

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences

Ein Vergleich von Identifikationsmethoden zur Bestimmung von
Thraustochytriaceae

Bachelorthesis

im Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von

Burmeister, Alina

Matrikelnummer: 2019991

Hamburg, 27.11.2014

- 1. Gutachter:** Prof. Dr. Gesine Cornelissen (HAW Hamburg)
- 2. Gutachter:** Dr. rer. nat. Antje Labes (GEOMAR Helmholtz-Zentrum für Ozeanforschung Kiel)

Die Abschlussarbeit wurde betreut und erstellt im Labor des Kieler Wirkstoff-Zentrums am Helmholtz-Zentrum für Ozeanforschung Kiel

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	II
Tabellenverzeichnis	III
1 Einleitung	2
1.1 Taxonomie der Thraustochytriden	2
1.2 Biotechnologische Bedeutung	4
1.3 Bestimmungsmethoden für die Gruppe der Thraustochytriden	6
1.4 Sammlung des Kieler Wirkstoff-Zentrums	7
1.5 Ziel der Bachelorthesis	7
2 Material	8
2.1 Verwendete Stämme	8
2.2 Chemikalien und Nährmedien	9
3 Methoden	10
3.1 Kultivierung der Stämme	10
3.2 DNA-Extraktion	10
3.3 Primer	11
3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	11
3.5 Agarose-Gelelektrophorese	12
3.6 Sequenzierung	13
3.7 ChromasPro und BLAST-Suche	14
3.8 Phasenkontrastmikroskopie	14
3.9 Rasterelektronenmikroskopie	15
3.10 Phylogenetische Analyse mit ClustalX	15
4 Ergebnisse	16
4.1 Sequenzierung	16
4.2 Phasenkontrast- und Rasterelektronenmikroskopie	20
5 Diskussion	40
6 Ausblick	44
7 Literaturverzeichnis	45
8 Anhang	49

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der in den Fußnoten und im Literaturverzeichnis angegebenen Quellen angefertigt habe.

Hamburg, den 27. November 2014

Alina Burmeister

Tabellenverzeichnis

1	Verwendete Thraustochytriaceae-Stämme aus der Labyrinthulida-Stammsammlung	8
2	Reaktionsansatz für enzymatische Aufreinigung	13
3	Reaktionsansatz für das Cycle-Sequencing	14
4	Protokoll für die Sequenzierreaktion	14
5	Ergebnisse der BLAST-Suche und Länge der erhaltenen Sequenzen	16
6	Nicht identifizierte Stämme und Sequenzlängen der PCR-Produkte bei Verwendung der Primer	17
7	Überblick über die Eigenschaften der mikroskopierten Stämme	39
8	Mögliche Haarnadelstrukturen der Primer	40
9	Fettsäuremuster der identifizierten Stämme	42

Zusammenfassung

Die Thraustochytriaceae sind eine Familie von marinen Protisten, die sowohl in der Taxonomie wegen ihrer kontrovers-diskutierten Stellung im Reich der Eukaryonten als auch durch ihre Eigenschaft große Mengen an ω -3-Fettsäuren zu produzieren Aufmerksamkeit erlangt haben. Die Identifikation von isolierten Stämmen aus marinen Standorten wird sowohl mittels Sequenzierung der 18S rRNA-Gene als auch durch die Analyse von morphologischen Charakteristika und Stoffwechselprodukten wie Fettsäuren und Carotenoide durchgeführt und wirft einige Probleme auf. So gibt es noch keine etablierte Methode zur Sequenzierung der 18S rRNA-Gene dieser Organismen und aufgrund der großen Diversität dieser Gruppe von Protisten werden immer noch neue Arten beschrieben und neu eingeordnet.

In dieser Bachelorthesis wurden isolierte Stämme mit Phasenkontrastmikroskopie und Rasterelektronenmikroskopie untersucht und ein System zur Sequenzierung der 18S rRNA-Gene entwickelt. Außerdem wurden die Fettsäuren der hier gewählten Stämme in einem vorherigen Projekt isoliert und gemessen und mit den Ergebnissen dieser Arbeit verglichen. Es wurden die Probleme bei der Amplifikation und Sequenzierung der 18S rRNA-Gene erörtert und ein Vergleich der Identifikationsmethoden angestellt.

1 Einleitung

1.1 Taxonomie der Thraustochytriden

Die Thraustochytriden sind marine Protisten, die sich saprotroph oder selten parasitär ernähren (Porter, 1990). Die evolutionären Beziehungen und die Taxonomie innerhalb dieser Gruppe von Protisten sind immer noch nicht vollständig geklärt. Die erste beschriebene Gattung *Thraustochytrium* wurde ursprünglich den Pilzen unter der Ordnung Chytridiales zugeordnet (Sparrow, 1936). Wegen ihrer heterokont begeißelten Zoosporen wurden sie später den Oomyceten unter der Ordnung Saprolegniales zugeordnet (Dick, 1973). Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten aber, dass sie sich sehr von den Pilzen unterscheiden. Charakteristisch für die Thraustochytriden ist ein ektoplasmatisches Netz, welches von einem einzigartigen Organell, dem Sagenogenetosom, Sagenogen oder Bothrosome (alle drei Bezeichnungen werden in der Literatur akzeptiert) produziert wird (Perkins, 1973a). Außerdem besteht ihre Zellwand nicht aus Cellulose, sondern aus vom Golgi-Apparat abgeleiteten Schuppen, die sich in mehreren Schichten um die Zelle legen. Die Zellwand besteht je nach Gattung aus verschiedenen Polysacchariden wie Galactose, Glucose, Mannose, Xylose, Fucose und Rhamnose, sowie verschiedenen Proteinen. Das Verhältnis Proteine zu Polysacchariden ist je nach Gattung ebenfalls sehr unterschiedlich (Bahnweg und Jäckle, 1986). Aufgrund dieser Entdeckungen wurden für die Thraustochytriden zwei eigene Ordnungen aufgestellt: Thraustochytriales (Alderman et al., 1974) und Labyrinthulales (Moss, 1986). Die Thraustochytriales haben globuläre Zellen und ein ektoplasmatisches Netz, das nur von einem Sagenogen produziert wird, während die Labyrinthulales spindelförmig sind und ihr ektoplasmatisches Netz von mehreren Sagenogenen ausgeht. Außerdem gleiten die Labyrinthulales durch ihr ektoplasmatisches Netz. Von anderen Wissenschaftlern wurden diese beiden Ordnungen zu einer Ordnung namens Labyrinthulida zusammengefasst, welche sich in zwei Familien aufteilt: Labyrinthulaceae und Thraustochytriaceae (Olive, 1975). Diese Ordnung wird der Klasse Labyrinthulea unterstellt, welche zunächst von Olive dem Reich der Protista zugeordnet wurde. Später wurden die Labyrinthulea aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu den heterokonten Algen dem neuen Reich der Chromista zugeordnet (Cavalier-Smith et al., 1981, 1994). Aber dieses Reich, welches die Cryptophyceae, Haptophyta und Stramenopiles (Adl et al., 2005) beinhaltet, ist trotz der Akzeptanz der meisten Taxonomen noch umstritten (Burki et al., 2007). Ebenso wird die Klasse oft auch als Labyrinthulomycetes deklariert, was sie dem Namen nach wieder den Pilzen zuordnet (Levine et al., 1980).

All diese Kontroversen führen dazu, dass diese marinen Protisten umgangssprachlich Thraustochytriden genannt werden, da man sie bisher nicht eindeutig taxonomisch einordnen kann. Es liegen noch nicht genügend DNA-Sequenzen (Datenbank NCBI) der einzelnen Gattungen und Arten vor, sodass man nur beschränkt aussagekräftige phylogenetische Stammbäume er-

stellen kann, um ihre Stellung im Reich der Protisten zu analysieren.

Zurzeit gibt es elf beschriebene Gattungen in der Familie der Thraustochytriaceae: *Aplanochytrium* (Bahnweg und Sparrow, 1972), *Aurantiochytrium* (Yokoyama und Honda, 2007a), *Botryochytrium* (Yokoyama und Honda, 2007b), *Japonochytrium* (Kobayashi und Ookubo, 1953), *Labyrinthuloides* (Perkins, 1973), *Oblongichytrium* (Yokoyama und Honda, 2007a), *Parietichytrium* (Yokoyama und Honda, 2007b), *Schizochytrium* (Goldstein und Belsky, 1964), *Sicyodochytrium* (Yokoyama und Honda, 2007b), *Thraustochytrium* (Sparrow, 1936) und *Ulkenia* (Gaertner, 1977). Die Gattungen werden hauptsächlich anhand ihrer Sporenmorphologie und dem Mechanismus der Sporentlassung unterschieden. So ist *Aplanochytrium* zum Beispiel die einzige Gattung, die Aplanosporen entlässt und *Ulkenia* setzt zunächst amöboide Zellen frei bevor Sporangien gebildet werden. Es wurde bisher keine sexuelle Fortpflanzung bei den Thraustochytriden entdeckt. Sie vermehren sich entweder durch sukzessive Zweiteilung oder durch Bildung von Sporangien. Diese Sporangien können nicht-sprossend, einfach-sprossend oder vielfach-sprossend sein (siehe Abbildung 1).

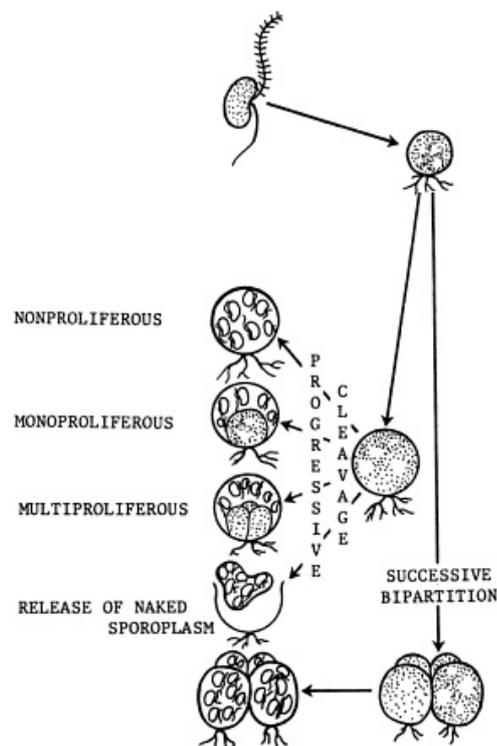


Abbildung 1: Arten der Sporangien von Thraustochytriaceae (Moss, 1986)

Der Lebenszyklus der Thraustochytriden beginnt mit der Freisetzung der Zoosporen durch teilweise oder komplette Desintegration der Zellwand. Nach einer Schwarmperiode siedeln die Zoosporen sich an einem Substrat an und formen sich in vegetative Zellen um, die ein ektoplasmatisches Netz bilden und der Zyklus beginnt von neuem.

Die morphologische Klassifikation ist jedoch problematisch, da einige Charakteristika sich überschneiden. So konnten auch bei *Thraustochytrium* und *Schizochytrium* amöboide Zellen unter bestimmten Kultivierungsbedingungen beobachtet werden (Honda, 1998; Bongiorno, 2005). Eine sicherere Identifikation böte der Vergleich von 18S rRNA Sequenzen. Die Sequenzierung der 18S rRNA-Gene hat sich in den letzten Jahren als gute Methode entwickelt, um phylogenetische Stammbäume zu erstellen (Field et al., 1988). Eine Literaturrecherche hat ergeben, dass noch keine etablierte Methode zur Amplifikation und Sequenzierung der 18S rRNA-Gene der Thraustochytriaceae existiert. Es wurden schon verschiedene Primer entwickelt und verwendet, um die 18S rRNA-Gene von Thraustochytriaceae zu amplifizieren, doch Vorversuche haben gezeigt, dass nicht alle in der Literatur genannten Primer für die hier gewählten Stämme geeignet sind. Die Primer, die Honda et al. (1999) verwendet hat, konnten anscheinend nicht spezifisch genug an die DNA der hier verwendeten Stämme binden, da nur selten ein PCR-Produkt entstanden ist und die Sequenzen sehr unsauber und damit nicht verwertbar waren. Auch das Primerset von Mo et al. (2002) hat nicht genug saubere Sequenzen hervorgebracht, sodass von keinem Stamm die komplette Sequenz des 18S rRNA-Gens zur Verfügung stand. In dieser Thesis werden die Primer von Burja et al. (2006) zur Amplifikation verwendet, da sie laut Aussage des Autors eine Modifikation der Primer von Honda et al. sind und das Potential haben, spezifischer an die DNA zu binden.

1.2 Biotechnologische Bedeutung

Kommerzielle Aufmerksamkeit haben die Thraustochytriden in den letzten Jahren dadurch erlangt, dass sie ω -3-Fettsäuren (PUFAs = polyunsaturated fatty acids) in großer Menge synthetisieren. Diese mehrfach ungesättigten Fettsäuren sind für den Menschen wichtige Nährstoffe, da sie essentielle Fettsäuren sind, also nicht vom Körper produziert werden können. Über die Nahrung wird aber oft zu wenig von den ω -3-Fettsäuren und zu viel von ω -6-Fettsäuren aufgenommen, was zu Krankheiten wie Krebs, Asthma und Herz-Kreislauf-Erkrankungen führen kann (Norrish et al., 1999; Hodge et al., 1996) und immer mehr Menschen greifen zu Nahrungsergänzungspräparaten, die ω -3-Fettsäuren enthalten. Zurzeit werden die PUFAs hauptsächlich aus Fischöl und phototroph kultivierten Mikroalgen gewonnen. Da die Fischbestände zurückgehen und eine Fischzucht zu aufwendig und teuer ist, um das Öl aus den Fischen zu extrahieren, wird diese Quelle der PUFAs in Zukunft nicht ertragreich genug sein. Ein weiteres Problem sind die Schadstoffe im Meer, die die Fische in ihren Körpern einlagern und so über das Öl in den Menschen gelangen können. Die Kultivierung der Mikroalgen ist ebenfalls problematisch, da sie Licht zum Wachsen benötigen. Die optimale Beleuchtung und damit größte Wachstumsrate wird nur durch komplexe Bioreaktorbauarten und Beleuchtung mit Leuchtstoffröhren unter hohem Energieverbrauch erreicht. Deshalb sind die Thraustochytriden eine gute Alternative zu den Fischen und Mikroalgen. Sie benötigen kein Licht, ihre Kultivierung ist relativ einfach und

einige Stämme haben hohe Wachstumsraten (Scheper et al., 2003). Die mengenmäßig am meisten vorkommende ω -3-Fettsäure in Thraustochytriden ist Docosahexaensäure (DHA), welche in Stämmen aus kalten Habitaten bis zu 50% und in Stämmen aus subtropischen Habitaten bis zu 37% des Gesamtfettsäureanteils ausmacht (Bowles et al., 1999). Weitere ω -3-Fettsäuren sind Eicosapentaensäure (EPA) und Docosapentaensäure (DPA), die jedoch in viel geringeren Mengen vorkommen und somit als Nahrungsergänzungsmittel nicht relevant sind (Barclay et al., 2010). Anfang der 1990er Jahre hat die kommerzielle Produktion von DHA mit Thraustochytriden begonnen und es wurden schon mehrere Patente auf diesen Prozess angemeldet (Barclay, 1992, 1994). Zurzeit wird mit Stämmen der Gattungen *Schizochytrium* (DSM, Niederlande und USA), *Ulkenia* (Lonza, Schweiz) und *Thraustochytrium* (Ocean Nutrition, Kanada) Öl produziert, was hauptsächlich in der Aquakultur eingesetzt wird, um das Überleben der Larven und ihr Wachstum zu unterstützen. Auch in der Hähnchenzucht und als Futterergänzungsmittel bei Legehennen werden getrocknete Thraustochytriden eingesetzt (Hammond et al., 2001).

Obwohl schon einige Screenings von Isolaten aus marinen Standorten auf der ganzen Welt durchgeführt wurden, besteht ein großes Potential neue Stämme mit höheren DHA-Ausbeuten und Wachstumsraten zu finden (Lewis et al., 1990).

Ein weiteres interessantes Produkt der Thraustochytriden sind die einfach ungesättigten Fettsäuren (MUFAs = monounsaturated fatty acids), die als Biodiesel genutzt werden können. Es gibt einige Stämme, die Fettsäuren produzieren, die bis zu 90% aus einfach ungesättigten Fettsäuren wie Palmitoleinsäure (C16:1), Ölsäure (C18:1), Gadoleinsäure (C20:1) und Erucasäure (C22:1) bestehen. Diese können mit Hilfe von Methanol und einem Katalysator in Biodiesel und Glycerin umgeestert werden. Es wurde schon ein Patent veröffentlicht, dass die Biodieselproduktion mit Thraustochytriden beschreibt (Fisher et al., 2010).

Außerdem sind die Thraustochytriden eine potentielle Quelle für Carotenoide wie β -Carotin und die Xanthophylle Astaxanthin und Canthaxanthin (Aki et al., 2003). Sie produzieren diese Antioxidantien wahrscheinlich, um ihre eingelagerten Fette vor Oxidation zu schützen (Burja et al., 2006). Während einer viertägigen Kultivierung mit einem Stamm der Gattung *Schizochytrium* wurden von Aki et al. (2003) 10 mg/L Canthaxanthin und 8 mg/L β -Carotin erzielt. Die Carotenoid-Profile von Thraustochytriden können auch genutzt werden, um sie taxonomisch zu charakterisieren, da von Yokoyama und Honda (2007a,b) herausgefunden wurde, dass monophyletische Gruppen auch die selben Carotenoide produzieren.

1.3 Bestimmungsmethoden für die Gruppe der Thraustochytriden

Morphologisch

Bis zur Entdeckung der PCR und damit Erstellung von phylogenetischen Stammbäumen mit Hilfe von DNA-Sequenzen, wurden die Thraustochytriden anhand von morphologischen Merkmalen unterschieden und in sechs Gattungen eingeteilt. *Thraustochytrium* wurde anhand von globulären Sporangien, die nicht-sprossend, einfach-sprossend oder vielfach-sprossend sind charakterisiert. Die Freisetzung der Zoosporen erfolgt durch teilweise Auflösung der Zellwand (Sparrow, 1936). *Japonochytrium* bildet Abzweigungen im ektoplasmatischen Netz (Kobayashi und Ookubo, 1953), *Schizochytrium* vermehrt sich nur durch binäre Zellteilung (Goldstein und Belsky, 1964), *Althornia* besitzt kein Sagenogen und damit auch kein ektoplasmatisches Netz (Jones und Alderman, 1971), *Ulkenia* entlässt amöboide Zellen bevor Sporangien gebildet werden (Gaertner, 1977) und *Aplanochytrium* entlässt nur Aplanosporen (Bahnweg und Sparrow, 1972). Diese Bestimmungsmethode hat sich aber als problematisch erwiesen, da einige gattungsspezifische Charakteristika unter bestimmten Kultivierungsbedingungen auch bei anderen Gattungen auftreten (Bongiorni et al., 2005). Die schon weiter oben erwähnten "neuen" Gattungen *Aurantiochytrium*, *Botryochytrium*, *Labyrinthoides*, *Oblongichytrium*, *Parietichytrium* und *Sicyoidochytrium* wurden nicht nur anhand von morphologischen Merkmalen definiert, sondern es wurden die 18S rRNA Sequenzen, die Fettsäureprofile sowie die vorhandenen Carotenoide in die Identifikation mit einbezogen.

Molekularbiologisch

In der molekularen Phylogenie hat es sich etabliert, die 18S rRNA- bzw. 16S rRNA-Gensequenz zur Bestimmung von Arten und Aufstellung von phylogenetischen Stammbäumen zu sequenzieren (Field et al., 1988). Es wurden schon einige Primer entwickelt, die der Amplifikation und Sequenzierung der 18S rRNA-Gene von Thraustochytriden dienen sollen, doch scheint es noch keine optimalen Primer zu geben, mit denen man die DNA von allen Gattungen sequenzieren kann. So verwendete Honda et al. in seiner Veröffentlichung von 1999 die Primer 18S001 und 18S13, während er ein paar Jahre später die Primer SR1 und SR12 zur Amplifikation und die Primer 18S01-18S12 zur Sequenzierung verwendete (Yokoyama und Honda, 2007a,b). Mo et al. (2002) hat versucht eine PCR-Strategie zu entwickeln, mit der man Thraustochytriden identifizieren kann, doch dies gelang ihm nur teilweise. Es stellte sich heraus, dass seine entwickelten Primer F, FA1, FA2, FA3, R, RA1, RA2 und RA3 nicht bei allen verwendeten Stämmen PCR-Produkte hervorbringen konnten.

Stoffwechselprodukte

In Kombination mit den morphologischen und molekularbiologischen Bestimmungsmethoden wird seit einiger Zeit auch das Carotenoid-Profil von Thraustochytriden mit in die Bestimmung mit einbezogen (Yokoyama und Honda, 2007a,b). Auch die Fettsäureprofile werden als unterstützendes Charakteristikum für die Bestimmung von Thraustochytriden verwendet. Huang et al. (2003) hat gezeigt, dass Thraustochytriden sich anhand ihrer Fettsäuren in fünf Kategorien einordnen lassen: DHA/DPA, DHA/DPA/EPA, DHA/EPA, DHA/DPA/EPA/AA (Arachidonsäure) und DHA/DPA/EPA/AA/DTA (Adrensäure).

1.4 Sammlung des Kieler Wirkstoff-Zentrums

Das Kieler Wirkstoff-Zentrum (KiWiZ) am Helmholtz-Zentrum für Ozeanforschung GEOMAR besitzt eine Sammlung von 286 Labyrinthulida-Stämmen, die von Karsten Schaumann, der am Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung in Bremerhaven tätig war, aus marinen Standorten isoliert wurden. Die Stämme wurden anhand von morphologischen Charakteristika unterschieden und haben interne Stammbezeichnungen erhalten. Eine Identifikation auf Art- oder Gattungsebene hat noch nicht stattgefunden. Nähere Informationen zu Sammlungsort und -zeitpunkt der Stämme liegen nicht vor.

1.5 Ziel der Bachelorthesis

Ziel dieser Bachelorthesis ist es, eine verlässliche Methode zu entwickeln, mit der es möglich ist, aus dem Meer isolierte Stämme von Thraustochytriaceae auf Art bzw. Gattungsebene zu bestimmen. Es werden einige der bisher verwendeten Bestimmungsmethoden verglichen und diskutiert, um die beste Methode herauszufinden. Zu diesen Methoden gehören die Einordnung nach morphologischen Charakteristika mittels Lichtmikroskop und Rasterelektronenmikroskop, sowie die molekularbiologische Methode der Sequenzierung des 18S rRNA-Gens und die Bestimmung der Gesamtfettsäuren der Thraustochytriaceae. Die Bestimmung der Fettsäuren ist nicht praktischer Teil dieser Arbeit, sondern wurde in einem vorherigen Projekt schon mit den selben Stämmen durchgeführt. Die Ergebnisse dieses Projektes werden mit den Ergebnissen aus dieser Bachelorthesis verglichen. Ziel ist es außerdem, mit den Sequenzen der 18S rRNA-Gene einen phylogenetischen Stammbaum zu erstellen und die Verwandtschaft der Stämme näher zu betrachten. Die zu entwickelnde Methode soll helfen, isolierte Stämme schnell und sicher zu identifizieren, um ihr Potential als Fettsäureproduzent schnell einschätzen zu können. Es wurden exemplarisch 39 Stämme der KiWiZ-Sammlung zufällig ausgewählt und für die Versuche verwendet. Eine mikroskopische Untersuchung hat gezeigt, dass die gewählten Stämme alle der Familie der Thraustochytriaceae angehören. Aus diesem Grund wird auch nicht näher auf die Familie der Labyrinthulaceae eingegangen.

2 Material

2.1 Verwendete Stämme

Die verwendeten Stämme wurden alle der Labyrinthulida-Stammsammlung des KiWiZ (isoliert von K. Schaumann) entnommen und haben folgende Stammbezeichnung (siehe Tabelle 1):

Tabelle 1: Verwendete Thraustochytriaceae-Stämme aus der Labyrinthulida-Stammsammlung

3401	1485b	4994a
5661	1518d	4994c
5905	1518e	4994d
6423	1526d	4995d
1438e	1527a	5629e
1450d	1527c	5658a
1462d	1531c	5676f
1465d	1709d	6000b
1471d	2845c	6001b
1471f	415/11y	6002a
1472e	4930a	6005a
1473e	4930b	6006d
1476b	4992b	6006e

2.2 Chemikalien und Nährmedien

Verwendete Chemikalien

Sofern nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien in der Reinheit p.A. bezogen.

Chemikalie	Hersteller
(+)D-Glucose-Monohydrat	Merck
Hefeextrakt Becton	Dickson and Company (BD)
Tropic Marine Seasalt	Knutzen
Mono-Natrium-Glutamat	Appli Chem
Pepton Bacto Becton	Dickson and Company (BD)
Agarose	Carl Roth
Bacto-Agar	Otto Nordwald
Ethylenediaminetetraacetic acid trisodium salt (EDTA)	Sigma
Borsäure	Sigma
TRIS	Roth
SYBR® Safe DNA gel stain	Invitrogen
DreamTaq Green Mastermix	Fermentas
nuklease-freies H ₂ O	Fermentas

Zusammensetzung der Nährmedien

B1TM-Agar (Gupta et al., 2013):
 30 g/L Tropic Marin Seasalt
 1 g/L Hefeextrakt
 1 g/L Pepton (Bacto)
 18 g/L Agar (Bacto)

B1TM-Medium (Gupta et al., 2013):
 30 g/L Tropic Marin Seasalt
 1 g/L Hefeextrakt
 1 g/L Pepton (Bacto)

TSN+TM-Medium (Shabala et al., 2013):
 8 g/L Mono-Natrium-Glutamat
 2 g/L Hefeextrakt
 20 g/L (+)D-Glucose-Monohydrat
 30 g/L Tropic Marin Seasalt

Puffer
 1xTBE (pH 8,0):
 10,781 g/L TRIS
 5,770 g/L Borsäure
 0,716 g/L EDTA

3 Methoden

3.1 Kultivierung der Stämme

39 Thraustochytriaceae-Stämme wurden aus der -100°C Lagerung auf Agarplatten mit B1TM-Agar gebracht und mit 1 mL 20 ‰ Saline überschichtet und bei 28°C inkubiert. Nach ein bis sieben Tagen konnte Wachstum auf den Platten festgestellt werden und ein Agarausschnitt wurde in 50 mL B1TM Vorkultur in 100 mL-Erlenmeyerkolben ohne Schikane überführt. Die Vorkulturen wurden ebenfalls bei 28°C inkubiert und bei 120 rpm geschüttelt. Sobald Wachstum erkennbar war, wurden die 50 mL Vorkultur in 200 mL TSN+TM Hauptkultur überführt und ebenfalls bei 28°C inkubiert und bei 120 rpm geschüttelt. Bei deutlicher Trübung der Hauptkulturen wurden diese geerntet, indem sie in Falcon Tubes überführt und bei 4700 rpm 15 min zentrifugiert wurden; der Überstand wurde verworfen. Die Biomasse lagerte bei -20°C zur weiteren Verarbeitung. Acht der Thraustochytriaceae-Stämme sind nicht auf den gewählten Platten bzw. in den Flüssigkulturen gewachsen (1485b, 415/11y, 4994a, 4994c, 4994d, 4995d, 5658a und 6001b).

3.2 DNA-Extraktion

Die DNA wurde mit Hilfe des DNeasy Blood and Tissue Kits von Qiagen extrahiert. Das Kit wurde nach Anleitung des Herstellers wie folgt verwendet: Zellmaterial wurde in 180 µL Buffer ATL und 20 µL Proteinase K resuspendiert und bei 56°C im Thermomixer inkubiert bis die Probe lysiert war (ca. 30 min). Anschließend wurde die Probe für 15 s homogenisiert und 200 µL Buffer AL und 200 µL Ethanol (96-100%) dazugegeben und wieder vorsichtig homogenisiert. Anschließend wurde alles auf die DNeasy Mini Spin Column pipettiert und 1 min bei 8.000 rpm zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und die Spin Column wurde in eine neue Collection Tube platziert. Es wurden 500 µL Buffer AW1 dazugegeben und 1 min bei 8.000 rpm zentrifugiert. Das Filtrat wurde wieder verworfen. Zur weiteren Aufreinigung wurde 500 µL Buffer AW2 auf die Spin Column pipettiert und anschließend bei 13.000 rpm 3 min lang zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und die Säule in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt. Zum Schluss wurde die DNA mit 200 µL Buffer AE 1 min bei 8.000 rpm eluiert und das Filtrat wurde bei -20°C gelagert.

Überprüfung der DNA-Reinheit

Von dem DNA-Extrakt wurden 2 µL in das Spektralphotometer NanoVue (GE Healthcare Life Sciences) gegeben und die Absorption bei den Wellenlängen 230 nm, 260 nm und 280 nm gemessen. Es wurden die Quotienten A260/A280 und A260/A230 gebildet, um die Reinheit der DNA festzustellen, wobei ein Quotient von 1,8 und 0,45 jeweils für reine DNA spricht.

3.3 Primer

Es wurden in der PCR zur Amplifikation der 18S rRNA-Gene folgende Primer verwendet:

Primerbezeichnung	Basensequenz	Schmelztemperatur (Herstellerangabe)
T18S1F (Burja, 2006)	5'-CAACCTGGTTGATCCTGCCAGTA-3'	65 °C
T18S5R (Burja, 2006)	5'-TCACTACGGAAACCTTGTTACGAC-3'	64 °C

Für die Sanger-Sequenzierung wurde ein Primerset aus sechs Primern verwendet:

Primerbezeichnung	Basensequenz	Schmelztemperatur (Herstellerangabe)
T18S1F	5'-CAACCTGGTTGATCCTGCCAGTA-3'	65 °C
FA2 (Mo et al., 2002)	5'-GTCTGGTGCCAGCAGCCGCG-3'	69 °C
FA3 (Mo et al., 2002)	5'-CTTAAAGGAATTGACGGAAG-3'	54 °C
T18S5R	5'-TCACTACGGAAACCTTGTTACGAC-3'	64 °C
R (Mo et al., 2002)	5'-GGCCATGCACCACCACC-3'	63 °C
RA1 (Mo et al., 2002)	5'-AGCTTTTAACTGCAACAAC-3'	52 °C

Alle Primer wurden von der Firma metabion international AG (Planegg, Deutschland) synthetisiert. Die Abbildung 2 zeigt die Position der Primer auf dem 18S rRNA-Gen von Stamm 1518d.

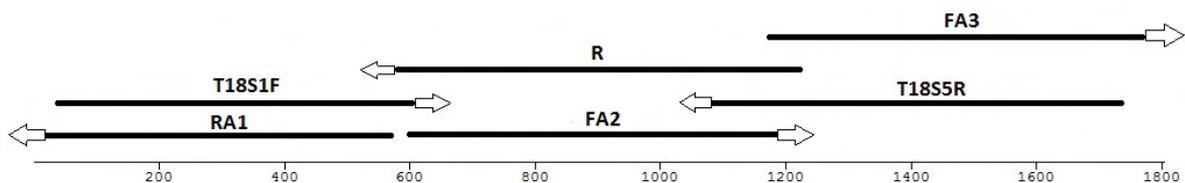


Abbildung 2: Positionen der Primer auf dem 18S rRNA-Gen von Stamm 1518d (*Thraustochytrium kinnei*)

3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR – englisch: polymerase chain reaction) wurde 1985 von Kary B. Mullis (Mullis, 1985) entwickelt. Diese Methode ermöglicht es, DNA-Moleküle milliardenfach zu vervielfältigen und auf diese Weise große Mengen an spezifischen DNA-Fragmenten herzustellen. Dazu dienen zwei Oligonukleotidprimer mit jeweils komple-

mentärer Sequenz zu dem gesuchten DNA-Abschnitt. Außerdem wird ein thermostabiles Enzym, welches die DNA-Synthese ausführt, benötigt. In diesem Fall handelt es sich um die Taq DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*, das sein Reaktionsoptimum bei 75°C hat. Die DNA-Amplifizierung ist eine sich wiederholende Abfolge von folgenden Reaktionsschritten: 1) Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei über 90°C. 2) Hybridisierung (Annealing) der Primer an die einzelsträngige Ziel-DNA, erreicht durch Abkühlung des Reaktionsansatzes auf die optimale Annealing-Temperatur. Eine zu niedrige Annealing-Temperatur fördert unspezifische Bindungen der Primer; bei einer zu hohen Annealing Temperatur wird die Hybridisierung der Primer verhindert. 3) Primer-Verlängerung (Elongation), bei der die Taq DNA-Polymerase den komplementären DNA-Strang synthetisiert und dieser somit nach dem letzten Schritt wieder als Doppelstrang vorliegt (Gassen und Schrimpf, 1999). Der verwendete PCR-Ansatz enthielt 12,5 µL DreamTag Green Mastermix (Fermentas), 1 µL Forward Primer (10 µM), 1 µL Reverse Primer (10 µM), 9,5 µL DNA-freies Wasser und 1 µL Template DNA (10-100 ng). Die PCR wurde mit folgendem Programm durchgeführt:

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	94	180	30 Zyklen
Denaturierung	94	45	
Annealing	64	30	
Elongation	72	120	
Finale Elongation	72	600	

3.5 Agarose-Gelelektrophorese

Um den Erfolg der Polymerase-Kettenreaktion zu überprüfen, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Agarose ist ein Polysaccharid, das aus roten Meeresalgen gewonnen und durch Aufkochen in Puffer gelöst wird und beim anschließenden Abkühlen geliert. Dabei bilden sich aus den Polysacchariden Doppelhelices, die sich in Gruppen parallel zu Fäden zusammenlagern. So entsteht ein feinporiges Gel (Viovy, 2000). Unter elektrophoretischen Bedingungen sind die Phosphatgruppen im Rückgrat einer Nukleinsäure ionisiert und die Poly(desoxy)nukleotide liegen als Polyanionen vor. Sie bewegen sich somit im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Die Geschwindigkeit, mit der das Molekül durch die Poren des Agarosegels wandert, hängt weitgehend von seiner Größe ab. Somit werden die DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt. Je kürzer das DNA-Fragment, desto ungehinderter und damit schneller wandert es durch die Poren des Agarosegels. Für die Agarose-Gelelektrophorese wurde ein 1%-iges Gel aus 0,4g Agarose, 40 mL 1x TBE-Puffer und 4 µL SYBR® Safe DNA gel stain (10.000x Konzentrat in DMSO, Invitrogen) gegossen. Aufgrund des schon im DreamTag Mastermix enthaltenen Ladepuffers konnten die PCR-Produkte direkt

in die Geltaschen des Agarosegels gegeben werden. Es wurden jeweils 5 μL in die Geltaschen pipettiert. Zur Kontrolle der Größenbestimmung wurde der DNA Molecular Weight Marker 1 kb von peqLab ebenfalls im Gel aufgetrennt. Der Gellauf erfolgte bei 150V für ca. 20 Minuten. Mithilfe der Gel-Jet-Imager Dokumentationsanlage (INTAS) wurde das Gel unter UV-Licht digitalisiert.

3.6 Sequenzierung

Im Anschluss an die Polymerase-Kettenreaktion wurden die positiven Proben mit DNA-freiem Wasser verdünnt, da für die Sequenzierreaktionen 10 μL PCR-Produkt pro Primer benötigt wurden. Die PCR-Produkte wurden dann in eine 96-Well-Platte gegeben und die Primer in separaten Mikroreaktionsgefäßen auf eine Konzentration von 3,2 μM verdünnt. Alles zusammen wurde zur Sequenzierung an das Institut für Klinische Molekularbiologie des Universitätsklinikums Kiel übergeben. Dort wurden alle Proben zunächst enzymatisch mit je 0,15 μL Exonuklease I (20 U/ μL) und 0,6 μL FAP(1 U/ μL) für 10 min bei 37°C aufgereinigt und dann 15 min bei 72°C alle Enzyme inaktiviert (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Reaktionsansatz für enzymatische Aufreinigung

	Konzentration [U/μL]	Volumen pro Reaktionsansatz [μL]
HPLC-Wasser (dH ₂ O)		1,25
FAP	1,0	0,6
Exonuklease I	20,0	0,15
PCR-Produkt		8,0
Endvolumen		10,0

Die PCR-Produkte wurden mit einem 3730xl DNA-Analyzer von der Firma ABI sequenziert. Das Sequenzierverfahren beruht auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger et al. (Sanger, 1977). Hierbei handelt es sich um eine enzymatische Methode, bei der die zu analysierende DNA als Matrize für die Synthese neuer DNA-Fragmente dient. Die DNA wird zuerst in eine einzelsträngige Form überführt. Diese Matrizen-DNA wird mit einem Oligonukleotid, dem Sequenzierprimer, hybridisiert. Ausgehend von diesem Primer erfolgt die Synthese des zur Matrize komplementären Stranges. Für die DNA-Synthese wird ein Reaktionsansatz mit folgenden Bestandteilen hergestellt: Matrizen-DNA, Primer, DNA-Polymerase, alle vier 2'-Desoxynukleotidtriphosphate und zusätzlich jeweils 2',3'-Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTPs: ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP), die mit 4 unterschiedlichen Fluorophoren versehen sind. Die DNA-Polymerase akzeptiert dabei sowohl die dNTPs als auch das jeweilige ddNTP. Wird ein ddNTP eingebaut, stoppt die Reaktion. Aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxygruppe kann kein weiteres Nukleotid angefügt werden. So entsteht in dem Reaktionsansatz eine Mi-

schung an DNA-Fragmenten unterschiedlichster Kettenlänge (Gassen und Schrimpf, 1999). Die entstandenen Segmente verschiedener Länge werden mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und die Fluoreszenzfarbstoffe im Laserstrahlengang aufgezeichnet. Anschließend wird daraus die Nukleotidreihenfolge ermittelt. In Verbindung mit dem ABI Sequenzer wurde das Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit verwendet (Tabelle 3). Für das Cycle-Sequencing wurde das PCR-Protokoll aus Tabelle 4 verwendet.

Tabelle 3: Reaktionsansatz für das Cycle-Sequencing

	Konzentration [μM]	Volumen pro Reaktionsansatz [μL]
HPLC-Wasser (dH ₂ O)		4,8
Big Dye v1.1		0,7
5x SB		1,5
Primer	3,2	1,0
PCR-Produkt (aufgereinigt)		2,0
Endvolumen		10,0

Tabelle 4: Protokoll für die Sequenzierreaktion

PCR-Schritt	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Dauer [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	96	60	30 Zyklen
Denaturierung	96	10	
Annealing	50	5	
Elongation	60	240	
Endtemperatur	10		

3.7 ChromasPro und BLAST-Suche

Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden vom IKMB als Elektropherogramme zugeschickt. Die einzelnen Sequenzabschnitte wurden mit dem Programm ChromasPro (Version 1.34) zusammengesetzt und manuell einzelne Basen korrigiert. Die zusammengeschnittenen Sequenzen wurden als .fasta-Dateien gespeichert und in die BLAST-Suche (Basic Local Alignment Search Tool) des NCBI (National Center for Biotechnology Information) eingegeben (Altschul et al., 1990).

3.8 Phasenkontrastmikroskopie

Alle 39 Stämme wurden in 24-well Platten in jeweils 1 mL BITM und TSN+TM Flüssigmedium bei 28 °C und 150 rpm kultiviert. Es wurde jeden Tag unter dem Binokular kontrolliert, ob Wachstum stattfindet. Sobald dies der Fall war, wurde ein Präparat für die Phasenkontrastmi-

kroskopie hergestellt und digitale Aufnahmen gemacht, um das Wachstum zu beobachten und die Stämme morphologisch zu vergleichen. Es wurde mit dem Mikroskop Axioskop 40 von Zeiss gearbeitet und das Objektiv EC PLAN-NEO-FLUAR 100x/1,3 Oil/Ph3 sowie das Okular W-P/10x/23 verwendet.

3.9 Rasterelektronenmikroskopie

Es wurden nach der Sequenzierung vier Stämme ausgewählt, die nach der Auswertung unterschiedlichen Gattungen bzw. Arten zugeordnet werden konnten. Diese Stämme haben die Stammbezeichnungen 6423, 6006d, 1518e und 6000b. Zur Vorbereitung für die Rasterelektronenmikroskopie wurden diese Stämme, welche sich in 1mL Flüssigmedium BITM befanden und sieben Tage bei 150 rpm und 28 °C inkubiert wurden, zunächst mit Formaldehyd fixiert (Endkonzentration 1%). Anschließend wurden die Zellen mit einem Spritzenvorsatzfilter (Porengröße 0,2 µm) abfiltriert. Zur Trocknung wurde der Filter jeweils 10 Minuten in 30% Ethanol, 50% Ethanol, 70% Ethanol, 90% Ethanol und abschließend dreimal in absolutem Ethanol gelagert. Zur vollständigen Trocknung wurden die Filter mit den Zellen in einen Kritisch-Punkt-Trockner gelegt (Balzers, CPD 030). Dort wurde die Probenkammer zunächst achtmal mit flüssigem CO₂ bei 4°C gespült. Langsam wurde dann die Temperatur und der Druck auf 32°C und 73,5 bar erhöht (kritischer Punkt von CO₂). Nach diesem Vorgang wurde die Temperatur wieder auf Raumtemperatur und der Druck auf Normaldruck erniedrigt. Die Filter mit den trockenen Zellen wurden auf einen Träger geklebt und in dem Sputter SCD 004 von Balzers mit einer Gold-Paladium-Legierung bedampft. Mikroskopiert wurden die Stämme mit dem Rasterelektronenmikroskop DSM 940 von Zeiss, mit dem die Bilder auch digital gespeichert werden konnten.

3.10 Phylogenetische Analyse mit ClustalX

Nachdem alle Sequenzen manuell auf die gleiche Länge geschnitten und mit dem Programm ClustalX (version 2.1.0.0) (Jeanmougin et al., 1998) aligned wurden, konnte ein phylogenetischer Stammbaum erstellt werden. Der Stammbaum wurde mit der "neighbor-joining"-Methode nach Saitou und Nei (1987) mit 1000 bootstrap trails konstruiert. Gezeichnet wurde der Baum mit dem Programm njplot. Um die Stämme besser einordnen zu können, wurden ähnliche Sequenzen bekannter Stämme aus der Datenbank des NCBI (National Center for Biotechnology Information) hinzugefügt.

4 Ergebnisse

4.1 Sequenzierung

Von den 31 Stämmen, die im gewählten Nährmedium gewachsen sind, konnte von 13 Stämmen nahezu die komplette 18S rRNA-Sequenz sequenziert werden. Bei den anderen Stämmen ist entweder schon kein PCR-Produkt mit den Primern T18S1F und T18S5R entstanden oder die Sequenzierung mit den Primern T18S1F, FA2, FA3, T18S5R, R und RA1 hat nur teilweise funktioniert, da die meisten Sequenzen unsauber waren. Die Sequenzen der in Tabelle 5 aufgelisteten Stämme wurden im Anhang 1 angefügt.

Die 13 erhaltenen 18S rRNA-Sequenzen wurden in die BLAST-Suche des NCBI eingegeben (Stand: 11.11.2014) und so mit Sequenzen von bereits identifizierten Thraustochytriden verglichen (Tabelle 5).

Tabelle 5: Ergebnisse der BLAST-Suche und Länge der erhaltenen Sequenzen

Stammbezeichnung	Länge der Sequenz [bp]	Nächste verwandte Art	Query coverage	Identity
1518d	1806	<i>Thraustochytrium kinnei</i>	99%	99%
1518e	1805	<i>Thraustochytrium kinnei</i>	99%	99%
1526d	1787	<i>Thraustochytrium kinnei</i>	99%	99%
1527a	1770	<i>Thraustochytrium kinnei</i>	99%	99%
1527c	1807	<i>Thraustochytrium kinnei</i>	99%	99%
1709d	1796	<i>Thraustochytrium kinnei</i>	99%	99%
2845c	1763	<i>Thraustochytrium kinnei</i>	99%	99%
6000b	1814	<i>Ulkenia aff. visurgensis</i>	95%	100%
6002a	1805	<i>Thraustochytrium aureum</i>	99%	99%
6005a	1805	<i>Thraustochytrium aureum</i>	99%	99%
6006d	1799	<i>Thraustochytrium aureum</i>	99%	99%
6006e	1778	<i>Thraustochytrium aureum</i>	99%	98%
6423	1779	Uncultured Chytridiomycota clone T5P2AeG04	99%	95%

Die Suchergebnisse zeigen, dass nicht alle Stämme den Thraustochytriaceae angehören. Stamm 6423 ist wahrscheinlich ein Pilz, doch es gibt noch keine übereinstimmende Sequenz einer bestimmten Art in der Datenbank des NCBI. Die 18S rRNA-Sequenz hat in diesem Fall zu keiner eindeutigen Identifikation geführt. Es können von diesem Stamm nur die morphologischen Cha-

rakteristika helfen, ihn näher zu bestimmen. Die Sequenzen der anderen Stämme zeigen eine sehr hohe Übereinstimmung zu den Arten *Thraustochytrium kinnei*, *Ulkenia visurgensis* und *Thraustochytrium aureum*.

Nicht identifizierte Stämme

Von den 18 Stämmen, die aufgrund fehlender oder nicht vollständiger Sequenzen, nicht identifiziert werden konnten, haben die Primer T18S1F und T18S5R bei 8 Stämmen zu keinem PCR-Produkt geführt (3401, 5905, 1438e, 1450d, 1531c, 4930b, 4992b und 5676f), da sie nicht an die DNA binden konnten. Bei den restlichen 10 Stämmen ist zwar ein PCR-Produkt entstanden, aber die Sequenzierung hat nur unsaubere oder unvollständige Sequenzen hervorgebracht, die nicht zusammengefügt werden konnten. In Tabelle 6 sind die Stämme und die Länge der erhaltenen Sequenzen der einzelnen Primer aufgeführt.

Tabelle 6: Nicht identifizierte Stämme und die Sequenzlängen der PCR-Produkte bei Verwendung der Primer in bp

Stammbezeichnung	T18S1F	FA2	FA3	T18S5R	R	RA1
5661	662	119	638	789	499	585
1462d	635	116	321	254	490	601
1465d	650	113	322	261	490	601
1471d	648	117	325	257	495	591
1471f	643	113	325	257	495	603
1472e	614	110	325	231	490	602
1473e	650	110	326	254	491	601
1476b	650	113	325	254	492	602
4930a	613	81	207	0	555	593
5629e	642	120	638	733	500	587

Es fällt auf, dass bei fast allen Stämmen die Sequenzen immer an der selben Stelle unsauber bzw. überlagert werden, sodass mit FA2 Sequenzen mit einer Länge von ca. 110 bp, mit FA3 Sequenzen mit einer Länge von ca. 325 bp und mit T18S5R Sequenzen mit einer Länge von ca. 250 bp entstanden sind. Die einzelnen Primer müssen aber Sequenzen von mindestens 500 bp hervorbringen, damit die Sequenzen sich überlagern und man sie zur kompletten 18S rRNA zusammenfügen kann. Die Stämme 5661, 4930a und 5629e weichen von diesem Muster ab, doch auch bei ihnen hat mindestens ein Primer eine viel zu kurze Sequenz hervorgebracht.

Phylogenetischer Stammbaum

Es wurden alle 13 nahezu vollständigen 18S rRNA-Sequenzen auf eine Länge von 1760 bp gekürzt, um eine bessere Vergleichbarkeit zu erzielen. Die Sequenzen der nächsten verwandten Arten wurden aus der Datenbank des NCBI heruntergeladen und zur Berechnung des phylogenetischen Stammbaumes hinzugefügt. Alle Sequenzen wurden aligned und mit dem Programm ClustalX ein Stammbaum nach der neighbor-joining-Methode berechnet (siehe Abbildung 3).

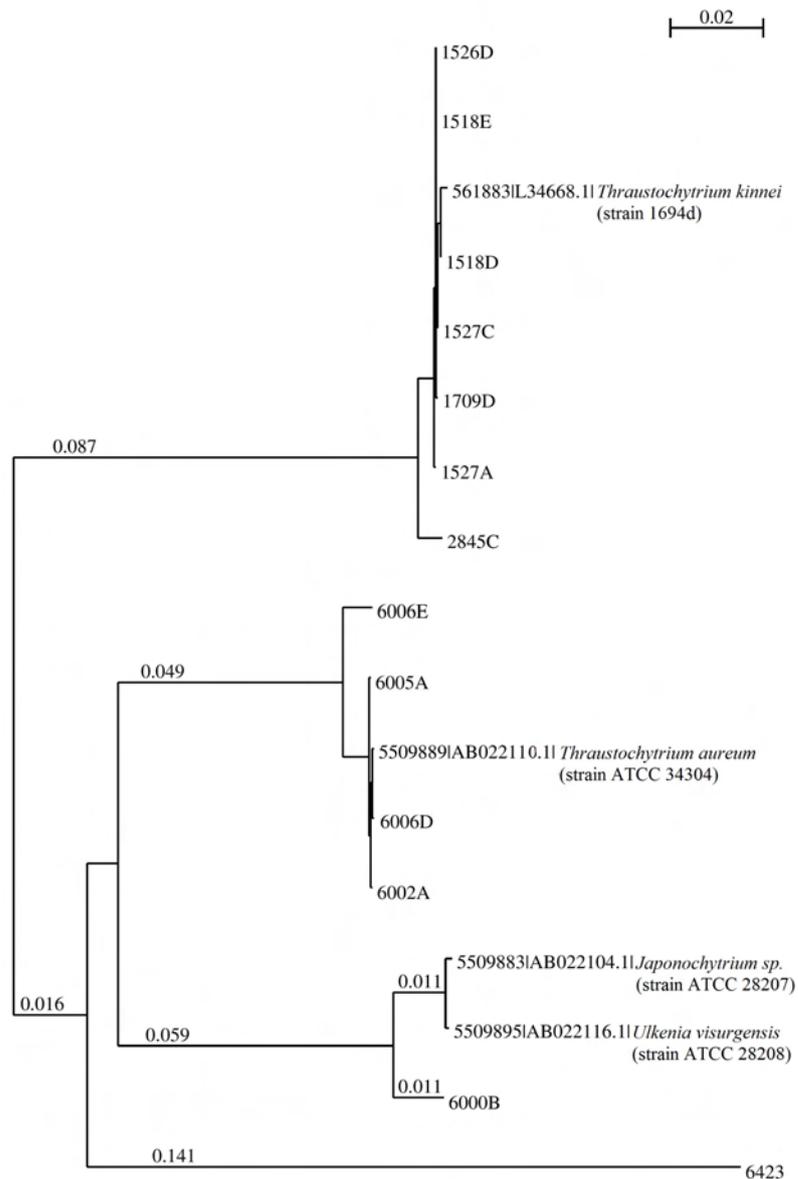


Abbildung 3: Phylogenetischer Stammbaum der sequenzierten Stämme mit einigen 18S rRNA Sequenzen aus der Datenbank des NCBI. Alle Sequenzen und NCBI Accession numbers sind im Anhang dieser Arbeit.

Die neighbor-joining-Methode gehört zu den Matrix-orientierten Methoden. Die vorhandenen Sequenzen werden hierbei in Distanzmatrizen konvertiert. Die berechneten Distanzen werden als Länge der Äste des Stammbaumes ausgedrückt. Der berechnete phylogenetische Baum bestätigt die Ergebnisse der BLAST-Suche. Es wurde keine zusätzliche Outgroup eingefügt, da der Stamm 6423 mit einer Distanzlänge von 0,141 selbst relativ weit von den übrigen Sequenzen entfernt ist.

4.2 Phasenkontrast- und Rasterelektronenmikroskopie

Identifizierte Stämme

Im folgenden werden die Ergebnisse der Mikroskopie dargestellt mit einem direkten Vergleich der Kultivierung in B1TM- und TSN+TM-Medium. Außerdem werden die vier Stämme, die noch genauer mit der Rasterelektronenmikroskopie untersucht wurden, mit eingebunden. Die Stämme sind nach Artzugehörigkeit geordnet. Zuerst werden die Aufnahmen der Stämme gezeigt, die als *Thraustochytrium kinnei* identifiziert wurden, danach folgen die Aufnahmen von *Thraustochytrium aureum* und *Ulkenia visurgensis* und abschließend die Bilder des unbekanntes Stammes 6423. Alle lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden bei einer Vergrößerung von 10 x 100 gemacht.

1518e (*Thraustochytrium kinnei*)

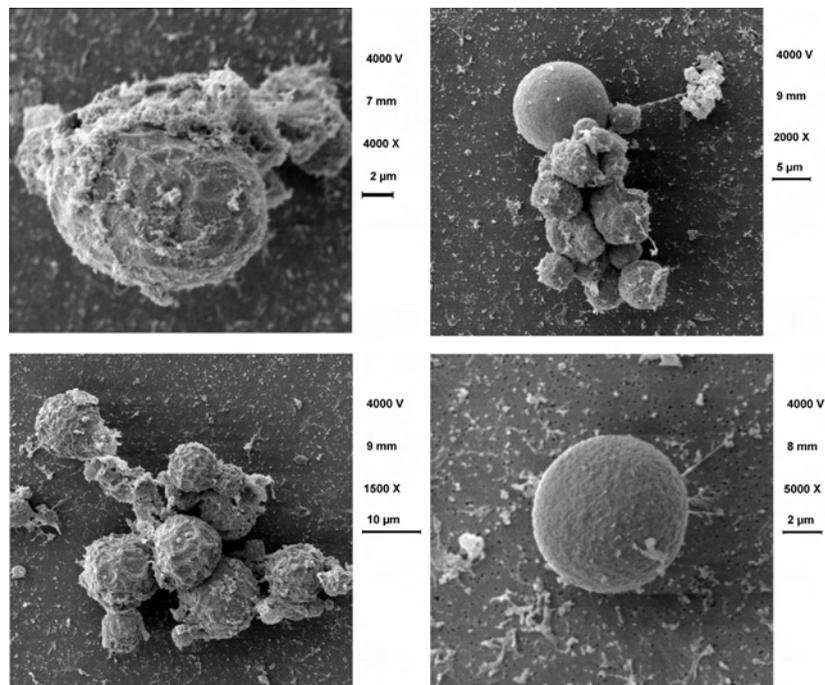


Abbildung 4: REM-Aufnahmen des Stammes 1518e, kultiviert in B1TM-Medium. Viele der Zellen waren anscheinend tot oder sind durch die Probenpräparation in sich zusammengefallen und die schuppige Zellwand hat sich teilweise abgelöst (oben links und unten links). Die vegetativen Zellen hatten einen Durchmesser von ca. 10 µm und einige haben ein ektoplasmatisches Netz ausgebildet (oben rechts und unten rechts.)

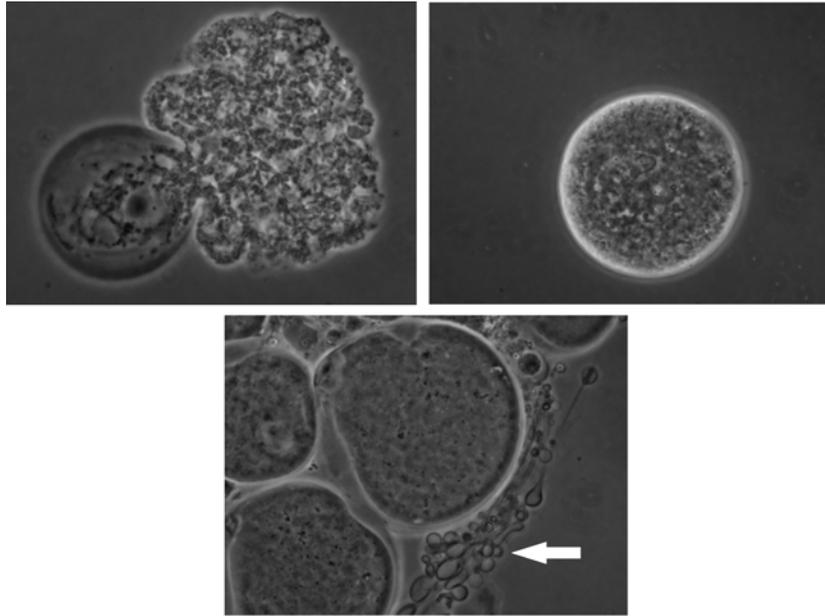


Abbildung 5: Phasenkontrastmikroskopie-Aufnahmen des Stammes 1518e, kultiviert in B1TM-Medium. Einige Zellen dieses Stammes haben ihr Cytoplasma nach außen entlassen (oben links). Auffällig war außerdem, dass je älter die Kultur war, immer mehr knollenartige Auswüchse sichtbar waren (unten, 10 Tage alte Kultur).

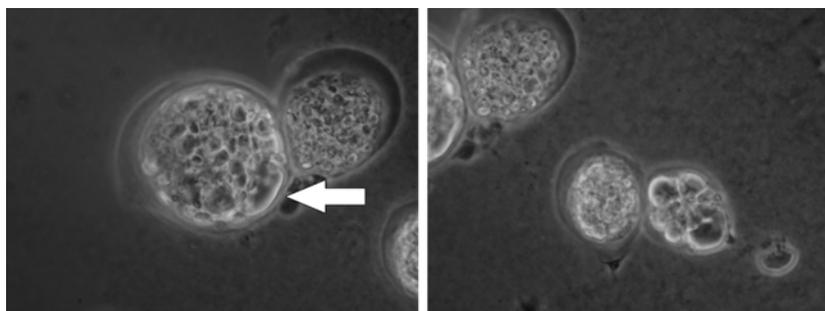


Abbildung 6: Phasenkontrastmikroskopie-Aufnahmen des Stammes 1518e, kultiviert in TSN+TM-Medium. Es sind nur wenige Zellen in diesem Medium gewachsen und diese hatten sehr viel Lipideinschlüsse im Inneren. Außerdem sah es so aus, als würde die Zellmembran nicht mehr direkt an der Zellwand anliegen, da die Zellen geschrumpft sind (links).

1518d (*Thraustochytrium kinnei*)

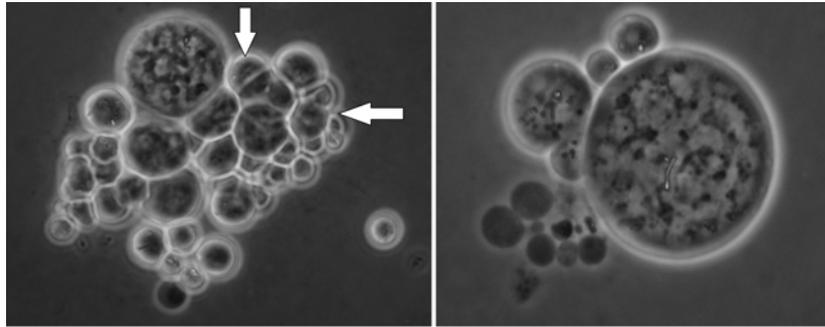


Abbildung 7: Phasenkontrastmikroskopie-Aufnahmen des Stammes 1518d, kultiviert in B1TM-Medium. Bei diesem Stamm konnte nur Zellteilung und keine Sporenbildung beobachtet werden (links). Die vegetativen Zellen hatten dunkle Granula im Inneren.

Im Medium TSN+TM konnte kein Wachstum von Stamm 1518d beobachtet werden und nach mehrmaligem Mikroskopieren war die Kultur auch kontaminiert.

1526d (*Thraustochytrium kinnei*)

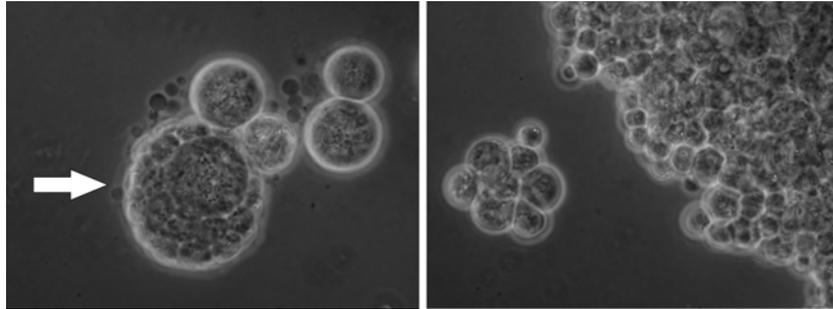


Abbildung 8: Phasenkontrastmikroskopie-Aufnahmen des Stammes 1526d, kultiviert in B1TM-Medium. Einfach-sprossende Sporangien (links) und Koloniebildung (rechts) war charakteristisch für diesen Stamm.

Beim Stamm 1526d konnte im TSN+TM-Medium ebenfalls kein Wachstum beobachtet werden.

1527a (*Thraustochytrium kinnei*)

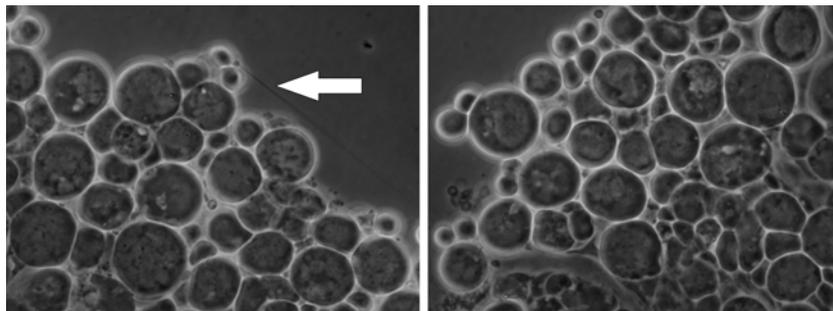


Abbildung 9: Phasenkontrastmikroskopie-Aufnahmen des Stammes 1527a, kultiviert in B1TM-Medium. Dieser Stamm bildete große Kolonien, es gab keine Sporenbildung und vereinzelt war ein ectoplasmatisches Netz sichtbar (links).

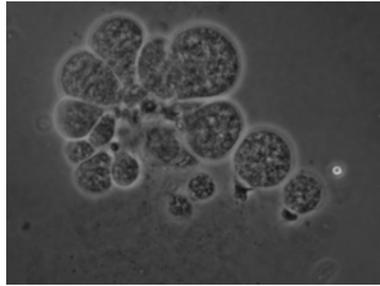


Abbildung 10: Phasenkontrastmikroskopie-Aufnahmen des Stammes 1527a, kultiviert in TSN+TM-Medium. Es war kein Wachstum erkennbar.

1527c (*Thraustochytrium kinnei*)

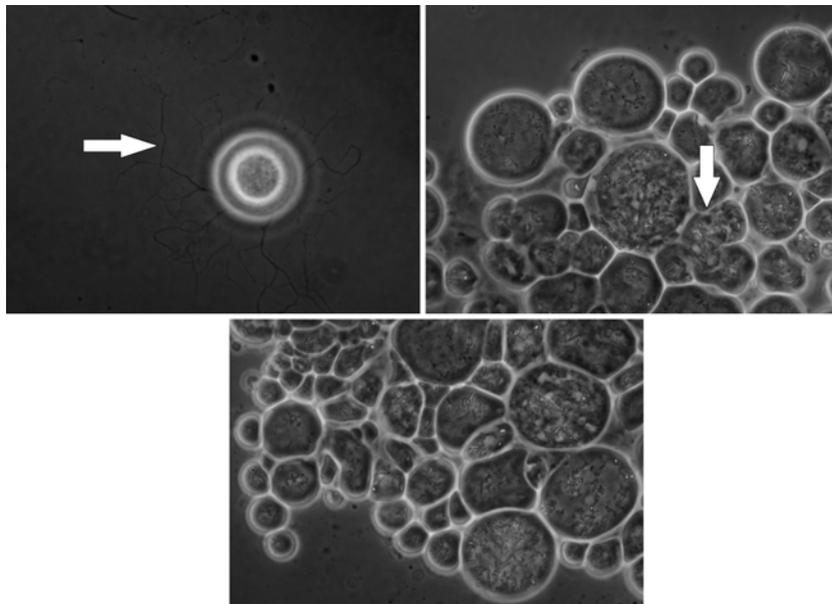


Abbildung 11: Phasenkontrastmikroskopie-Aufnahmen des Stammes 1527c, kultiviert in B1TM-Medium. Einzelne Zellen haben ein ausgeprägtes ectoplasmatisches Netz gebildet (oben links). Vermehrung fand nur durch Zellteilung statt (oben rechts) und es wurden große Kolonien gebildet (unten).

Im Medium TSN+TM fand bei Stamm 1527c wieder kein Wachstum statt.

1709d (*Thraustochytrium kinnei*)

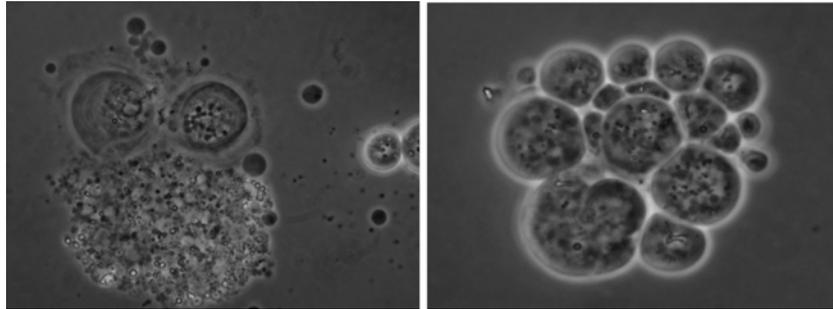


Abbildung 12: Phasenkontrastmikroskopie-Aufnahmen des Stammes 1709d, kultiviert in B1TM-Medium. Die Aufnahmen zeigen, dass auch bei diesem Stamm einige Zellen ihr Cytoplasma nach außen entlassen haben (links) und sich zu Kolonien zusammengefügt haben (rechts).

Stamm 1709d ist nicht im Medium TSN+TM gewachsen.

2845c (*Thraustochytrium kinnei*)

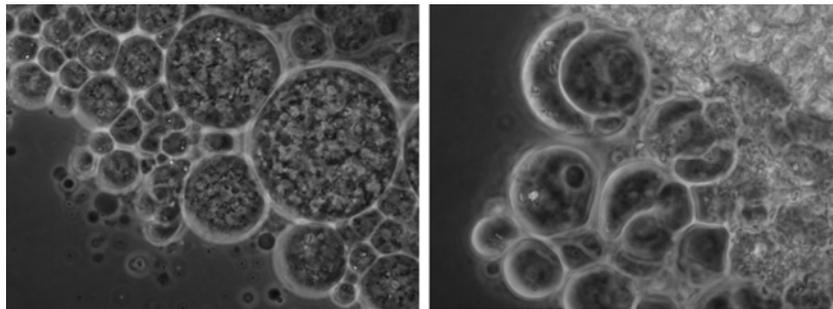


Abbildung 13: Phasenkontrastmikroskopie-Aufnahmen des Stammes 2845c, kultiviert in B1TM-Medium. Die vegetative Zellen haben dunkle Granula im Inneren (links). Es konnten aber auch Zellen beobachtet werden, die nicht rund oder oval waren, sondern bananenförmig oder anders förmig (rechts).

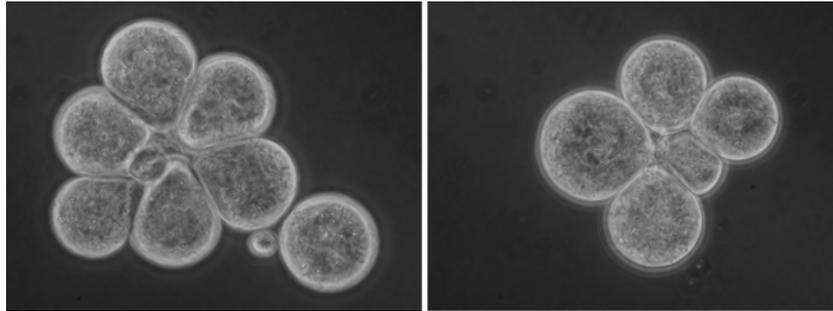


Abbildung 14: Phasenkontrastmikroskopie-Aufnahmen des Stammes 2845c, kultiviert in TSN+TM-Medium. Das Cytoplasma ist deutlich heller als im B1TM-Medium und die Zellen fügen sich zu Kolonien mit fünf oder sechs Zellen zusammen.

Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass es einige Unterschiede zwischen den Stämmen gibt. Es wurde sowohl Zellteilung (1518d, 1527c, 1527a) als auch Sporenbildung (1526d) als Vermehrungsmechanismus beobachtet. Es sind alle Stämme im B1TM-Medium gewachsen, während im TSN+TM-Medium nur Stamm 2845c deutliches Wachstum zeigte und sich von den anderen Stämmen dadurch unterschied, dass das Cytoplasma auffällig hell war und die Zellen sich in Kolonien von fünf bis sechs Zellen zusammenlagerten. Bei den anderen Stämmen waren die Kolonien meist viel größer. Die Zellen von 1518e waren im TSN+TM-Medium deutlich geschrumpft und hatten große Lipideinlagerungen. Es haben nicht alle Stämme ein ektoplasmatisches Netz ausgebildet, was daran liegen könnte, dass die Kulturen geschüttelt wurden. Bei 1518e konnten außerdem knollenartige Auswüchse bei der älteren Kultur beobachtet werden. Harel et al. (2008) beschrieb diese Auswüchse ebenfalls. Sie traten bei seinen Versuchen nur in Kulturen in nährstoffarmem Medium auf. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass bei 1518e die Nährstoffe im Medium aufgebraucht waren. Auffällig war auch, dass einige Zellen ihr Cytoplasma durch eine Öffnung in der Zellwand nach außen verloren haben. Dies konnte Harel et al. ebenfalls bei Kulturen beobachten, die auf marinem Agar gewachsen waren.

6006d (*Thraustochytrium aureum*)

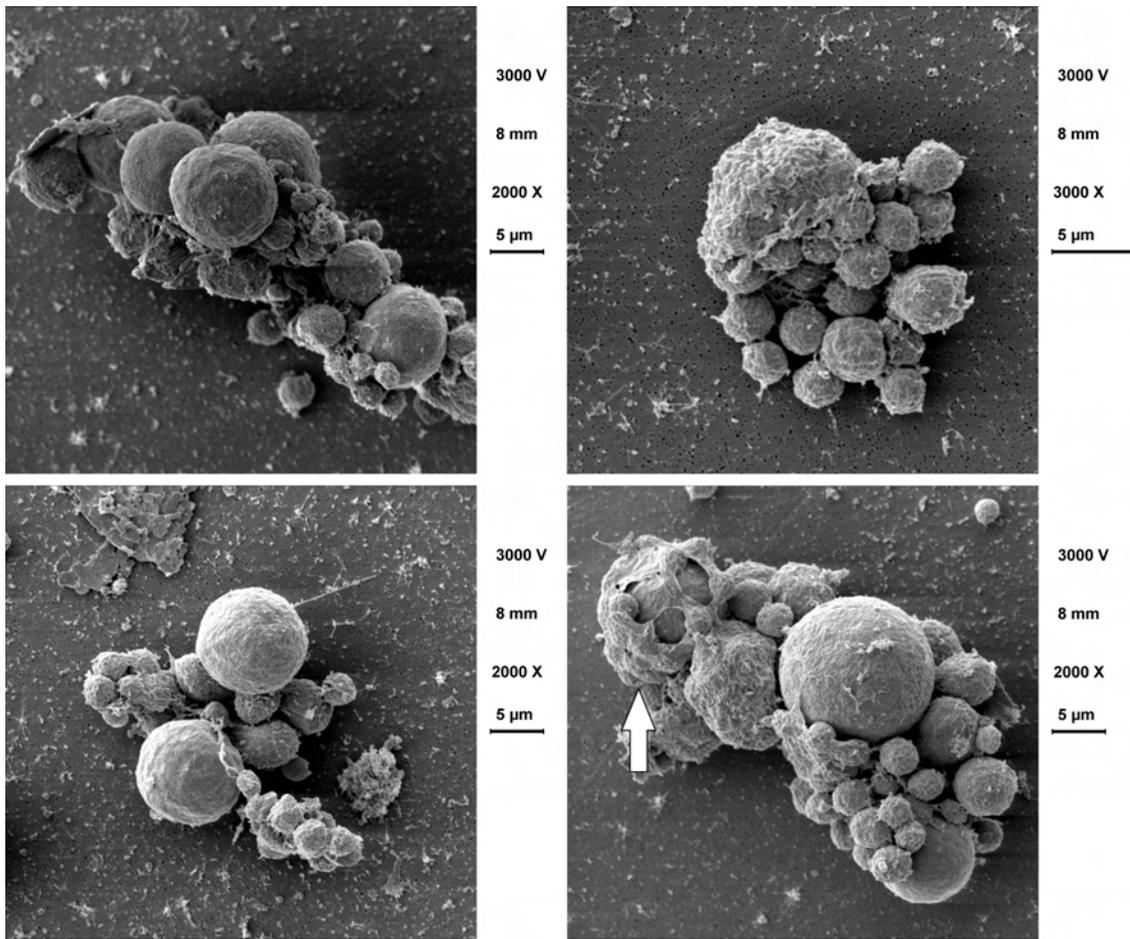


Abbildung 15: REM-Aufnahmen des Stammes 6006d, kultiviert in BITM-Medium. Die vegetativen Zellen hatten einen Durchmesser von 10 bis 15 μm und die Sporen waren ca. 2 μm groß. Es konnten einfach-sprossende Sporangien beobachtet werden (unten rechts).

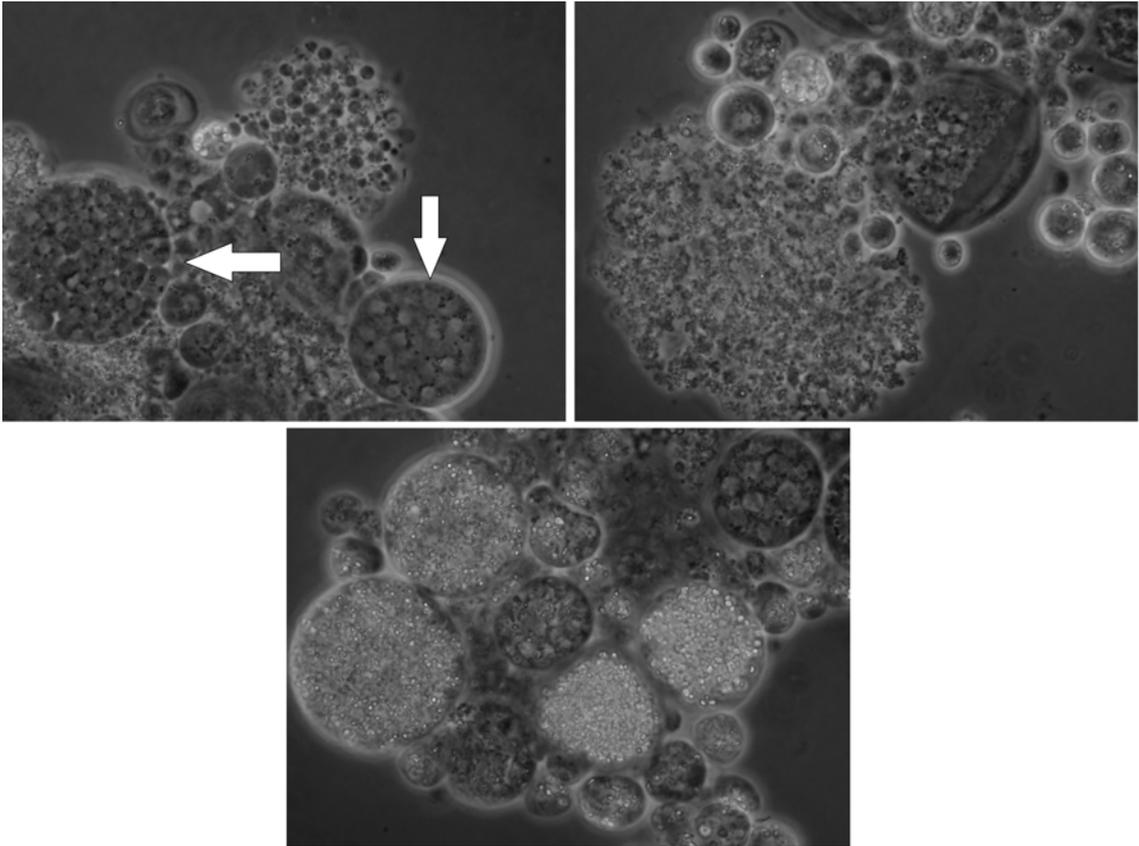


Abbildung 16: Phasenkontrastmikroskopie-Aufnahmen des Stammes 6006d, kultiviert in BITM-Medium. Es konnten Sporangien beobachtet werden (oben links). Oben rechts ist eine Zelle zu sehen, die ihr Cytoplasma nach außen entlassen hat und in sich zusammengefallen ist. Die vegetativen Zellen hatten ein sehr helles Cytoplasma (unten).

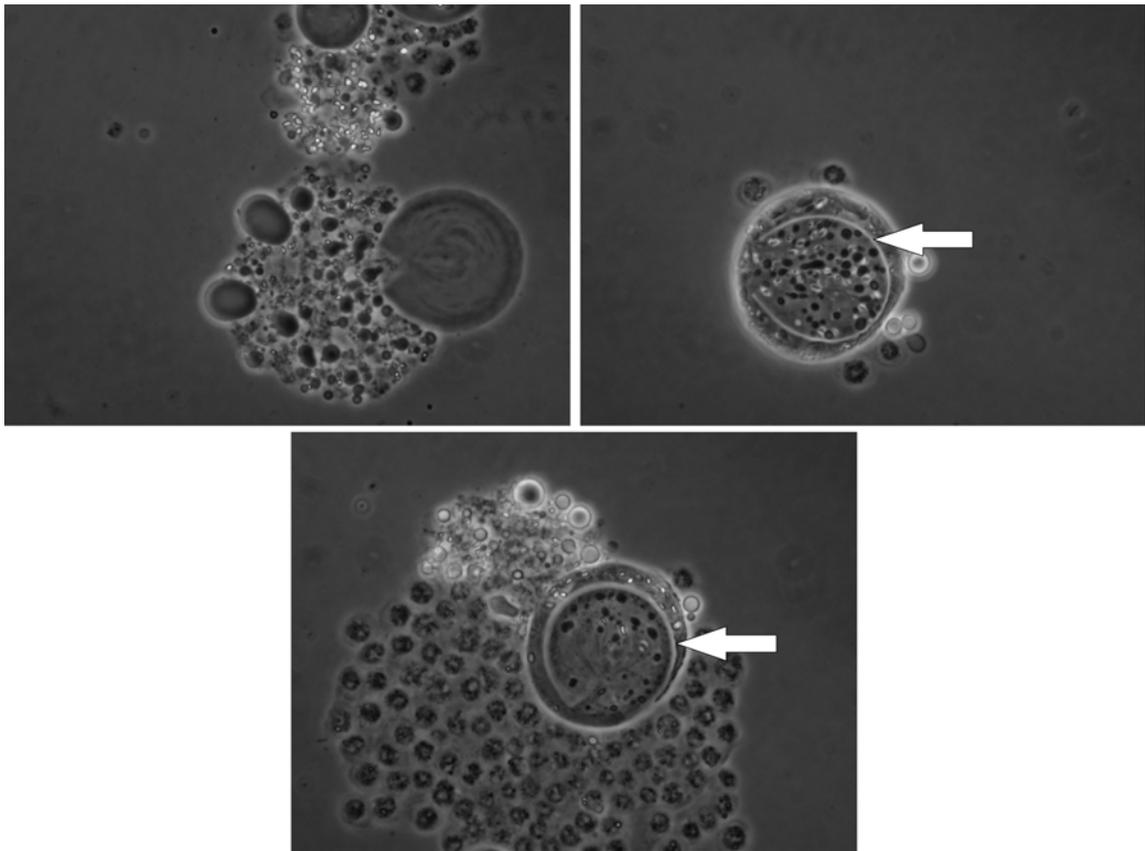


Abbildung 17: Phasenkontrastmikroskopie-Aufnahmen des Stammes 6006d, kultiviert in TSN+TM-Medium. Auch in diesem Medium gab es Zellen, die ihr Cytoplasma nach außen verloren haben (oben links). Es konnten Zellen beobachtet werden, die einen hellen Ring im Inneren besaßen, der an einer Stelle geöffnet war (oben rechts und unten).

6002a (*Thraustochytrium aureum*)

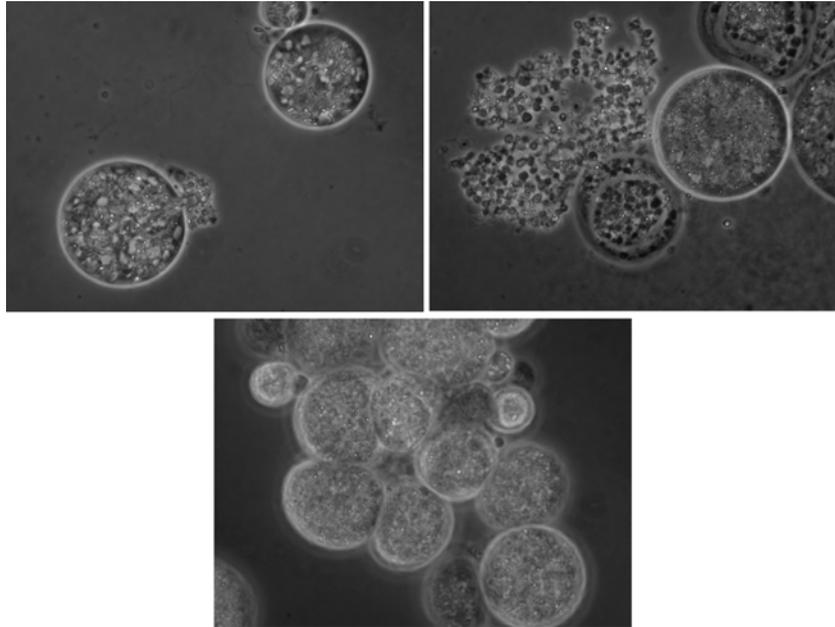


Abbildung 18: Phasenkontrastmikroskopie-Aufnahmen des Stammes 6002a, kultiviert in BITM-Medium. Bei diesem Stamm gab es viele Zellen, bei denen das Cytoplasma aus den Zellen gelaufen ist (oben rechts und links). Je älter die Kultur wurde, desto mehr helle Zellbestandteile konnten in den vegetativen Zellen beobachtet werden (unten).

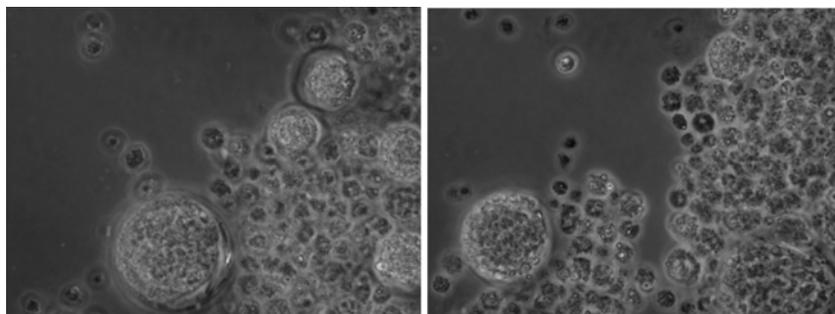


Abbildung 19: Phasenkontrastmikroskopie-Aufnahmen des Stammes 6002a, kultiviert in TSN+TM-Medium. In diesem Medium konnten bei diesem Stamm viele Lipideinschlüsse beobachtet werden.

6005a (*Thraustochytrium aureum*)

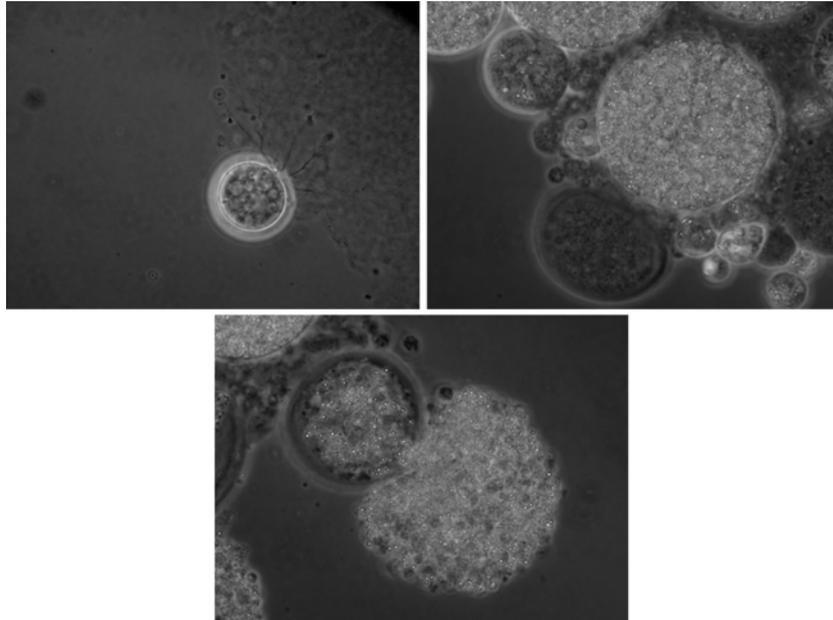


Abbildung 20: Phasenkontrastmikroskopie-Aufnahmen des Stammes 6005a, kultiviert in B1TM-Medium. Von einzelnen Zellen wurden ektoplasmatische Netze gebildet (oben links). Auch hier zeigten sich heller werdende Zellbestandteile je älter die Kultur wurde (oben rechts) und einige Zellen haben ihr Cytoplasma nach außen entlassen (unten).

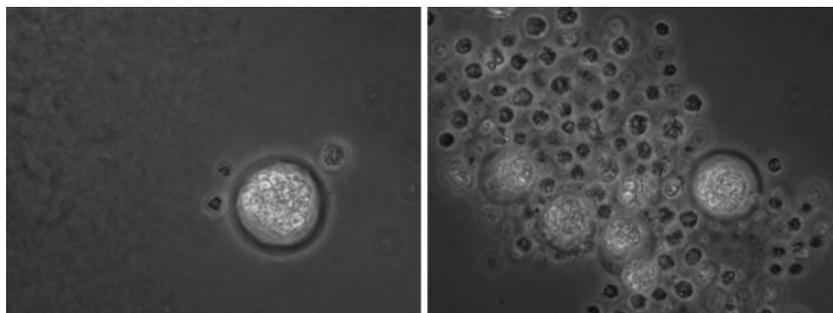


Abbildung 21: Phasenkontrastmikroskopie-Aufnahmen des Stammes 6005a, kultiviert in TSN+TM-Medium. Die Zellen wirken verkümmert und weisen viel Lipide im Inneren auf.

6006e (*Thraustochytrium aureum*)

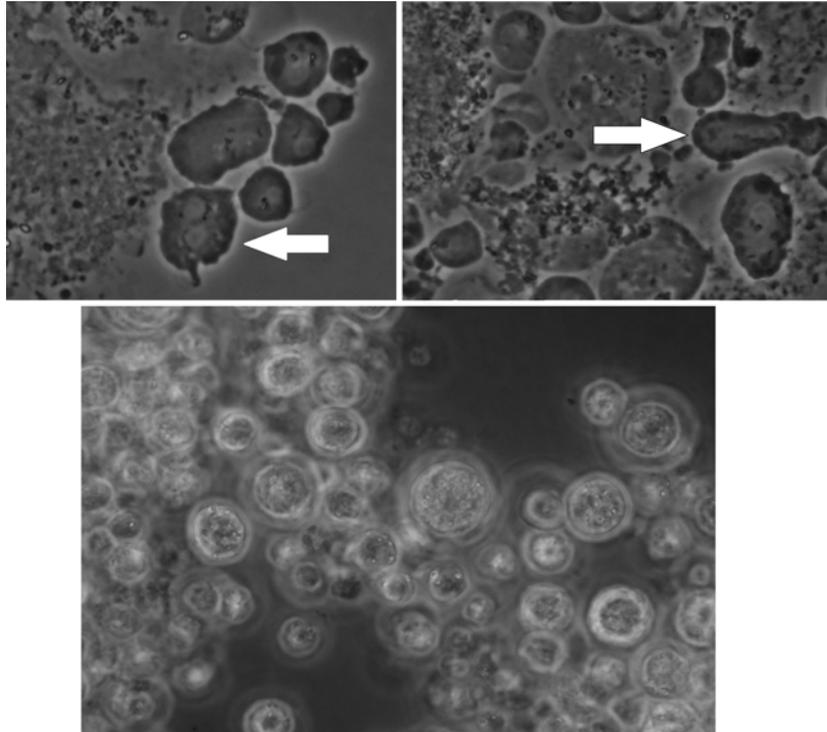


Abbildung 22: Phasenkontrastmikroskopie-Aufnahmen des Stammes 6006e, kultiviert in B1TM-Medium. Neben den normalen runden Zellen (unten), konnten auch amöboide Zellen beobachtet werden (oben links und rechts).

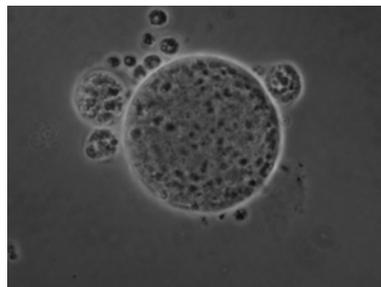


Abbildung 23: Phasenkontrastmikroskopie-Aufnahmen des Stammes 6006e, kultiviert in TSN+TM-Medium. In diesem Medium gab es keine auffälligen Merkmale. Wachstum fand nur begrenzt statt.

Die Stämme 6006d, 6002a und 6005a waren vom Erscheinungsbild alle relativ homogen. Bei allen konnten Zellen beobachtet werden, die ihr Zellinneres nach außen entlassen haben und das Cytoplasma war sehr hell. Im TSN+TM-Medium fand nur begrenzt Wachstum statt und auch hier wirkten die Zellen verkümmert und hatten Lipide in ihrem Inneren gelagert. Nur bei 6006d konnte Vermehrung durch einfach-sprossende Sporangien beobachtet werden. Der Stamm 6006d wies außerdem bei einigen Zellen im Inneren einen hellen Ring auf, der an einer Seite geöffnet war. Bei Stamm 6006e konnten amöboide Zellen beobachtet werden. Dies ist eigentlich ein Charakteristikum für *Ulkenia*, doch kann dieser Stamm der 18S rRNA nach der Gattung *Thraustochytrium* zugeordnet werden. Raghukumar (1992) beschrieb in einer Veröffentlichung, dass die Gattungen *Thraustochytrium* und *Schizochytrium* in Anwesenheit von Bakterien in der Lage sind amöboide Zellen zu formen und Phagozytose zu betreiben. Dies zeigt, dass die Thraustochytriden sich nicht nur von toter organischer Materie, sondern auch von Bakterien ernähren können.

6000b (*Ulkenia visurgensis*)

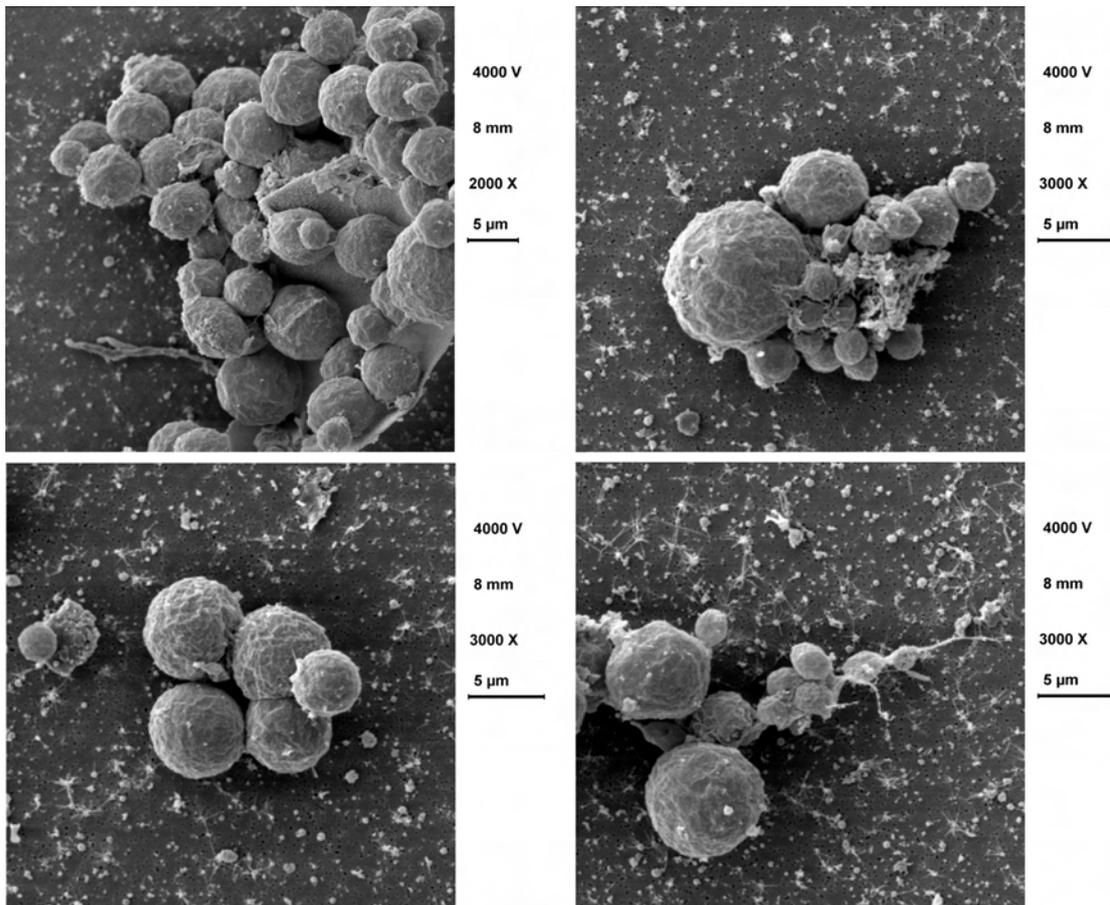


Abbildung 24: REM-Aufnahmen des Stammes 6000b, kultiviert in BITM-Medium. Die Zellen sind 5 bis 10 µm groß und lagern sich in Kolonien zusammen. Die Zelloberfläche ist uneben und es wurden ektoplasmatische Netze ausgebildet.

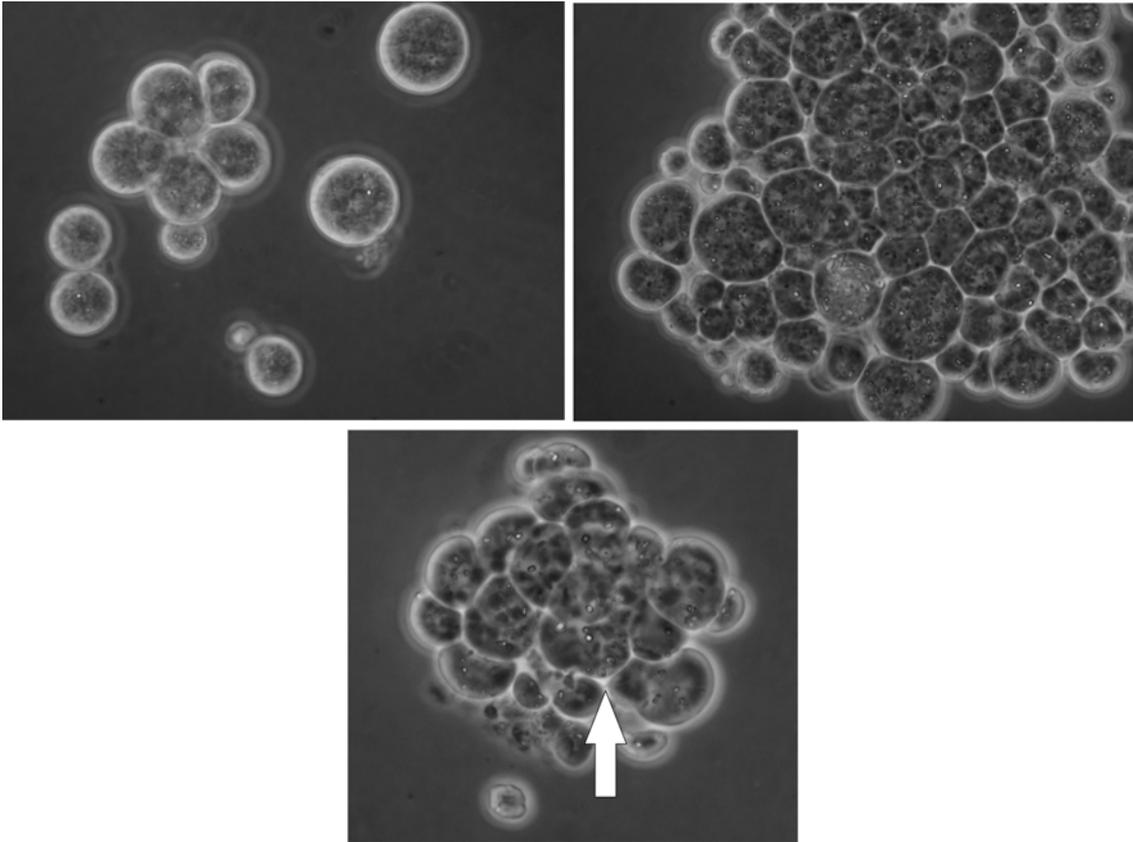


Abbildung 25: Phasenkontrastmikroskopie-Aufnahmen des Stammes 6000b, kultiviert in B1TM-Medium. Es haben sich große und kleine Kolonien gebildet (oben rechts und links). Vermehrung fand durch Zellteilung statt (unten).

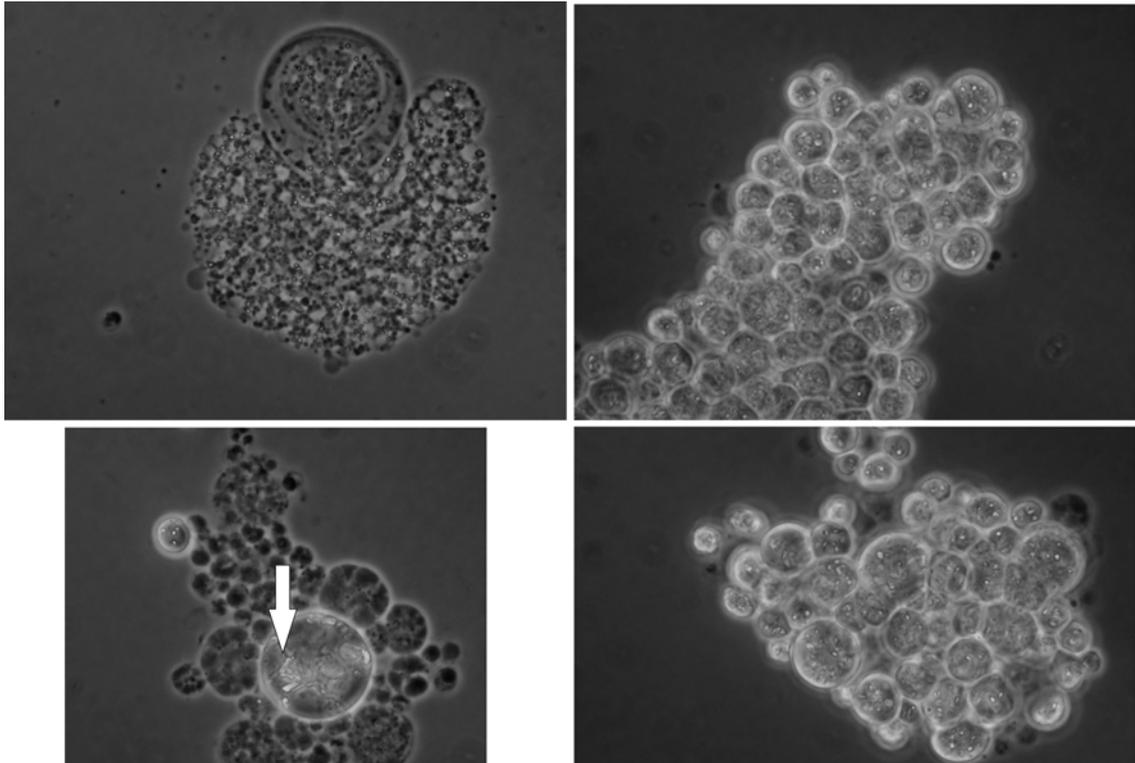


Abbildung 26: Phasenkontrastmikroskopie-Aufnahmen des Stammes 6000b, kultiviert in TSN+TM-Medium. Neben großen Kolonien (rechts oben und unten) konnten wieder Zellen beobachtet werden, die ihren Zellinhalt nach außen entlassen haben (oben links). Auffällig waren die hellen Körperchen im Inneren der meisten Zellen.

Dieser Stamm bildete große Kolonien und ektoplasmatische Netze. Die Vermehrung fand durch Zellteilung statt. Im TSN+TM-Medium haben wieder Zellen ihr Cytoplasma nach außen entlassen. Außerdem waren große, helle Körperchen im Inneren der Zellen sichtbar. Anhand der feststellbaren morphologischen Charakteristika kann der Stamm nicht eindeutig als *Ulkenia* identifiziert werden, da keine amöboiden Zellen beobachtet werden konnten.

6423 (unbekannt)

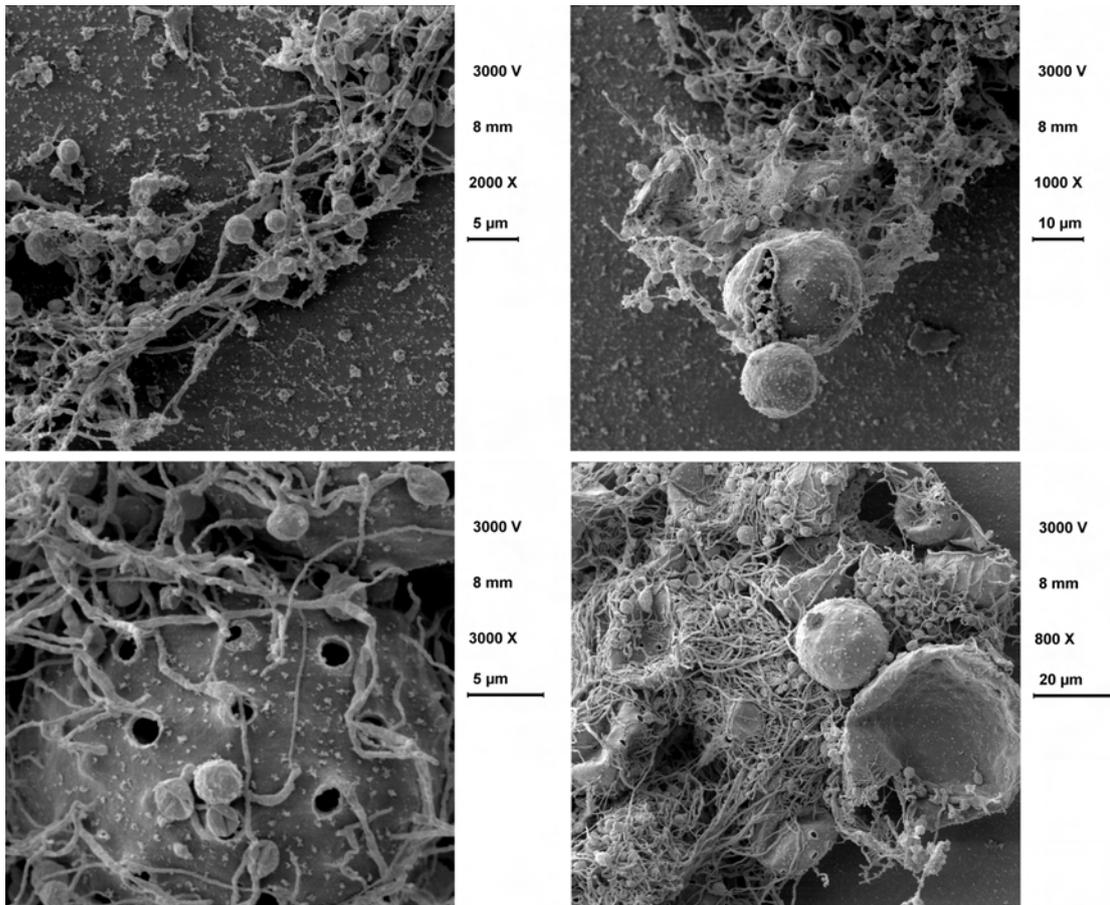


Abbildung 27: REM-Aufnahmen des Stammes 6423, kultiviert in BITM-Medium. Sehr große Zellen mit einem Durchmesser von bis zu 50 μm . Das ektoplasmatische Netz ist sehr dick und umfangreich und teilweise dicht verwoben wie ein Spinnennetz (oben rechts). Die ca. 3 μm großen Sporen dringen durch kleine Löcher in der Zellwand des Sporangiums nach außen (unten links). Die meisten Sporangien sind aber auch großflächig an einer Stelle aufgerissen (unten rechts). Die Sporen werden anscheinend nach Austritt aus der Mutterzelle sofort in das ektoplasmatische Netz integriert (oben links).

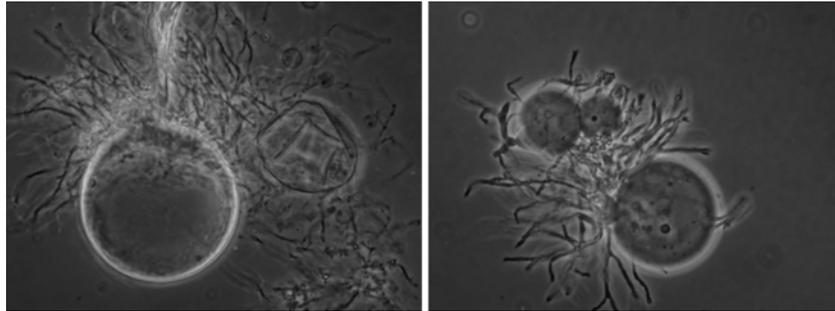


Abbildung 28: Phasenkontrastmikroskopie-Aufnahmen des Stammes 6423, kultiviert in BITM-Medium. Sehr dickes und dichtes ectoplasmatisches Netz, das von einer Seite der Zelle ausgeht.

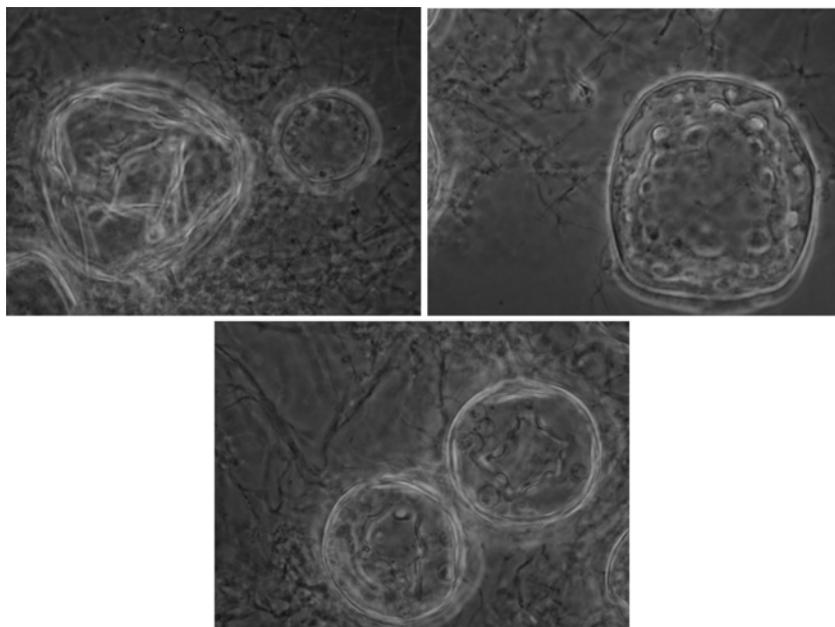


Abbildung 29: Phasenkontrastmikroskopie-Aufnahmen des Stammes 6423, kultiviert in TSN+TM-Medium. Oben links erkennt man eine zusammengefallene leere Sporangienhülle umgeben vom dichten ectoplasmatischen Netz. Oben rechts und unten befinden sich noch Sporen in den Sporangien und man sieht die Auswölbungen an der Zellwand.

Dieser Stamm gehört eindeutig nicht der Familie der Thraustochytriaceae an. Anhand der morphologischen Merkmale gehört der Stamm wahrscheinlich der Gattung *Rhizophydium* unter der Ordnung Chytridiomycota an (Chen und Cien, 1998). Auffällig sind die Löcher in den Sporangien durch die die Sporen nach außen entlassen werden. Im Gegensatz zu den Thraustochytriden besitzt dieser Stamm viel dickere und dichtere ectoplasmatische Netze. Auch die Zellen sind um einiges größer. Da die Primer aber an die DNA dieses Stammes binden konnten, scheint es eine gewisse Verwandtschaft zu geben.

In Tabelle 7 sind die Eigenschaften der mikroskopierte Stämme noch einmal zusammengefasst.

Tabelle 7: Überblick über die Eigenschaften der mikroskopierte Stämme

Stamm		1518e	1518d	1526d	1527a	1527c	1709d	2845c	6006d	6002a	6005a	6006e	6000b	6423
Vermehrung	Sporenbildung			x					x	x	x	x		x
	Zellteilung	x	x		x	x	x	x					x	
Netze	vorhanden	x	x		x	x	x		x	x	x			x
	nicht vorhanden			x				x					x	
Kolonien	groß		x	x	x	x			x	x	x	x	x	x
	klein	x					x	x					x	
ausgelaufene Zellen		x					x		x	x	x		x	
amöboide Zellen												x		

5 Diskussion

Primerbindung

Das Ziel dieser Bachelorthesis war es, verschiedene Identifikationsmethoden zur Bestimmung von Thraustochytriaceae zu vergleichen und eine Methode zu entwickeln, mit der isolierte Stämme sicher und schnell identifiziert werden können. Dafür wurde versucht, die 18S rRNA-Gene von unbekanntem Stämmen mit eigens für Thraustochytriden entwickelten Primern zu sequenzieren. Außerdem wurden Phasenkontrastmikroskopie- und Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahmen gemacht, um die Stämme anhand ihrer morphologischen Merkmale einzuordnen. In einem vorhergehenden Projekt wurde ein Screening der Fettsäuren von den hier gewählten Stämmen durchgeführt und es wird im Hinblick auf die Ergebnisse dieser Arbeit geschaut, ob die Fettsäuremuster als Bestimmungscharakteristikum dienen können.

Es hat sich gezeigt, dass eine morphologische Untersuchung nicht ausreicht, um die Stämme eindeutig zu identifizieren. Die Sequenzierung der 18S rRNA-Gene scheint die sicherste Methode der Bestimmung zu sein, doch ist sie auch problematisch. Da nur 13 Stämme von 31 gewachsenen Stämmen mit dieser Methode identifiziert werden konnten, stellt sich die Frage, warum die Primer nicht alle 18S rRNA Sequenzen amplifizieren konnten. Ein gut designter Primer darf nicht zu lang sein, damit sich keine Sekundärstrukturen bilden können und er darf nicht zu kurz sein, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Außerdem sollte er nicht zu sich selbst komplementär sein. In der folgenden Tabelle sind die am häufigsten verwendeten Primer aufgelistet, die benutzt werden, um die 18S rRNA-Gene von Thraustochytriden zu amplifizieren (Tabelle 8). Basen, die Haarnadelstrukturen bilden könnten, sind gelb hinterlegt.

Tabelle 8: Mögliche Haarnadelstrukturen der Primer

Primer	Sequenz	Quelle
T18S1F	5'-CAACC T GGTG ATCCTGCCAGTA-3'	Burja et al., 2006
	5'-CAAC CTGG TTGATCCTG CCAG TA-3'	Burja et al., 2006
T18S5R	5'-TCACTACGGAAACCTTGTTACGAC-3'	Burja et al., 2006
18S001	5'-AACC T GGTG GATCCTGCCAGTA-3'	Honda et al., 1999
	5'-AAC CTGG TTGATCCTG CCAG TA-3'	Honda et al., 1999
18S13	5'-CCTTGTTACGACTTCACCTTCCTCT-3'	Honda et al., 1999
SR1	5'-TAC CTGG TTGATCCTG CCAG -3'	Yokoyama und Honda, 2007a,b
SR12	5'-CCTTCCGCAGGTTACCTAC-3'	Yokoyama und Honda, 2007a,b

Es zeigt sich, dass einige Primer das Potential haben, Haarnadelstrukturen zu bilden. Dies inhibiert die Bindung an die Template DNA stark, was zu sehr geringen PCR-Ausbeuten führen kann. Besonders die Forward-Primer haben das Potential Haarnadelstrukturen zu bilden. Eine Möglichkeit dies zu verhindern wäre, einen Primer zu entwickeln, der in der DNA noch einige

Basen weiter vor oder zurück ansetzt, um diesen Bereich zu umgehen. Ein weiteres Problem könnte die Template-DNA an sich sein. Es fällt auf, dass die Sequenz oft an der selben Stelle unsauber wird (siehe Tabelle 6). Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass die DNA-Polymerase aufgrund von Sekundärstrukturen nicht mehr richtig arbeiten kann und die Sequenz somit unsauber wird.

Vergleicht man die Sequenzen des Stammes 6006e mit den Sequenzen der Stämme 6005a, 6006d und 6002a, die alle als *Thraustochytrium aureum* identifiziert wurden, zeigt sich, dass sie nur zu 98% übereinstimmen, was der phylogenetische Stammbaum auch verdeutlicht, da er 6006e in einen eigenen Abstammungszweig eingeordnet hat. Dieser Polymorphismus bestätigt sich auch durch die morphologischen Untersuchungen, denn 6006e war der einzige Stamm, der amöboide Zellen gebildet hat. Außerdem war er auch der einzige Stamm dieser Art, bei dem keine Sporenbildung beobachtet werden konnte. Yokoyama und Honda (2007a) behaupten, dass dies ein Zeichen dafür sein könnte, dass dieser Stamm evolutionär gesehen älter ist, da in der fortschreitenden Evolution oft ein Verlust von binärer Zellteilung und Entwicklung von Sporangien beobachtet werden konnte.

Stamm 2845c wurde im phylogenetischen Stammbaum auch einer eigenen Abstammungslinie zugeordnet, da es auch hier einige Polymorphismen in der 18S rRNA Sequenz zu den anderen *Thraustochytrium kinnei*- Stämmen gibt. Dies bestätigt sich ebenfalls durch die mikroskopischen Beobachtungen, denn 2845c war der einzige Stamm dieser Art, der im TSN+TM-Medium wachsen konnte und sein Cytoplasma war viel heller als bei den anderen Stämmen. Außerdem hat nur dieser Stamm Kolonien mit fünf bis sechs Zellen gebildet. Diese Variabilität innerhalb einer Art macht deutlich, dass die Thraustochytriden eine sehr diverse Gruppe bilden, die taxonomisch noch nicht vollständig erschlossen ist.

Vergleich der Fettsäuren

Die Fettsäuren, die von den Thraustochytriden produziert werden, werden oft als Eigenschaft verwendet, um sie einer Art- bzw. Gattung zuzuordnen. Huang et al. (2003) zeigte in seinem Review, dass monophyletische Gruppen von Thraustochytriden auch die gleichen Fettsäuren synthetisieren. Schaut man sich die hier verwendeten Stämme an, die der Art *Thraustochytrium kinnei* zugeordnet werden konnten, zeigen sich jedoch einige Unterschiede, besonders in der Produktion der Fettsäuren DHA (Docosahexaensäure), EPA (Eicosapentaensäure) und AA (Arachidonsäure). Es wurden die hier gewählten Stämme in dem Projekt von Dybowska (2014) in den Medien B1TM und TSN+TM kultiviert und die Anteile der Fettsäuren DHA, EPA und AA verglichen. Stamm 6000b und 6423 zeigten in diesem Projekt kein Wachstum und deshalb stehen auch keine Daten zu ihren Fettsäuren zur Verfügung. Es zeigte sich, dass die Stämme 1518d und 1518e im Medium TSN+TM keine der genannten Fettsäuren produzierten, während im B1TM-Medium alle drei nachweisbar waren. Während die Stämme 1526d, 1527c, 1709d und 2845c in beiden Medien AA produzierten, hat Stamm 1527a nur im TSN+TM Medium AA produziert (Tabelle 9). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Fettsäureproduktion teilweise medienabhängig ist. Die Anteile der jeweiligen Fettsäuren sind hingegen bei allen Stämmen relativ gleich. Alle produzierten ca. 50-65% DHA, 10-15% EPA und AA 0-6%, wenn die jeweilige Fettsäure denn nachweisbar war. Da aber nach den Erkenntnissen dieser Arbeit nicht alle Stämme einer Art bzw. Gattung angehören, die Unterschiede in den Fettsäureanteilen aber so gering sind, kann man sie nur bedingt verwerten, um die Thraustochytriden zu identifizieren. Es scheint vielmehr, dass das Medium einen viel größeren Einfluss auf die Fettsäureproduktion hat als die Artzugehörigkeit.

Tabelle 9: Fettsäuremuster der identifizierten Stämme (Dybowska, 2014)

Stamm	Art	Fettsäuremuster in B1TM	Fettsäuremuster in TSN+TM
1518d	<i>T. kinnei</i>	DHA/EPA/AA	/
1518e	<i>T. kinnei</i>	DHA/EPA/AA	/
1526d	<i>T. kinnei</i>	DHA/EPA/AA	DHA/EPA/AA
1527c	<i>T. kinnei</i>	DHA/EPA/AA	DHA/EPA/AA
1709d	<i>T. kinnei</i>	DHA/EPA/AA	DHA/EPA/AA
2845c	<i>T. kinnei</i>	DHA/EPA/AA	DHA/EPA/AA
1527a	<i>T. kinnei</i>	DHA/EPA	DHA/EPA/AA
6006e	<i>T. aureum</i>	DHA/EPA/AA	DHA/EPA/AA
6005a	<i>T. aureum</i>	DHA/EPA/AA	DHA/EPA/AA
6006d	<i>T. aureum</i>	DHA/EPA/AA	DHA/EPA/AA
6002a	<i>T. aureum</i>	DHA/EPA/AA	DHA/EPA/AA

Morphologische Charakteristika

Die Morphologie der Stämme kann auch innerhalb einer Art sehr divers sein wie die Ergebnisse der Mikroskopie zeigen. In der Gruppe der *Thraustochytrium kinnei* wurde sowohl Zellteilung als auch einfach-sprossende Sporangien beobachtet. Charakteristisch für *Thraustochytrium* ist laut Literatur nur die Vermehrung durch einfach-sprossende Sporangien, obwohl eingeräumt wird, dass unter bestimmten Bedingungen auch binäre Zellteilung auftreten kann (Moss, 1986). Da bei den Stämmen 1518e, 1518d, 1527a, 1527c, 1709d und 2845c keine einfach-sprossenden Sporangien entdeckt werden konnten, ist dieses Kriterium nicht sehr vertrauenswürdig. Trotzdem waren alle Stämme außer 2845c in ihrem Erscheinungsbild relativ homogen. Alle bildeten globuläre Zellen und große Kolonien und bei den meisten konnten Zellen beobachtet werden, bei denen das Cytoplasma durch eine Öffnung in der Zellwand nach außen entlassen wurde. Erklärungen für diese Erscheinung gibt es bisher nicht.

Auch *Thraustochytrium aureum* bildet einfach-sprossende Sporangien, die bei 6006d beobachtet werden konnten. Insgesamt war das Cytoplasma bei den Stämmen, die dieser Art zugeordnet wurden, heller als bei den *Thraustochytrium kinnei*-Stämmen. Stamm 6006e viel besonders durch die Anwesenheit von amöboiden Zellen auf. Raghukumar (1992) beschrieb erstmals die Bildung von amöboiden Zellen bei Thraustochytriden und Phagozytose von Bakterien. Dieser interessante Aspekt beweist, dass die Thraustochytriden eine Doppelrolle im Ökosystem einnehmen. Sie sind sowohl saprotroph als auch bakterivor. Ob die anderen Stämme auch in der Lage wären amöboide Zellen zu bilden oder ob dies eine stammspezifische Eigenschaft ist, kann nicht sicher gesagt werden.

Stamm 6000b wurde als *Ulkenia visurgensis* identifiziert. Diese Art entlässt normalerweise vielkernige amöboide Zellen, die dann Zoosporen bilden (Gaertner, 1977). Es konnten bei diesem Stamm jedoch keine Amöben beobachtet werden und es fand nur Zellteilung statt. Da dies der einzige Stamm war, der dieser Art zugeordnet werden konnte, gibt es leider keine vergleichenden Aufnahmen. Auffällig waren die relativ großen hellen Körperchen im Inneren des Stammes 6000b. Ob dies Zellorganellen oder Einschlüsse sind, kann mittels Lichtmikroskopie nicht genau gesagt werden.

Der optisch auffälligste Stamm 6423 kann nicht den Thraustochytriden zugeordnet werden, sondern besitzt viele Eigenschaften, die den Chytridiomycota zugeordnet werden. Ob dieser Stamm auch PUFAs produziert, müsste noch untersucht werden, da er in dem Projekt von Dybowska nicht gewachsen ist und somit keine Fettsäuren gemessen werden konnten.

6 Ausblick

Da nicht alle Stämme identifiziert werden konnten, ist eine Optimierung der Methode notwendig. Zum einen kann vielleicht eine Primeroptimierung helfen, die unbekanntes Stämme zu identifizieren. Außerdem kann das 18S rRNA-Gen in einen Vektor eingefügt werden und so leichter sequenziert werden. In vielen Veröffentlichungen zur Bestimmung von Thraustochytriden wurden für die Sequenzierung Vektoren verwendet (Mo et al., 2002; Cavalier-Smith, 1994). Dies wäre allerdings aufwendiger und teurer als eine einfache Sequenzierung der PCR-Produkte und wäre auch nur eine Lösung für die Stämme, bei denen die PCR funktioniert hat. Es kann außerdem nicht ausgeschlossen werden, dass die Stämme nicht richtig isoliert wurden und ein vermeintlich reiner Stamm aus zwei oder mehr Stämmen besteht und die Sequenzen deswegen unsauber sind. Die Stämme wurden nur nach morphologischen Charakteristika isoliert und, da wie oben erörtert, es oft schwer ist die Thraustochytriden nur nach diesen Gesichtspunkten zu identifizieren, können bei der Isolierung Fehler aufgetreten sein. Deshalb könnte man die Stämme, bei denen die Sequenzen unsauber waren, neu ausplattieren und Kolonien picken. Vorher könnte man sie noch einmal mikroskopieren, um herauszufinden, ob die Stämme auch wirklich den Thraustochytriaceae angehören. Denn wie oben erwähnt, konnte man bei Stamm 6423 schon unter dem Mikroskop große Unterschiede zu den allgemeinen Charakteristika der Thraustochytriden feststellen.

Falls die Sekundärstrukturen in der DNA das Problem sein sollten, kann man mit bestimmten Reagenzien wie Betain versuchen die Bildung dieser zu verhindern. Burja et al. (2006) verwendete in dem PCR-Ansatz zur Amplifikation des 18S rRNA-Gens 1 M Betain. Man könnte außerdem neue Primer entwickeln, die in der Nähe der Stellen binden, an denen die Sequenzen unsauber wurden. Dies könnte die Inhibierung durch die Sekundärstrukturen verringern.

Da in dem genannten Projekt von Dybowska nur die Fettsäuren DHA, EPA und ARA betrachtet wurden, könnte man auch ein umfangreicheres Fettsäurescreening durchführen, um festzustellen, ob es bei den mengenmäßig geringer vorkommenden Fettsäuren auffällige Muster bezüglich der Gattungen gibt.

Abschließend lässt sich sagen, dass es noch viele Optimierungsmöglichkeiten im Hinblick auf die Bestimmung der sehr diversen Gruppe der Thraustochytriden gibt und selbst die schon länger etablierte Methode der Sequenzierung der 18S rRNA-Gene bei diesen Organismen viele Probleme aufwirft.

7 Literaturverzeichnis

Adl, S. M.; Simpson, A. G. B.; Farmer, M. A.; Anderson, O. R.; Barta, J. R.; Bowser, S. S.; Brugerolle, G.; Fensome, R. A.; Fredericq, S.; James, T. Y.; Kugrens, P.; Krug, J.; Lane, C. E.; Lewis, L. A.; Lodge, J.; Lynn, D. H.; Mann, D. G.; McCourt, R. M.; Mendoza, L.; Moestrup, O.; Mozley-Standridge, S. E.; Nerad, T. A.; Shearer, C. A.; Smirnov, A. V.; Spiegel, F. W. und Taylor, M. F. J. R. (2005): The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists, *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52(5), S. 399-451.

Aki, T.; Hachida, K.; Yoshinaga, M.; Katai, Y.; Yamasaki, T.; Kawamoto, S.; Kakizono, T.; Maoka, T.; Shigeta, S.; Suzuki, O.; Ono, K. (2003): Thraustochytrid as a potential source of carotenoids, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80, S. 789-794.

Alderman, D. J.; Harrison, J. L.; Bremer, G. B. und Jones, E. B. G. (1974): Taxonomic revisions in the marine biflagellate fungi: the ultrastructural evidence, *Marine Biology*, 25, S. 345-357.

Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W. und Lipman, D. J. (1990): Basic local alignment search tool, *Journal of Molecular Biology*, 215, S. 403-410.

Arafiles, K. H. V.; Alcantara, J. C. O.; Cordero, P. R. F.; Batoon, J. A. L.; Galura, F. S.; Leñaño, E. M. und Dedeles, G. R. (2011): Cultural Optimization of Thraustochytrids for Biomass and Fatty Acid Production, *Mycosphere*, 2(5), S. 521-531.

Bahnweg, G. und Sparrow, F. K. (1972): *Aplanochytrium kerguelensis* gen. nov. spec. nov., a new phycomycete from subantarctic marine waters, *Archiv für Mikrobiologie*, 81, S.45-49.

Bahnweg, G. und Jäckle, I. (1986): A new approach to taxonomy of the Thraustochytriales and Labyrinthulales, in: *The Biology of Marine Fungi* (ed. Moss, S.T.), Cambridge: University Press, S.131-140.

Barclay, W.R. (1992): Process for the heterotrophic production of microbial oils with high concentrations of Omega-3 highly unsaturated fatty acids. US Patent no. 5,130,242.

Barclay, W.R. (1994): Process for growing *Thraustochytrium* and *Schizochytrium* using non-chloride salts to produce a micro-floral biomass having omega-3 highly unsaturated fatty acids. US Patent no. 5,340,742.

Barclay, W.; Weaver, C.; Metz, J. und Hansen, J. (2010): Development of a docosahexaenoic acid production technology using *Schizochytrium*: historical perspective and update, in: *Single Cell Oils*. 2nd edn., Editors: Cohen, Z.; Ratledge, C.; Champaign, I. L.; AOCS Press, S. 75-96.

Bongiorni, L.; Jain, R.; Raghukumar, S. und Aggarwal, R. K. (2005): *Thraustochytrium gaertnerium* sp. nov.: a new thraustochytrid stramenopilan protist from mangroves of Goa, India, *Protist*, 156, S. 303-315.

Bowles, R. D.; Hunt, A. E.; Bremer, G. B.; Duchars, M. G. und Eaton, R. A. (1999): Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acid production by members of the marine protistan group the thraustochytrids: screening of isolates and optimisation of docosahexaenoic acid production, *Journal of Biotechnology*, 70, S. 193-202.

Burja, A. M.; Radianingtyas, H.; Windust, A.; Barrow, C. J. (2006): Isolation and characterization of polyunsaturated fatty acid producing *Thraustochytrium* species: screening of strains and optimization of omega-3 production, Applied Microbiology and Biotechnology, 72, S. 1161-1169.

Burki, F.; Shalchian-Tabrizi, K.; Minge, M.; Skjæveland, A.; Nikolaev, S. I.; Jakobsen, K. S. und Pawlowski, J. (2007): Phylogenomics Reshuffles the Eukaryotic Supergroups, PLoS ONE 2(8): e790.

Cavalier-Smith, T. (1981): Eukaryote kingdoms: seven or nine?, Biosystems, 14, S. 461-481.

Cavalier-Smith, T.; Allsopp, M. T. E. P. und Chao, E. E. (1994): Thraustochytrids are chromists, not Fungi: 18S rRNA signatures of Heterokonta, Philosophical Transactions of the Royal Society, 346 (1318), S. 387-397.

Chen und Cien (1998): Some chytrids of Taiwan, Botanic Bulletin of Academia Sinica, 39, S. 47-56.

Dick, M. W. (1973): Saprolegniales, in: The Fungi, Vol. IVB (ed. Ainsworth, G. C.; Sparrow, F. K. und Sussman, A.S.), New York: Academic Press, S. 113-144.

Dybowska, K. (2014): Mikrobielle Produktion von ω -Fettsäuren, Bachelorthesis Fachhochschule Flensburg.

Field, K. G.; Olsen, G. J.; Lane, D. J.; Giovannoni, S. J.; Ghiselin, M. T.; Raff, E. C.; Pace, N. R. und Raff, R. A. (1988): Molecular Phylogeny of the Animal Kingdom, Science, 239, S. 748-53.

Fisher, L.; Nicholls, D.; Sanderson, K. (2010): Production of Biodiesel, Patent: US 2010/0041112 A1.

Gaertner, A. (1977): Revision of the Thraustochytriaceae (lower marine fungi). I. *Ulkenia nov. gen.*, with description of three new species, Veröffentlichungen des Instituts für Meeresforschung Bremerhaven, 16, S. 139-157.

Gassen, H. G.; Schrimpf, G. (1999): Gentechnische Methoden, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.

Goldstein, S. und Belsky, M. (1964): Axenic culture of a new marine phycomycete possessing an unusual type of asexual reproduction, American Journal of Botany, 51, S. 72-78.

Gupta, A.; Wilkens, S.; Adcock, J. L.; Puri, M.; Barrow, C. J. (2013): Pollen baiting facilitates the isolation of marine thraustochytrids with potential in ω -3 and biodiesel production, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 11, S. 1231-1240.

Hammond, B. G.; Mayhew, D. A.; Robinson, K.; Mast, R. W. und Sander, W. J. (2001): Safety assessment of DHA-rich microalgae from *Schizochytrium sp.*, Regulatory Toxicology and Pharmacology, 33(3), S. 356-62.

Harel, M.; Eitan, B. D.; Rasoulouniriana, D.; Siboni, N.; Kramarsky-Winter, E.; Loya, Y.; Barak, Z.; Wiseman, Z. und Kushmaro, A. (2008): A new Thraustochytrid, strain Fng1, isolated from the surface mucus of the hermatypic coral *Fungia granulosa*, FEMS Microbiology Ecology, 64(3), S. 378-87.

- Hodge, L.; Salome, C. M.; Peat, J. K.; Haby, M. M.; Xuan, W. und Woolcock, A. J. (1996):** Consumption of oily fish and childhood asthma risk, *The Medical Journal of Australia*, 164(3), S.137-40.
- Honda, D.; Yokochi T.; Erata, M. und Higashihara, T. (1998):** *Schizochytrium limacinum sp. nov.*, a new thraustochytrid from mangrove area in the west Pacific Ocean, *Mycological Research*, 102, S. 439-448.
- Honda, D.; Yokochi, T.; Nakahara, T.; Raghukumar, S.; Nakagiri, A.; Schaumann, K. und Higashihara, T. (1999):** Molecular Phylogeny of Labyrinthulids and Thraustochytrids Based on the Sequencing of 18S Ribosomal RNA Gene, *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46, S. 637-647.
- Huang, J.; Aki, T.; Yocochi, T.; Nakahara, T.; Honda, D.; Kawamoto, S.; Shigeta, S.; Ono, K. und Suzuki, O. (2003):** Grouping newly isolated docosahexaenoic acid-producing Thraustochytrids based on their polyunsaturated fatty acid profiles and comparative analysis of 18S rRNA genes, *Marine Biotechnology*, 5, S. 451.
- Jeanmougin, F.; Thompson, J. D.; Gouy, M.; Higgins, D. G. und Gibson, T. J. (1998):** Multiple sequence alignment with Clustal X, *Trends in Biochemical Sciences.*, 23, S. 403-405.
- Jones, E. B. G. und Alderman, D. J. (1971):** *Althornia crouchii gen. et sp. nov.* A marine biflagellate fungus, *Nova Hedwigia*, 21, S. 381-399.
- Kobayashi, Y. und Ookubo, M. (1953):** Studies on the marine Phycomycetes, *Bulletin of the National Science Museum Tokyo*, 33, S. 53-65.
- Larkin, M. A.; Blackshields, G.; Brown, N. P.; Chenna, R.; McGettigan, P. A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I. M.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J. D.; Gibson, T. J. and Higgins, D. G.(2007):** Clustal W and Clustal X version 2.0., *Bioinformatics*, 23, S. 2947-2948.
- Levine, N. D.; Corliss, J. O.; Cox, F. E. G.; Deroux, G.; Grain, J.; Honigberg, B. M.; Leedale, G. F.; Loeblich, A. R.; Lom, J.; Lynn, D.; Merinfeld, G.; Page, F. C.; Poljansky, G.; Sprague, V.; Vavra, J. und Wallace, F. G. (1980):** A newly revised classification of the Protozoa, *Journal of Protozoology*, 27, S. 37-58.
- Lewis, T. E.; Nichols, P. D. und McMeekin, T. A. (1999),** *Marine Biotechnology* 1, S. 580.
- Mo, C.; Douek, J.; Rinkevich, B. (2002):** Development of a PCR strategy for thraustochytrid identification based on 18S rDNA sequence, *Marine Biology*, 140, S. 883-889.
- Moss, S.T. (1986):** Biology and phylogeny of the Labyrinthulales and Thraustochytriales, in: *The Biology of Marine Fungi*, Cambridge: University Press, S. 105-129.
- Mullis, K. B. (1985):** Process for amplifying nucleic acid sequences, Patent: US4683202.
- Norrish, A. E.; Skeaff, C. M.; Arribas, G. L.; Sharpe, S. J. und Jackson, R. T. (1999):** Prostate cancer risk and consumption of fish oils: a dietary biomarker-based case-control study, *British Journal of Cancer*, 81(7), S. 1238-42.

Olive, L.S. (1975): The Mycetozoans, New York: Academic Press.

Perkins, F.O. (1973a): Observations of thraustochytriaceous (Phycomycetes) and labyrinthulid (Rhizopodea) ectoplasmic nets on natural and artificial substrates – an electron microscope study, Canadian Journal of Botany, 51, S. 485-491.

Perkins, F. O. (1973b): A new species of marine labyrinthulid *Labyrinthuloides yorkensis* gen. nov. spec. nov. - cytology and fine structure, Archiv für Mikrobiologie, 90, S. 1-17.

Porter, D. (1990): Labyrinthulomycota, in: Handbook of Protoctista (ed. Margulis, L.; Corliss, J. O.; Melkonian, M. und Chapman, D.), Boston: Jones and Bartlett, S.388-398.

Raghukumar, S. (1992): Bacterivory: a novel dual role for thraustochytrids in the sea, Marine Biology, 113, S. 165-169.

Saitou, N. und Nei, M. (1987): The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, Molecular Biology and Evolution, 4(4), S. 406-25.

Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulsen, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 74, S. 5463-5467.

Scheper, T.; Belkin, S.; Doran, P.M.; Endo, I.; Gu, M.B.; Hu, W.-S.; Mattiasson, B.; Nielsen, J.; Seitz, H.; Stephanopoulos, G.N.; Ulber, R.; Zeng, A.-P.; Zhong, J.-J. und Zhou, W. (2013): Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Springer, S. 97-111.

Shabala, L.; McMeekin, T.; Shabala, S. (2013): Thraustochytrids Can Be Grown in Low-Salt Media Without Affecting PUFA Production, Marine Biotechnology, 15, S. 437-444.

Sparrow, F. K. (1936): Biological observations on the marine fungi of Woods Hole waters, Biological Bulletin, 70, S. 236-263.

Viovy, J.-L. (2000): Electrophoresis of DNA and other polyelectrolytes: Physical mechanisms, Reviews of Modern Physics, 72, S. 813-872.

Yokoyama, R. und Honda, D. (2007a): Taxonomic rearrangement of the genus *Schizochytrium sensu lato* based on morphology, chemotaxonomic characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): emendation for *Schizochytrium* and erection of *Aurantiochytrium* and *Oblongichytrium* gen. nov., Mycoscience, 48(4), S. 199-211.

Yokoyama, R.; Salleh, B. und Honda, D. (2007b): Taxonomic rearrangement of genus *Ulkenia* s.l. phylogeny based on morphology, chemotaxonomical characteristics and 18S rRNA gene (Thraustochytriaceae): emendation for *Ulkenia* and erection of *Botryochytrium*, *Parietichytrium* and *Sicyoichytrium* gen.nov., Mycoscience, 48(6), S. 329-341 .

8 Anhang

Anhang 1

Sequenzen der identifizierten Stämme (5'-3')

>1518D

CAACCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTCGTACGCTTGTTTCAAAGGTTAAGCCATGCATGTCTC
AGTGTAAACTCATTGCACAGTGAACTGCGAACGGCTCATTAATCGGTTCTAGTCTCCAG
AGTGGTGTTCATCTAAATGGATACTTGTGGCAAATCTAGAAACAATACATGCTTGGAGG
CCTGACGGTGTTCCTGAAGGGCTGCATTTATTTGATGTTAGGACCAATACCTTTCGGGG
TGATTCGGGTGATTCAGAGTAACTATGCGAACCGCAGTGGCTTTTTGTGCGCGGTGACTTT
ATGAGGTTCTGCCCTATCAGGCTTTGCAACGGGTATTGTCTTTGCAACCGGTCACGGGTG
ACGGAGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAGACGGCTACCACATCCAAG
GAAGGCAGCAGGCGGTAAATTACTCTATGCCAACGCGGCGAAGTAGTGACGAAAAATAG
GACTGGGTAGCGCTTTGCGTTATCTTTGTCCAATGAGAGCAATGTAAGCCCTCATCGAGG
ATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTACA
CTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTCTAATGTATGGGAGTTGCGGGGTGGGTGTT
TGGTTGGTTTTGCCGACTAGACAATACTCGCTCCGCTTCCCGCTTGTTTTGCTCTCTTTTCT
AGAAGGCAAATGTTTCACTGTAAGTAAACAACCTCGCTCAACAGCAAGGTTATCTTGATAT
GAATTAGTATGGGATGATGAGATAGGCTCGGTCCGTATTTTGTGGTTTTAGTGGTCTGAGA
ATGATGAAGAGGGACAATTGGGGGTATTTCGTATTTACATGTCAGAGGTGGAATTCTTGATT
TTGGAAAGACGAACTAATGCGAAAGCATCTACCAAAGATGTTTTTCATTGATCAAGAACGAA
AGTTTGGGGATCGAAGATGATTAGATACCATCGTAGTCTAAACCATAAACTATGCCGACTTG
CGATTGTTTTGTGTCATTTAATGAGCAGAGCAGCAGCAC

>1518E

CAACCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTCGTACGCTTGTTTCAAAGGTTAAGCCATGCATGTCTC
AGTGTAAACTCATTGCACAGTGAACTGCGAACGGCTCATTAATCGGTTCTAGTCTCCAG
AGTGGTGTTCATCTAAATGGATACTTGTGGCAAATCTAGAAACAATACATGCTTGGAGG
CCTGACGGTGTTCCTGAAGGGCTGCATTTATTTGATGTTAGGACCAATACCTTTCGGGG
TGATTCGGGTGATTCAGAGTAACTATGCGAACCGCAGTGGCTTTTTGTGCGGCGGTGACTTT
ATGAGGTTCTGCCCTATCAGGCTTTGCAACGGGTATTGTCCTTTGCAACGGGTCACGGGTG
ACGGAGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAGACGGCTACCACATCCAAG
GAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACTCTATGCCAACGCGGCGAAGTAGTGACGAAAAATAG
GACTGGGTAGCGCTTTGCGTTATCTTTGTCCAATGAGAGCAATGTAAAAGCCTCATCGAGG
ATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTACA
CTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTCTAATGTATGGGAGTTGCGGGGTGGGTGTT
TGGTTGGTTTTGCGGACTAGACAATACTCGCTCCGCTTCCCGCTTGTTTTGCTCTCTTTTAA
AGAAGGCAAATGTTTCACTGTAAGTAAAACAACCTCGCTCAACAGCAAGGTTATCTTGATAT
GAATTAGTATGGGATGATGAGATAGGCTCGGTCCGTATTTTGTGGTTTTAGTGGTCTGAGA
ATGATGAAGAGGGACAATTGGGGGTATTTCGTATTTACATGTCAGAGGTGGAATTCTTGATT
TTGGAAAGACGAACTAATGCGAAAGCATCTACCAAAGATGTTTTTCATTGATCAAGAACGAA
AGTTTTGGGGATCGAAGATGATTAGATAACATCGTAGTCTAAACCATAAACTATGCCGACTTG
CGATTGTTTTGTGTCATTTAATGAGCAGAGCAGCAGCACATGAGAAATCAAAGTCTTTGGG
TTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACC
AGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTACCAGGTCCAGACAT
AGGAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTT
CTTAGTTGGTGGAGCGATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCACAGCCTACTA
AATAGTGGTGTCTATGGCGACATAGGTGATTGCTTCTTAGAGGGACATTTTCGGTTTTACCGG
AAGGAAGTTTGTGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCG
CTACACTGATGATTTCAACGAGTTGTTTATGTTGCTGTTTTTGGCAATATTTTCCTTGTCGGTT
AGGTCTGGGTAATCTTTTGAATGGTCATCGTGATGGGGCTAGATTTTTTGCAATTTTTAATCTC
CAACGAGGAATTCCTAGTAAACGCGAGTCATCAGCTCGCATTGATTACGTCCCTGCCCTTT
GTACACACCGCCCGTCGCACCTACCGATTGAACGTTCCGGTGAGACCTTTGGATCTGCTGA
TGTGGGGCGCAAGCCTTGTGTTGGCGGAGAAATTGAGCAAACCTTAACGTTTAGAGGAA
GGTGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGTGA

>1526D

CCAACCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTCGTACGCTTGTTTCAAAGGTTAAGCCATGCATGTCT
CAGTGTAAACTCATTGCACAGTGAAACTGCGAACGGCTCATTAAATCGGTTCTAGTCTCCA
GAGTGGTGTTTTCAATCTAAATGGATACTTGTGGCAAATCTAGAAACAATACATGCTTGGAG
GCCTGACGGTGTTTTCACTGAAGGGCTGCATTTATTTGATGTTAGGACCAATACCTTTCGGG
GTGATTCGGGTGATTCAGAGTAACTATGCGAACCGCAGTGGCTTTTTGTTCGGCGGTGACTT
TATGAGGTTCTGCCCTATCAGGCTTTGCAACGGGTATTGTCCTTTGCAACCGGTCACGGGT
GACGGAGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAGACGGCTACCACATCCAA
GGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACTCTATGCCAACGCGGCGAAGTAGTGACGAAAAATA
GGACTGGGTAGCGCTTTGCGTTATCTTTGTCCAATGAGAGCAATGTAAAAGCCTCATCGAG
GATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTAC
ACTAAAGTTGTTGCAGTAAAAAGCTCGTAGTCTAATGTATGGGAGTTGCGGGGTGGGTGT
TTGGTTGGTTTTGCCGACTAGACAATACTCGCTCCGCTTCCCGCTTGTTTTGCTCTCTTTTA
AAGAAGGCAAATGTTTCACTGTAAGTAAAACAACCTCGCTCAACAGCAAGGTTATCTTGATA
TGAATTAGTATGGGATGATGAGATAGGCTCGGTCCGTATTTGTTGGTTTTAGTGGTCTGAG
AATGATGAAGAGGGACAATTGGGGGTATTTCGTATTTACATGTCAGAGGTGGAATTCTTGGA
TTTTGGAAAGACGAACTAATGCGAAAGCATCTACCAAAGATGTTTTTCATTGATCAAGAACG
AAAGTTTGGGGATCGAAGATGATTAGATACCATCGTAGTCTAAACCATAAACTATGCCGACT
TGCGATTGTTTTGTGTCATTTAATGAGCAGAGCAGCAGCACATGAGAAATCAAAGTCTTTG
GGTTCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACC
ACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTACCAGGTCCAGA
CATAGGAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCC
GTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCACAGCCTA
CTAAATAGTGGTGTCTATGGCGACATAGGTGATTGCTTCTTAGAGGGACATTTCCGTTTTAC
CGGAAGGAAGTTTGTGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGC
GCGCTACACTGATGATTTCAACGAGTTGTTTATGTTGCTGTTTTTGGCAATATTTCTTGTC
GTTAGGTCTGGGTAATCTTTTGAATGGTCATCGTGATGGGGCTAGATTTTTGCAATTTTAAAT
CTCCAACGAGGAATTCCTAGTAAACGCGAGTCATCAGCTCGCATTGATTACGTCCTGCCC
TTTGTACACACCGCCCGTCGCACCTACCGATTGAACGTTCCGGTGAGACCTTTGGATCTGC
TGATGTGGGGCGCAAGCCTTGTGTTGGCGGAGAAATTGAGCAAACCTTAACGTTTTAGAG
GAAGGTGAAGTCGT

>1527A

CCAACCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTCGTACGCTTGTTTCAAAGGTTAAGCCATGCATGTCT
CAGTGTAACCTCATTGCACAGTGAACTGCGAACGGCTCATTAATCGGTTCTAGTCTCCA
GAGTGGTGTTCATCTAAATGGATACTTGTGGCAAATCTAGAAACAATACATGCTTGGAG
GCCTGACGGTGTTCCTGAAGGGCTGCATTTATTTGATGTTAGGACCAATACCTTTCGGG
GTGATTCGGGTGATTCAGAGTAACTATGCGAACCGCAGTGGCTTTTTGTTCGGCGGTGACTT
TATGAGGTTCTGCCCTATCAGGCTTTGCAACGGGTATTGTCCTTTGCAACCGGTCACGGGT
GACGGAGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAGACGGCTACCACATCCAA
GGAAGGCAGCAGGCGGTAAATTACTCTATGCCAACGCGGCGAAGTAGTGACGAAAAATA
GGACTGGGTAGCGCTTTGCGTTATCTTTGTCCAATGAGAGCAATGTAAAAGCCTCATCGAG
GATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTAC
ACTAAAGTTGTTGCAGTAAAAAGCTCGTAGTCTAATGTATGGGAGTTGCGGTGTGGGTGT
TTGGTTGGTTTTGCCGACTAGACAATACTCGCTCCGCTTCCCGCTTGTTTTGCTCTCTTTTA
AAGAAGGCAAATGTTTCACTGTAAGTAAAACAACCTCGCTCAACAGCAAGGTTATCTTGATA
TGAATTAGTATGGGATGATGAGATAGGCTCGGTCCGTATTTGTTGGTTTTAGTGGTCTGAG
AATGATGAAGAGGGACAATTGGGGGTATTTCGTATTTACATGTCAGAGGTGGAATTCTTGA
TTTTGGAAAGACGAACTAATGCGAAAGCATCTACCAAAGATGTTTTTCATTGATCAAGAACG
AAAGTTTGGGGATCGAAGATGATTAGATACCATCGTAGTCTAAACCATAAACTATGCCGACT
TGCGATTGTTTTGTGTCATTTAATGAGCAGAGCAGCAGCACATGAGAAATCAAAGTCTTTG
GGTTCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACC
ACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTACCAGGTCCAGA
CATAGGAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCC
GTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCACAGCCTA
CTAAATAGTGGTGTCTATGGCGACATAGGTGATTGCTTCTTAGAGGGACATTCGGTTTTAC
CGGAAGGAAGTTTGTGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGC
GCGCTACACTGATGATTTCAACGAGTTGTTTATGTTGCTGTTTTTGGCAATATTTCTTGTC
GTTAGGTCTGGGTAATCTTTTGAATGGTCATCGTGATGGGGCTAGATTTTTGCAATTTTTAAT
CTCCAACGAGGAATTCCTAGTAAACGCGAGTCATCAGCTCGCATTGATTACGTCCTGCCC
TTTGTACACACCGCCCGTCGCACCTACCGATTGAACGTTCCGGTGAGACCTTTGGATCTGC
TGATGTGGGGCGCAAGCCTTGTTGTTGGCGGAGAAATGAGCAAACCTTAACGTTAGA

>1527C

CCAACCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTCGTACGCTTGTTTCAAAGGTTAAGCCATGCATGTCT
CAGTGTAAACTCATTGCACAGTGAAACTGCGAACGGCTCATTAAATCGGTTCTAGTCTCCA
GAGTGGTGTTCATCTAAATGGATACTTGTGGCAAATCTAGAAACAATACATGCTTGGAG
GCCTGACGGTGTTCCTGAAGGGCTGCATTTATTTGATGTTAGGACCAATACCTTTCGGG
GTGATTCGGGTGATTCAGAGTAACTATGCGAACCGCAGTGGCTTTTTGTTCGGCGGTGACTT
TATGAGGTTCTGCCCTATCAGGCTTTGCAACGGGTATTGTCCTTTGCAACCGGTCACGGGT
GACGGAGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAGACGGCTACCACATCCAA
GGAAGGCAGCAGGCGGTAAATTACTCTATGCCAACGCGGCGAAGTAGTGACGAAAAATA
GGACTGGGTAGCGCTTTGCGTTATCTTTGTCCAATGAGAGCAATGTAAAAGCCTCATCGAG
GATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTAC
ACTAAAGTTGTTGCAGTAAAAAGCTCGTAGTCTAATGTATGGGAGTTGCGGGGTGGGTGT
TTGGTTGGTTTTGCCGACTAGACAATACTCGCTCCGCTTCCCGCTTGTTTTGCTCTCTTTTAT
AGAAGGCAAATGTTTCACTGTAAGTAAAACAACCTCGCTCAACAGCAAGGTTATCTTGATAT
GAATTAGTATGGGATGATGAGATAGGCTCGGTCCGTATTTTGTGGTTTTAGTGGTCTGAGA
ATGATGAAGAGGGACAATTGGGGGTATTTCGTATTTACATGTCAGAGGTGGAATTCTTGATT
TTGGAAAGACGAACTAATGCGAAAGCATCTACCAAAGATGTTTTTCATTGATCAAGAACGAA
AGTTTTGGGGATCGAAGATGATTAGATACCATCGTAGTCTAAACCATAAACTATGCCGACTTG
CGATTGTTTTGTGTCAATTAATGAGCAGAGCAGCAGCACATGAGAAATCAAAGTCTTTGGG
TTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACC
AGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTACCAGGTCCAGACAT
AGGAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTT
CTTAGTTGGTGGAGCGATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCACAGCCTACTA
AATAGTGGTGTCTATGGCGACATAGGTGATTGCTTCTTAGAGGGACATTTTCGGTTTTACCGG
AAGGAAGTTTTGTGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCG
CTACACTGATGATTTCAACGAGTTGTTTATGTTGCTGTTTTTTGGCAATATTTTCCTTGTCGGT
AGGTCTGGGTAATCTTTTGAATGGTCATCGTGATGGGGCTAGATTTTTTGCAATTTTTAATCTC
CAACGAGGAATTCCTAGTAAACGCGAGTCATCAGCTCGCATTGATTACGTCCCTGCCCTTT
GTACACACCGCCCGTCGCACCTACCGATTGAACGTTCCGGTGAGACCTTTGGATCTGCTGA
TGTGGGGCGCAAGCCTTGTGTTGGCGGAGAAATTGAGCAAACCTTAACGTTTAGAGGAA
GGTGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGTGAA

>1709D

CAACCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTCGTACGCTTGTTTCAAAGGTTAAGCCATGCATGTCTC
AGTGTAAACTCATTGCACAGTGAACTGCGAACGGCTCATTAATCGGTTCTAGTCTCCAG
AGTGGTGTTCATCTAAATGGATACTTGTGGCAAATCTAGAAACAATACATGCTTGGAGG
CCTGACGGTGTTCCTGAAGGGCTGCATTTATTTGATGTTAGGACCAATACCTTTCGGGG
TGATTCGGGTGATTCAGAGTAACTATGCGAACCGCAGTGGCTTTTTGTGCGGCGGTGACTTT
ATGAGGTTCTGCCCTATCAGGCTTTGCAACGGGTATTGTCCTTTGCAACGGGTCACGGGTG
ACGGAGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAGACGGCTACCACATCCAAG
GAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACTCTATGCCAACGCGGCGAAGTAGTGACGAAAAATAG
GACTGGGTAGCGCTTTGCGTTATCTTTGTCCAATGAGAGCAATGTAAAAGCCTCATCGAGG
ATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTACA
CTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTCTAATGTATGGGAGTTGCGGGGTGGGTGTT
TGGTTGGTTTTGCGGACTAGACAAAACCTCGCTCCGCTTCCCGCTTGTTTTGCTCTCTTTTAA
AGAAGGCAAATGTTTCACTGTAAGTAAAACAACCTCGCTCAACAGCAAGGTTATCTTGATAT
GAATTAGTATGGGATGATGAGATAGGCTCGGTCCGTATTTTGTGGTTTTAGTGGTCTGAGA
ATGATGAAGAGGGACAATTGGGGGTATTTCGTATTTACATGTCAGAGGTGGAATTCTTGATT
TTGGAAAGACGAACTAATGCGAAAGCATCTACCAAAGATGTTTTTCATTGATCAAGAACGAA
AGTTTTGGGGATCGAAGATGATTAGATACCATCGTAGTCTAAACCATAAACTATGCCGACTTG
CGATTGTTTTGTGTCAATTAATGAGCAGAGCAGCAGCACATGAGAAATCAAAGTCTTTGGG
TTCCGGGGGGAGTATGGTTCGCAAGGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACC
AGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTACCAGGTCCAGACAT
AGGAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTT
CTTAGTTGGTGGAGCGATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCACAGCCTACTA
AATAGTGGTGTCTATGGCGACATAGGTGATTGCTTCTTAGAGGGACATTTTCGGTTTTACCGG
AAGGAAGTTTGTGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCG
CTACACTGATGATTTCAACGAGTTGTTTATGTTGCTGTTTTTGGCAATATTTTCCTTGTCGGTT
AGGTCTGGGTAATCTTTTGAATGGTCATCGTGATGGGGCTAGATTTTTTGCAATTTTTAATCTC
CAACGAGGAATTCCTAGTAAACGCGAGTCATCAGCTCGCATTGATTACGTCCCTGCCCTTT
GTACACACCGCCCGTCGCACCTACCGATTGAACGTTCCGGTGAGACCTTTGGATCTGCTGA
TGTGGGGCGCAAGCCTTGTTGTTGGCGGAGAAATTGAGCAAACCTTAACGTTTAGAGGAA
GGTGAAGTCGTAACAAGGTTT

>2845C

CAACCTTGGTTGATCCTGCCAGTAGTCGTACGCTTGTTTCAAAGGTTAAGCCATGCATGTCT
CAGTGTAACCTCATTGCACAGTGAACTGCGAACGGCTCATTAAATCGGTTCTAGTCTCCA
GAGTGGTGTTCATCTAAATGGATACTTGTGGCAAATCTAGAAACAATACATGCTTGGAG
GCCTGACGGTGTTCCTGAAGGGCTGCATTTATTTGATGTTAGGACCAATACCTTTCGGG
GTGATTCGGGTGATTCAGAGTAACTATGCGAACCGCAGTGGCTTTTTGTTCGGCGGTGACTT
TATGAGGTTCTGCCCTATCAGGCTTTGCAACGGGTATTGTCCTTTGCAACCGGTCACGGGT
GACGGAGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAGACGGCTACCACATCCAA
GGAAGGCAGCAGGCGGTAAATTACTCTATGCCAACGCGGCGAAGTAGTGACGAAAAATA
GGACTGGGTAGCGCTTTGCGTTATCTTTGTCCAATGAGAGCAATGTAAAAGCCTCATCGAG
GATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTAC
ACTAAAGTTGTTGCAGTAAAAAGCTCGTAGTCTAATGTATGGGAGTTGCGGTGTGGGTGT
TTGGTTGGTTTTGCCGACTAAACAATACTCGCTCCGCTTCCCGCGTTTTCTCTTTTTGTTTA
AGAAGGGATATTCCTGTAAGTAAAAACAACCTCGCTCAACAGCAAGGTTATCTTGATATG
AATTAGTATGGGATGATGAGATAGGCTCGGTCCGTATTTTGTGGTTTTAGTGGTCTGAGAA
TGATGAAGAGGGACAATTGGGGGTATTCGTATTTACATGTCAGAGGTGGAATCTTGATT
TGAAAGACGAACTAATGCGAAAGCATCTACCAAAGATGTTTTATTGATCAAGAACGAA
AGTTTTGGGGATCGAAGATGATTAGATACCATCGTAGTCTAAACCATAAACTATGCCGACTTG
CGATTGTTTTGTGTCATTTAATGAGCAGAGCAGCAGCACATGAGAAATCAAAGTCTTTGGG
TTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACC
AGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAACTTACCAGGTCCAGACAT
AGGAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTT
CTTAGTTGGTGGAGCGATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCACAGCCTACTA
AATAGTGGTGTCTATGGCGACATAGGTGATTGCTTCTTAGAGGGACATTCGGTTTTACCGG
AAGGAAGTTTTGTGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGG
CTACACTGATGATTTCAACGAGTTGTTTTATTGTTATTTTTGGTAATATTCCTTGTCCGTTA
GGTCTGGGTAATCTTTTGAATGGTCATCGTGATGGGGCTAGATTTTTGCAATTTTAATCTCC
AACGAGGAATTCCTAGTAAACGCGAGTCATCAGCTCGCATTGATTACGTCCCTGCCCTTGT
ACACACCGCCCGTCGCACCTACCGATTGAACGTTCCGGTGAGACCTTTGGATCTGCTGATG
TGGGGCGCAAGCCTTGTGTTGGCGGAGAAATTGAGCAAACCTTAAC

>6000B

CAACCTGGTTGATCCTGCCAGTAATCGCACGCTTGTCTCAAAGACTAAGCCATGCATGTCT
AAGTATAAGCGATTTATACGGTGAAACTGCGAACGGCTCATTAAAACAGTTATAGTTTCTTT
GAAAGTGTTTTTCTTTAGATGGATACTTGTGGCAAATCTAGAAATAATACATGCTTTAGGGC
CCGACTTTTGGGAAGGGCTGCATTTATTAGATATAAACCAATACCTCTCGGGGTTGTTTTGG
TGATTCATAGTAACTAAGCGAATCGCAGAGGTGTTTGTGCCGGCGATGTTCAATTCAAGTTTC
TGCCCCATCAATTGTCGATGGTAGGGTATTGGCCTACCATGATTGTTACGGGTGACGGAGAA
TCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAGACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAG
CAGGCGCGCAAATTACTCAATGTCAATTTCGACGAAGTAGTGACGAGAAATAACAGTGGGG
TGGGCTCAGCCTACTCTTTCTGTAATGAGAGCAATCTAAAACCCTCATCGAGGATCAACTG
GAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAACCTCAGCTCCGGTAGCGTGTATTAAGT
TGTTGCAGTAAAAAGCTCGTAGTTGAAGTATTGGTAGGACGGACCAGGCCTTTTGACGAA
TGTCGACTGTTGCTTTGCGTTTGATCTGGCCATCGTTGTCCGTTTGCCTCTTTGTGGGCGT
GGGTGGGCATCATTACTGTAAAAAATTAGAGTGTTC AAGCAAATCGTATGGTTGGAAT
AGAGTAGTATGGAATAATAAGATAGGACTTTGTTGCTATTTGTTGGTTTGCACATCAAAGT
AATGATTAACAGGGACAGTTGGGGGTATTCGTATTTGTTGTTGTCAGAGGTGAAATCTTGA
TTTACAAAAGACGAACA ACTGCGAAAGCATTACCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACG
AAAGTTAGGGGATCGAAGATGATTAGATACCATCGTAGTCTTAACCGTAAACGATGCCGAC
TTGCGATTGTCCGATGTTTTTTTCATATAGACTTGGGCAGCAGCACATGAGAAATCAAAGTC
TTTGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGC
ACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAA ACTTACCAGGTCC
AGACATAGGAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATG
GCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCACAGC
CTACTAAATAGTACGTGCTATGGCGACATAGTGGCGAGACTTCTTAGAGGGACATTTCCGTT
TTACCGGAAGGAAGTTTGTGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCG
ACGCGCGCTACACTGATGGATTCAACGAGTATGTGTCGATTTCGTTTCGTACGGTTCGACGGT
CCTAGACAGGAATGTCCGGGCAATCTTTTAAATGTCCATCGTGATGGGGCTAGATTTTTGCA
ATTCTTAATCTCCAACGAGGAATTCCTAGTAAACGCAAGTCATCAGCTTGCATTGATTACGT
CCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCACCTACCGATTGAACGATCCGGTGAAATCTTC
GGATCCTGTTGTTTTGCGTTAATTCGTGTGACGACGGGAAAAGTTGAGTAAACCTTATCGT
TTAGAGGAAGGTGAAGTCGTAACAAAGGTTTCCGTAGTGA

>6002A

CAACCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTCATACGCTTATCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTA
AGTATAAAGGCTTATACTCTGAAACTGCGAACGGCTCATTATATCAGTTATAGTTTCTTTGAT
AGTGTTTTTTCTACATGGATACTTGTGGCAAATCTAGAAACAATACATGCGTACAGGCCTGA
CTTTGGGGGAGGGCTGCATTTATTTGACTTAAGCCAATACCCCTCGGGGTTGTTTTGGTGAT
TCAGAATAACTGAGCGAATCGCATAGCTTTCGGGGCGGCGATGAATCATTCAAGTTTCTGCC
CCATCAGCTGTCGATGGTAGGGTATAGGCCTACCATGGCTGTCACGGGTGACGGAGAATTA
GGGTTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAGACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAG
GCGCGTAAATTACTCAATGTTGACTCGACGAAGTAGTGACGAGAATTAACAATGCGGAGCG
CTCAGCGTTTTGCAATTGGAATGAGAGCAATGTAAAAGCCTCATCGAGGATCCATTGGAGG
GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATACTAAAGTTGTTG
CAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAACCTCTGGTAGGGCCGACCTTGGCGCGCGGTGAATGCC
GCGCTGTTTAGAAAGCGTCGCTGCCCGGCCATCTCCCCCGTCTTTTGGGCTGGGGGTCG
TTACTGTAAAAAAAATAGAGTGTTCCAAGCAGGGGGTAATATCCCGGTATATAGTAGTATG
GAATAATGAGATAGGACTTTGGTACTATTTTGTGGTTTGCATGCCAAGGTAATGATTAAGA
GGGACAGTTGGGGGTATTTCGTATTTAGATGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTTCGAAAGA
CGAACTACTGCGAAAGCATTACCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGG
ATCGAAGATGATTAGATACCATCGTAGTCTTAACCGTAAACTATGCCGACTTGCATTGTCC
GGCGTCGCTTTTAGATGACCTGGGCAGCAGCACATGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCCG
GGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGA
GTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTTACCAGGTCCGGACATAGGA
AGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAG
TTGGTGGAGTGATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCACAGCCTACTAAATAG
TGGCCGTTATGGCGACATAGCGGTGAACTTCTTAGAGGGACATTCGGGTATACCGGAAGG
AAGTTTGTGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTAC
ACTGATCGGTTCAACGAGTATTTGTTTTTTTCTCATTTTGGGAGGGGGCAGAGTCCTTGGCC
GGAAGGTCTGGGTAATCTTTTGAATGCCGATCGTGATGGGGCTAGATTTTGTCAATTATTA
TCTCCAACGAGGAATTCCTAGTAGACGCAAGTCATCAGCTTGCATCGATTACGTCCCTGCC
CTTTGTACACACCGCCCGTCGCACCTACCGATTGAACGATCCGGTGAGACCTTGGGATTCT
GTTGTGGCTGATTCATTTTGGCTGCGATGGGAGAACTTGAGCAAACCTTATCGTTTAGAGG
AAGGTGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGTGA

>6005A

CAACCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTCATACGCTTATCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTA
AGTATAAAGGCTTATACTCTGAAACTGCGAACGGCTCATTATATCAGTTATAGTTTCTTTGAT
AGTGTTTTTTCTACATGGATACTTGTGGCAAATCTAGAAACAATACATGCGTACAGGCCTGA
CTTTGGGGGAGGGCTGCATTTATTTGACTTAAGCCAATACCCCTCGGGGTTGTTTTGGTGAT
TCAGAATAACTGAGCGAATCGCATAGCTTTCGGGCGGGCGATGAATCATTCAAGTTTCTGCC
CCATCAGCTGTCGATGGTAGGGTATAGGCCTACCATGGCTGTCACGGGTGACGGAGAATTA
GGGTTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAGACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAG
GCGCGTAAATTACTCAATGTTGACTCGACGAAGTAGTGACGAGAATTAACAATGCGGAGCG
CTCAGCGTTTTGCAATTGGAATGAGAGCAATGTAAAAGCCTCATCGAGGATCCATTGGAGG
GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATACTAAAGTTGTTG
CAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAACCTCTGGTAGGGCCGACCTTGGCGCGCGGTGAATGCC
GCGTTGTTTAGAAAGCGTCGCCGCCCGGCCATCTCCCCCGTCTTTTGGGCTGGGGGTCG
TTACTGTAAAAAAAATAGAGTGTTCCAAGCAGGGGGTAATATCCCGGTATATAGTAGTATG
GAATAATGAGATAGGACTTTGGTACTATTTTGTGGTTTGCATGCCAAGGTAATGATTAAGA
GGGACAGTTGGGGGTATTTCGTATTTAGATGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTTCGAAAGA
CGAACTACTGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAAATCAAGAACGAAAGTTAGGGG
ATCGAAGATGATTAGATACCATCGTAGTCTTAACCGTAAACTATGCCGACTTGCATTGTCC
GGCGTCGCTTTTAGATGACCTGGGCAGCAGCACATGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCCG
GGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGA
GTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTTACCAGGTCCGGACATAGGA
AGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAG
TTGGTGGAGTGATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCACAGCCTACTAAATAG
TGGCCGTTATGGCGACATAGCGGTGAACTTCTTAGAGGGACATTCGGGTATACCGGAAGG
AAGTTTGTGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTAC
ACTGATCGGTTCAACGAGTATTTGTTTTTTTCTCATTTTGGGAGGGGGCAGAGTCCTTGGCC
GGAAGGTCTGGGTAATCTTTTGAATGCCGATCGTGATGGGGCTAGATTTTGTCAATTATTA
TCTCCAACGAGGAATTCCTAGTAGACGCAAGTCATCAGCTTGCATCGATTACGTCCCTGCC
CTTTGTACACACCGCCCGTCGCACCTACCGATTGAACGATCCGGTGAGACCTTGGGATTCT
GTTGTGGCTGATTCATTTTGGCTGCGATGGGAGAACTTGAGCAAACCTTATCGTTTAGAGG
AAGGTGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGTGA

>6006D

CAACAATGGTTGATCCTGCCAGTAGTCATACGCTTATCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCT
AAGTATAAAGGCTTATACTCTGAAACTGCGAACGGCTCATTATATCAGTTATAGTTTCTTTGA
TAGTGTTTTTTCTACATGGATACTTGTGGCAAATCTAGAAACAATACATGCGTACAGGCCTG
ACTTTGGGGGAGGGCTGCATTTATTTGACTTAAGCCAATACCCCTCGGGGTTGTTTTGGTGA
TTCAGAATAACTGAGCGAATCGCATAGCTTTCGGGCGGCGATGAATCATTCAAGTTTCTGC
CCCATCAGCTGTTCGATGGTAGGGTATAGGCCTACCATGGCTGTACGGGTGACGGAGAATT
AGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAGACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCA
GGCGCGTAAATTACTCAATGTTGACTCGACGAAGTAGTGACGAGAATTAACAATGCGGAGC
GCTCAGCGTTTTGCAATTGGAATGAGAGCAATGTAAAAGCCTCATCGAGGATCCATTGGAG
GGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATACTAAAGTTGTT
GCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAACCTCTGGTAGGGCCGACCTTGGCGCGCGGTGAATGC
CGCGTCGTTTAGAAGCGTCGCTGCCCGGCCATCTCCCCCGTCTTTTGGGCTGGGGGTCG
TTACTGTAAAAAAAATAGAGTGTTCCAAGCAGGGGGTAATATCCCGGTATATAGTAGTATG
GAATAATGAGATAGGACTTTGGTACTATTTTGTGGTTTGCATGCCAAGGTAATGATTAAGA
GGGACAGTTGGGGGTATTTCGTATTTAGATGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTTCGAAAGA
CGAACTACTGCGAAAGCATTACCAAGGATGTTTTCATTAAATCAAGAACGAAAGTTAGGGG
ATCGAAGATGATTAGATACCATCGTAGTCTTAACCGTAAACTATGCCGACTTGCATTGTCC
GGCGTCGCTTTTAGATGACCTGGGCAGCAGCACATGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCCG
GGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGA
GTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTTACCAGGTCCGGACATAGGA
AGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAG
TTGGTGGAGTGATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCACAGCCTACTAAATAG
TGGCCGTTATGGCGACATAGCGGTGAACTTCTTAGAGGGACATTCGGGTATAACCGGAAGG
AAGTTTGTGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTAC
ACTGATCGTTCAACGAGTATTTGTTTTTTTCTCATTTTGGGAGGGGGCAGAGTCCTTGGCC
GGAAGGTCTGGGTAATCTTTTGAATGCCGATCGTGATGGGGCTAGATTTTGTCAATTATTA
TCTCCAACGAGGAATTCCTAGTAGACGCAAGTCATCAGCTTGCATCGATTACGTCCCTGCC
CTTTGTACACACCGCCCGTCGCACCTACCGATTGAACGATCCGGTGAGACCTTGGGATTCT
GTTGTGGCTGATTCATTTTGGCTGCGATGGGAGAACTTGAGCAAACCTTATCGTTTAGAGG
AAGGTGAAGTCGTAACAAGGTTTCCG

>6006E

CAACCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTCATACGCTTATCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTA
AGTATAAAGGCTTATACTCTGAAACTGCGAACGGCTCATTATATCAGTTATAGTTTCTTTGAT
AGTGTTTTTTCTACATGGATACTTGTGGCAAATCTAGAAACAATACATGCGTACAGGCCTGA
CTTTCGGGGAGGGCTGCATTTATTTGACTTAAGCCAATACCCCTCGGGGTTGTTTTGGTGAT
TCAGAATAACTGAGCGAATCGCATAGCTTTCGGGGCGGCGATGAATCATTCAAGTTTCTGCC
CCATCAGCTGTCGATGGTAGGGTATAGGCCTACCATGGCTGTCACGGGTGACGGAGAATTA
GGGTTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAGACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAG
GCGCGTAAATTACTCAATGTTGACTCGACGAAGTAGTGACGAGAATTAACAATGCGGAGCG
CTTTGCGTTTTGCAATTGGAATGAGAGCAATGTAAAAGCCTCATCGAGGATCCATTGGAGG
GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATACTAAAGTTGTT
GCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAACCTCTGGTAGGGCCGACCTTGGCCCGCGGTGAATGC
CGCGGTGTTTTTCAGAGTGTCTGTTGCCCGGCCATCCTCTCCCGGTTTTCTTTTAGGGGCTGG
GGGTCGTTTACTGTAAAAAAAATAGAGTGTTCCAAGCAGGGGGTAATATCCCGGTATATAGT
AGTATGGAATAATGAGATAGGACTTTGGTACTATTTTGTGGTTTGCATGCCAAGGTAATGA
TTAAGAGGGACAGTTGGGGTATTCGTATTTAGATGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTTCG
AAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTACCAAGGATGTTTTCATTAAATCAAGAACGAAAGTT
AGGGGATCGAAGATGATTAGATACCATCGTAGTCTTAACCGTAAACTATGCCGACTTGCAT
TGTCCGGCGTCGCTTTTAGATGACCTGGGCAGCAGCACATGAGAAATCAAAGTCTTTGGGT
TCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACC
AGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTACCAGGTCCGGACAT
AGGAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTT
CTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCACAGCCTACTA
AATAGTGGCCGTTATGGCGACATAGCGGTGAACTTCTTAGAGGGACATTCGGGTATACCG
GAAGGAAGTTTGTGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGC
GCTACACTGATCGGTTCAACGAGTATTTGTTATTCTTCCTTTTGGGGAGGTGGCAGAGTCCT
TGGCCGGAAGGTCTGGGTAATCTTTTGAATGCCGATCGTGATGGGGCTAGATTTTTGCAATT
ATTAATCTCCAACGAGGAATTCCTAGTAGACGCAAGTCATCAGCTTGCATCGATTACGTCCC
TGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCACCTACCGATTGAACGATCCGGTGAGACCTTGGGA
TTCTGTTGTGGCTGATTATATTTTGGCTGCGATGGGAGAAGTGAACAACTTATCGTTTAG
AG

>6423

AACCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAA
GTATAAGCACTTTATACTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAATCAGTTATAGTTTATTTGAT
AATACCTTACTACTTTGGATAACCGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCTAAAAACCCCGAC
TTCTGGAAGGGGTGTATTTATTAGATAAAAAACCAATCGGGGCAACCCGTTTACAGGTGAA
TCATGATAACTATTTCGAATCGCAGGACTTTATGTGCGGCGATGGTTCATTCAAATTTCTGCCCT
ATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTTTTAACGGGTAACGGAGAATTAGG
GTTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTAACCCACATCTAAGGAAGGCAGCAGG
CGCGCAAATTACCCAATTCCTGACACAGGGAAGGTAGTGACRATAAATAACAAATACAGAG
CTCTTCGAGTTTTGTAATTGTAATGAGTACAATTTACATCTCTTAACGAGAACCAATTTGGA
GGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGGCGTATATTAAAGTTG
TTGCAGTTAAAAAAGCTCGTAGTTGAACTTTGGACTCGGTTGGGCGGTCTCCTTTAATGGT
TGCACTTCTCTGGCCGGGTCTTTCCTTCTGGCTAGCTACTGTTCTATTTCATTTAGTGCGGTAG
GGATCCAGGACTTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTTAAAGCAGGCTTACGCTTGAATAC
ATTAGCATGGAATAATAAAATAGGACTTTGGTTTTATTTTGTGGTTTCTAAGACCAAAGTAA
TGATTAATAGGGACAGTTGGGGGCATTTGTATTTAGTCGTCAGAGGTGAAATTCCTGGATTG
ACTAAAGACAAACTTCTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAA
GTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAG
GGATCGGACGCTGTTTCATTAATGACGCGTTCGGCACCTTATGAGAAATCAAAGTTTTTAGG
TTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACC
AGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAACTCACCAGGTCCAGACAT
AATAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCCTTGATTTTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTT
TTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGGTTAATTCGTTAACGAACGAGACCTAACCTGCTAAA
TAGTTGCATCAACTCTGGTTGATGATCAACTTCTTAGAGGGACTATAGACGCTTAGTCTATG
GAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGGCTA
CACTGATGAAGGCAGCAAGTAATTCACCTTGGCCGGAAGGTCTGGGTAATCTTCTGAAACT
TTATCGTGCTGGGGATAGTCCTTTGCAATTATTGGACTTTAACGAGGAATTCCTAGTAAGCG
TGAGTCATCAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTGTACRCACCGCCCGTCGCTAGTAC
CGATWGAATGGCTTAGTGAGACCTCCGGATTGGCGGTATGTTGGTGGCAACACCTCTTTAA
CTGCCGAGAAGCTGGTCAAACCTTGGTCATTTAGAGGGAAGGTGAAGTCGTAAACAAGG

Anhang 2

Accession numbers der im phylogenetischen Stammbaum verwendeten Stämme aus der Datenbank des NCBI

<i>Thraustochytrium kinnei</i> (strain 1694d):	L34668.1
<i>Thraustochytrium aureum</i> (strain ATCC 34304):	AB022110.1
<i>Japonochytrium sp.</i> (strain ATCC 28207):	AB022104.1
<i>Ulkenia visurgensis</i> (strain ATCC 28208):	AB022116.1