTTCATTGACATC
GACTGGGAGTACCCTGTTGAAGGCGGTAATGACCAACCACAGTACCTCACCGAC
CTGACGACATGAAGAACTTTGTGCTCTGCTCGCCGCCATCCGCGATGAGTTCAA
GCGCGTGCCATTCAAGGCCGAGCTCAGCGTCCGCTCGCCTGCCGGTCCCTGCCAAC
TACCGCCACTGGGACTTCCCTGCTGTCTGCGGCCTCCTCGACCACATCAACATCAT
GACCTACGACTTGCG

D S W N D Q G N N L Y G N F G Q G N K L K K Q F R G T K F G L
S I G G W T L S D Q F S G I A S T E A G R R K F A K S S V D L M
L D L G L D F I D I D W E Y P V E G G N D Q P P V P H R P D D M
K N F V A L L A A I R D E F K R V P F K A E L S V A S P A G P A
N Y R H W D F P A V C G L L D H I N I M T Y D L

Aphanomyces helicoides (CBS 210.82)

GACTCGTGGAACGACCAAGGCAACAACCTCTACGGCAACTTCGGCCAAGGCAAC
AAGCTCAAGAAGCAGTTCCGCGGCACCAAGTTTCGGCCTCTCCATCGGCGGCTGGA
CCCTCAGCGACCAATTCAGCAGCATCGCCAGCACCGACGCTGGCCGCCGCAAGTT
CGCCAAGAGCTCCGTTCGACCTCATGTTGGACTTGGGTCTCGACTTTATCGACATC
GACTGGGAGTACCCTGTGCAAGGTGGCAACGACCAGCCTCCAGTCCCTCACCGCC
CTGACGACATGCAGAACTTTGTGCCCCCTTCCGCGCCATCCGCGACGAGTTCAA
GCGCGTGCCTTTCAAGGCCGAGCTCAGCGTCCGCTCCCCTGCCGGCCCTGCCAAC
TACCGCCACTGGGACTTCCCTGCCGTCTGCGGCCTCCTCGACCACATCAACATCAT
GACCTACGACTTGGCGGGCAGCTGGAG

D S W N D Q G N N L Y G N F G Q G N K L K K Q F R G T K F G L
S I G G W T L S D Q F S S I A S T D A G R R K F A K S S V D L M
L D L G L D F I D I D W E Y P V E G G N D Q P P V P H R P D D M
Q N F V A L L A A I R D E F K R V P F K A E L S V A S P A G P A
N Y R H W D F P A V C G L L D H I N I M T Y D L A G S W

Achlya racemosa (CBS 578.67)

GACTCGTGGAACGACATTGGTAACAACGTGTATGGGCAGTTTGGCCAAGGCAAT
AAGATGAAAAAGAAGTACCGCAACACCAAATTCGGCATTCTATCGGCGGTTGG
ACGCTCAGCGGGCTCTTCAGCGGGTTTTCTAGCACGGAGGCCGGCCGACGACCT
TTGCCAAGAGTGC GGTTTCAGCTCATGCTCGACTTGGGTTTGGACTTTATCGACATT
GACTGGGAATACCCAGTCTCGGGTGGCAATGCAATTCACACTCGCCCGACGACA
TGAAGAACTTTGTTCTCCTTCTACAAGCGCTCCGCGACGAATTTTCTTTGCTGCCA
TTCCAAGCCGAGCTGAGTGTGGCGTCGCCCGCGGGCCCGGAGAATTACGTTAATT
GGGACTTCCCGTCGGTGTGCGGGCTCGTAGACCACGTAAATCTGATGGCGTATGA
C

D S W N D I G N N V Y G Q F G Q G N K M K K K Y R N T K F G I
S I G G W T L S G L F S G F S S T E A G R S T F A K S A V Q L M
L D L G L D F I D I D W E Y P V S G G N A I P H S P D D M K N F
V L L L Q A L R D E F S L L P F Q A E L S V A S P A G P E N Y V
N W D F P S V C G L V D H V N L M A Y D

Leptolegnia caudata (CBS 680.69)

ACGTCTACGGGCAGTTTGGCCAAGGCAACAAGATGAAGAAGAAGTTTCGCACCA
CCAAGTTTGGCCTGTCGATCGGCGGCTGGACGTTGAGCGGGCTCTTCAGCGGCTT
TGCCAGCACCGACGCGGGTCGCAAGACGTTTGCCCAAAGCGCCGTCAAGCTCATG
CTCGACCTCGGCCTCGACTTTATCGACATCGACTGGGAGTACCCCGTCTCGGGCG
GCAACGCGATCCCGCACTCGCCCGACGACATGAAGAACTTTGTCTTGCTCTTGCG
CGAAATCCGCGCGCAGTATCAGTCGCTGCCGTTCCAGGCCGAGCTCAGTGTGCGG
TCGCCGGCCGGCCCGGAGA ACTACAACA ACTGGGATTTCCCGGCCGTGTGCGGGC
AGCTCGACCACATCAACTTGATGGCGTACGACCTTGC GG CAGCTGACCA

V Y G Q F G Q G N K M K K K F R T T K F G L S I G G W T L S G
L F S G F A S T D A G R K T F A Q S A V K L M L D L G L D F I D
I D W E Y P V S G G N A I P H S P D D M K N F V L L L R E I R A
Q Y Q S L P F Q A E L S V A S P A G P E N Y N N W D F P A V C G
E L D H I N L M A Y D L A G S

A. astaci Gb04 Chi2 (DQ 295065)

TATTCAATTTGCCATCCCCAGCAA ACTGCAACAAGCATGACCATGATCGCCAAGT
CTGCGTTGGCCGCCCTTGTGGTGGCTATGACTTCGTCCGTCGAAGCCGCCAAGCT
CAAGAACGTGGTATACTACATCGAGTGGGCCATCTACGGGCGCAAGTTTGGCATC
TTCGATTTGGATTGGGACAAGATCACCCACATCAACTACGCGTTCGGCAAGCCCA
ACCCTGACGGCACGGTGGGGGTCCACGACGGGTATGCCGCGGTGCAAAATCGGT
TCCCGGGACGTGGCGACTCGTGGAACGACCAAGGCAACA ACTTG TACGGCAACT
TTGGTCAAGGGTTCAAGCAAAAGCAAAAGGCTCGCGGCACCAAGTTCGGTCTGTC

CATTGGCGGGTGGACGTTGAGCGACAAGTTCAGCTCCATCGCGAGCACAGAAAC
AGGCCGCCGCACGTTTGCCAAGAGCTCGGTGAAGCTCATGCTGGACCTGGGGTTG
GACTTTCTTGACATTGACTGGGAGTACCCCGTGGAAGGCGGCAACGACTCGCCCC
CGGTCCCCATCACCCCGACGACATCAAGAACTACGTGTTGCTGCTGAGCGCGAT
CCGCGACGAGTTCAAGACGCTGCCGTGGAAGGCCGAGTTGAGCGTGGCGTCCCCT
GCCGGTCCGGACAAATACCGCCACTGGGACTTTACCGCCATCTGCGGCCAATTGG
ACTTTATCAACATCATGACGTACGACTTGGCGGGCAGTTGGAGCAAGTACACGGA
CCACCAAGCCAACCTTGTACGAAGACCCGAACCACCCCGGCGCAGTAAAGCACCC
ACAACGCCGTGCAAATTACATCAAGGGAGGGTGCCCTTCGGACAAGATCGTGCT
GGGGATTCTGCGTACGGCCGTTTCGTTTGAAGGCTCGAACGGACTCTACTCCAAC
TTCACCAAGCCGACCAAGGGATCTTGGGTGGCTGGCAACGACGGCAAAGGCGTG
TGGGACTACAAGGAGCTCCCCATCCTGGCGCGACGGAGATCTACGACGAAAAG
TTGGGGGCCACGTACAGCTACGACCCACGTCCAAGATCTTTACGTTCGTACGAAG
GGCCCAAGAGTTTGGCCCAGAACTCGACTACATCAAGCAGTACAACCTGGGCG
GCACCATGTTCTGGTCGGGGGATGCCGACGCCAAGTCCGGCTCCCCCGGTCGTT
GATCACGCAAGTGTACAACACGTTTCGGCCGAGCCAACATGGCGTTTGAGGACAA
CAACTTGAACCTACCCACGTCCCAGTACGCCAACATCCGCGCCGGCGCCGCGGTG
ACCTCGGCGGTCCCCGTGACGTCTTCCCCCGTCGCCCTGTGACAACTGTCGCTCC
CGTGACCTCGGAGGTCCCCGTACGTCTTCCCCGCGCCCTGTACAACCTGTCGCT
CCCGTGACCTCGGAGGTCCCCGTACGTCTTCCCCGACAGCCCTGTGACAACTG
TCGCTCCCGTGACCTCGGAGGTCCCGTCACGTCTTCCCCGACGCCCTGTGACA
ACTGTCGCTCCAGTGACCTCGGCGGTCCACGTACGTGTTCTCTACGCCCTGT
GACGTTCGTCTGCTGTTCCGGAGACCACGCCTGTGAAACCCGTGACGACGGAGGCG
ACCCCGCCCCACCGGTGGGCCCATCACGAACCCCTTGAGACGTTGGCTCCCA
CAACCACGGCTGCTGCAGGCGACCAGTGCAAGGGCAACAAGAACGTGTGCTTCT
GGCCGCTCACGGGCCAAACCGTGGACCACTCGCAGGCCAACTGCAAGCTGTTTAC
GTCGTTTATCTGGTGCCATAAATGCACATTGAATTCTTTTATATTAGTAACTCAT
ATAACCTCGAATTGACCATTGGGTTGTGTGTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAA

YSICHPQQTATSMTMIAKSALAALVVAMTSSVEAAKLKNVYYYIEWAIYGRKFG
IFDLWDKITHINYAFGKPNPDGTVGVHGDYAAVQNRFPGRGDSWNDQGNLY
GNFGQGFKQKQKARGTKFGLSIGGWTLSDKFSSIASTETGRRTFKSSVKMLMLD
LGLDFLDIDWEYPVEGGNDSPPVPHHPDDIKNYVLLLSAIRDEFKTLPWKAELSV
ASPAGPKYRHWDFTAICGQLDFINIMTYDLAGSWSKYTDHQANLYEDPNHPG
AVKHPQRRANYIKGGCPSDKIVLGIPAYGRSFEGLSNFTKPTKGSWVAGN
DGKGVWDYKELPHPGATEIYDEKLGATYSYDPTSKIPTSIEGPKSLAQKLDYIK
QYNLGGTMFWSGDADAKSGSPRSLITQVYNTFGRANMAFEDNNLNYPSTQYANI
RAGAAVTSAPVPTSSPVAPVTTVAPVTSEVPVTSSPPPLYNCRSRDLGGPRHVFPR
QPCDNCRSRDLGGPVTSSPDAPVTTVAPVTSVHVTCSSYAPVTSSAVPETTPVEP
VTTEATPAPTGGPITNPLETLAPTTTAAAGDQCKGNKNVCFWPLTGQTVDHSQA
NCKLFTSFIWCP#MHIEFFYISNSYNLELTIGLCV

ITS-REGION (Hoog et al., 2002)

Primer: **V9**: TTAAGTCCCTGCCCTTTGTA

Primer: **LS266**: GCATTCCCAAACAACCTCGACTC

A. astaci Gb04

CGTCGCACCTACCGATTGAATGACTCGGTGAGAAATTGGGACCGTTGTTTCGCTTGCTTC
ATTGTGAGTGGAACGGTGGGAACCTTTTTCTAACCTCGCCATTTAGAGGAAGGTGAAGTCG
TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCACACCAAAAACTATCCA
CGTGAATGTATTCTTTATAAGGCTTGTGCTGGGATGTTCTTCGGGACGACCCGGCTAGCA
GAAGGTTTCGCAAGAAGCCGATGTACTTTTAATCCCTTCTTAAATAACATACTGATAAAC
TTAGCCGTCAGAAATGATAGCTTGTAATAAAAATACAACCTTCAACAGTGGATGTCTAGGC
TCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGAATTCAGT
GAGTCATCGAAATTTGAACGCATATTGCACTTTCGGGTTAGTCCTGGAAGTATGTCTGT
ATCAGTGTCCGTTAATACAAAATTGTTTTGTCTTTGGACGAAGCAGAATGTGAAGGTCTT
GTTTCGACAAGTCCTTTTAAATGACGGTCCCTGTATAGCTGTTCAAGTACATTATACAAA
GGTCTATATGATTCTGATTTTGAATGTTTTGTGTTGAAATTGCACAACCTTTGAAAGAAG
GCTAAATTGCGGTAGTTTTGCTTGTGTTTCGGCACGGGTGAACACATATTGCTTTTTA

A. astaci Z12

GTCGCACCTACCGATTGAATGACTCGGTGAGAAATTGGGACCGTTGTTTCGCTTGCTTCA
TTGTGAGTGGAACGGTGGGAACCTTTTTCTAACCTCGCCATTTAGAGGAAGGTGAAGTCGT
AACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCACACCAAAAACTATCCAC
GTGAATGTATTCTTTATAAGGCTTGTGCTGGGATGTTCTTCGGGACGACCCGGCTAGCAG
AAGGTTTCGCAAGAAGCCGATGTACTTTTAATCCCTTCTTAAATAACATACTGATAAACT
TAGCCGTCAGAAATGATAGCTTGTAATAAAAATACAACCTTCAACAGTGGATGTCTAGGCT
CGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGAATTCAGT
GAGTCATCGAAATTTGAACGCATATTGCACTTTCGGGTTAGTCCTGGAAGTATGTCTGTA
TCAGTGTCCGTTAATACAAAATTGTTTTGTCTTTGGACGAAGCAGAATGTGAAGGTCTTG
TTTCGACAAGTCCTTTTAAATGACGGTCCCTGTATAGCTGTTCAAGTACATTATACAAAG
GTCTATATGATTCTGATTTTGAATGTTTTGTGTTGAAATTGCACAACCTTTGAAAGAAGG
CTAAATTGCGGTAGTTTTGCTTGTGTTTCGGCACGGGTGAACACATATTGCTTTTT
ATGT

A. repetans Lk29

GTCGCACCTACCGATTGAATGACTCGGTGAGAAATTGGGACTGTTGTGTTGTTTTCGCTTCA
TTGTGAGCGACACGGTGGGAACCTTTTTCTAACCTCGCCATTTAGAGGAAGGTGAAGTCGT
AACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCACACCAAAAAAATATCCA
CGTGAACGTAATCTTTATGAAGCCATGTTCGGGCCAAAAGCYCGTAGGCAGAAGGTTTCGC
AAGAAGCCGATGTGATTTTATCCCTTTAATAAATGACTGATAGAGATAGCCATCAGAAA
TGATCGCTTGTAATAAAAATACAACCTTCAACAGTGGATGTCTCGGCTCGCACATCGATGA
AGAGCGCGGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGAATTCAGTGAGTCATCGAAAT
CTTGAACGCATATTGCACTTTCGGGTTAGTCCTGGAAGTATGTCTGTATCAGTGTCCGTCG
ACACCAAATTGTTGATCATGTGAGTGATGGAACAGAATGTGAGGGTCTTGTTCGGCAA
GTCCTTTTAAAAGAGAGTCCCTCGCTTGATGTTTTGTGCATTAATTAGAGGACTGTTTGA
TCTTGTTCGGCATTATTTTGTGTTGCGACTGCACACTGGCTGAAGGGAGATTAATTGCG
GTAGTTTTGCTTGTGTTTCGGCACGGGTGAACATTTTATTGCATTTAATC

28s rDNA-Region

Primer: **oo28sf**: CGCTGATTTTTCCAAGCCC

Primer: **oo28sr**: GAGATAGGGAGGAAGCCATGG

A. astaci Gb04

CTGTGGGTTTCGCTAGACAGTAGATAGGGACAGTGGGAATCTCATTAATCCATTCATGCGC
GTCCTAGTTAGATGACGAGGCATTTGGCTACCTTAAGAGAGTCATAGTTACTCCCGCCG
TTTACCCGCGCTTGGTTGAATCTCTTCACTTTGACATTCAGAGCACTGGGCAGAAATCACA
TTGTGTCAACACCGTCTCCGGCCATCACAATGCTTTGTTTTAATTAACAGTCGGATTCCC
CTTGTCCGCTCCAGTTCTGAGTTAATTGTTTCATCGCATAAACAATTCTCTCCAGTACAGCA
AGGGCAGCCCAACCAACGGCCCATGCCGGTCCCCGAAAGGTCCAACACACTCCATTGTA
GGCCATCCAAGCTCCCCGAAAAGACGTCCATGCCCAATCCTCAGAGCCAATCCTTTTCCC
GAAGTTACGGATCTATTTTGCCGACTTCCCTTATCTACATTCTTCTATCAACTAGAGGCTG
CTAACCTTGGAGACCTGATGCGGTTATGAGTACGAACGAGGGTGCGAATAAATCTCTCGC
CAGAATTTTCAAGGGCCGTCGTGAGCGCGCAGGACACCCTAAAAATCAAGGTGCTTTGCC
ATGGCTCCCCTNCCCTATCTC

A. astaci Z12

TGTGGGTTTCGCTAGACAGTAGATAGGGACAGTGGGAATCTCATTAATCCATTCATGCGCG
TCACTAGTTAGATGACGAGGCATTTGGCTACCTTAAGAGAGTCATAGTTACTCCCGCCGT
TTACCCGCGCTTGGTTGAATCTCTTCACTTTGACATTCAGAGCACTGGGCAGAAATCACAT
TGTGTCAACACCGTCTCCGGCCATCACAATGCTTTGTTTTAATTAACAGTCGGATTCCCC
TTGTCCGCTCCAGTTCTGAGTTAATTGTTTCATCGCATAAACAATTCTCTCCAGTACAGCAA
GGGCAGCCCAACCAACGGCCCATGCCGGTCCCCGAAAGGTCCAACACACTCCATTGTAG
GCCATCCAAGCTCCCCGAAAAGACGTCCATGCCCAATCCTCAGAGCCAATCCTTTTCCC
AAGTTACGGATCTATTTTGCCGACTTCCCTTATCTACATTCTTCTATCAACTAGAGGCTGC
TAACCTTGGAGACCTGATGCGGTTATGAGTACGAACGAGGGTGCGAATAAATCTCTCGCC
AGAATTTTCAAGGGCCGTCGTGAGCGCGCAGGACACCCTAAAAATCAAGGTGCTTTGCCA
TGGCTCCCTNCCCTATCTC

A. repetans Lk29

CTGTGGGTTTCGCTAGACAGTAGATAGGGACAGTGGGAATCTCATTAATCCATTCATGCGC
GTCCTAGTTAGATGACGAGGCATTTGGCTACCTTAAGAGAGTCATAGTTACTCCCGCCG
TTTACCCGCGCTTGGTTGAATCTCTTCACTTTGACATTCAGAGCACTGGGCAGAAATCACA
TTGTGTCAACACCGTCTCCGGCCATCACAATGCTTTGTTTTAATTAACAGTCGGATTCCC
CTTGTCCGCTCCAGTTCTGAGTTAATTGTTTCCTTGCATACACAGTTCCCTCCAGTACAACA
AGGGCAGCCCAACCAGCGGCCCATGCCAGTCCCCGAGAGGTCCGGCACACTCCACTGTA
GGCCATCCAAGCTCCCCGAAAGGACGTCCATGCCCAATCCTCAGAGCCAATCCTTTTCCC
GAAGTTACGGATCTATTTTGCCGACTTCCCTTATCTACATTCTTCTATCAACTAGAGGCTG
CTAACCTTGGAGACCTGATGCGGTTATGAGTACGAACGAGGGTGCGAATAAATCTCTCGC
CAGAATTTTCAAGGGCCGTCGTGAGCGCGCAGGACACCCTAAAAATCAAGGTGCTTTGCC
ATGGCTCCCTTCCCTATCTCA

Literaturverzeichnis

Abdel-Banat, B.M., Koga, D., 2001: A genomic clone for a chitinase gene from the silkworm, *Bombyx mori*: structural organization identifies functional motifs. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31,497–508.

Giglio, S., Monis, P.T., Saint, P., 2003: Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR. *Nucleic Acids Research.* 31, No. 22, e136.

Huang, T., Cerenius, L., Söderhäll, K., 1994: Analysis of genetic diversity in the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*, by random amplification of polymorphic DNA. *Aquaculture.* 126, 1-10.

Matsumoto, C., Kageyama, K., Hyakumachi, M., 2000 : Intraspecific DNA polymorphisms of *Pythium irregulare*. *Mycol. Res.* 102, 1333-1341.

Royo, F., Andersson, G., Bangyeekhun, E., Muzquiz, J.L., Söderhäll, K., Cerenius, L., 2000: Physiological and genetic characterisation of some new *Aphanomyces* strains isolated from freshwater crayfish. *Vet. Microbiol.* 104, 103-112.