

RAČÍ MOR – PŘEHLED DOSAVADNÍCH POZNATKŮ O ZÁVAŽNÉM ONEMOCNĚNÍ RAKŮ A ZHODNOCENÍ SITUACE V ČESKÉ REPUBLICCE

CRAYFISH PLAGUE – REVIEW OF PRESENT KNOWLEDGE ON SERIOUS DISEASE OF CRAYFISH AND EVALUATION OF THE SITUATION IN THE CZECH REPUBLIC

E. KOZUBÍKOVÁ, A. PETRUSEK

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra ekologie, Viničná 7, Praha 2, 128 44
e-mail: evikkk@post.cz, petrusek@cesnet.cz

Abstract

Crayfish plague caused by the oomycete *Aphanomyces astaci* (Saprolegniales) had eradicated many indigenous crayfish populations throughout Europe at the turn of the 19th and 20th centuries. The pathogen spreads by actively swimming zoospores; its mycelium grows in the crayfish cuticle. Crayfish affected by the disease show unusual diurnal activity, spasmodic limb movements, subsequent loss of limbs, and finally they die. *Aphanomyces astaci* is highly specific to crayfish; it does not infect other aquatic invertebrates or fish. The diagnosis of crayfish plague was originally based on the pathogen cultivation; more reliable molecular methods are available presently. Original hosts and carriers of *A. astaci* are North American crayfish species, resistant to the acute disease as the pathogen growth in their cuticle is usually restricted by a strong immune response. Introduction of such species (especially *Orconectes limosus*, *Pacifastacus leniusculus* and *Procambarus clarkii*) to Europe and their further spread made crayfish plague again a serious threat for indigenous crayfishes. Transmission of the pathogen can be either direct from infected crayfish or indirect via water or equipment contaminated by zoospores. In Czechia, many plague outbreaks were recorded over a century ago but only few records exist from the last decades. Between 2004 and 2008, however, we confirmed eight plague-caused mass mortalities of indigenous crayfishes. Infected American crayfish were detected by molecular methods in 17 out of 28 tested Czech populations. Such populations represent permanent reservoirs of infection. In conclusion, crayfish plague became recently one of the most serious problems for native crayfish conservation in Czechia.

Klíčová slova: račí mor, *Aphanomyces astaci*, Oomycetes, američtí raci, patogen

Key words: crayfish plague, *Aphanomyces astaci*, Oomycetes, American crayfish, pathogen

ÚVOD

Račí mor je onemocnění smrtelné pro původní evropské druhy raků. Způsobuje ho parazit *Aphanomyces astaci* (Oomycetes) a infekce je přenášena jeho původními hostiteli, raky pocházejícími ze Severní Ameriky. Ti byli do Evropy introdukováni a dnes je můžeme najít ve volných vodách většiny evropských zemí. V České republice se vyskytují pouze dva původní druhy raků, rak říční (*Astacus astacus*) a rak kamenáč (*Austropotamobius torrentium*). Oba jsou v současnosti negativně ovlivňováni mnoha faktory (např. znečištění vody, regulace toků, intenzivní rybářské aktivity, zvýšená predace) a patří podle zákona k druhům kriticky ohroženým. Na našem území se vyskytuje také rak bahenní (*Astacus leptodactylus*), který má status druhu ohroženého, i když zde s největší pravděpodobností není původní. Pochází z východní Evropy a u nás se aklimatizoval poté, co byl před více než sto lety vysazen. Česká račí fauna byla dále obohacena o dva severoamerické druhy, raka pruhovaného (*Orconectes limosus*) a raka signálního (*Pacifastacus leniusculus*). Rak pruhovaný se k nám rozšířil Labem z Německa a dnes obývá kromě velké části tohoto toku i Vltavu, dolní úseky jejich přítoků a některé izolované stojaté vody (Petrusek a kol., 2006; Filipová a kol., 2006a). Dalším zdrojem šíření tohoto druhu v blízké budoucnosti pak může být přilehlé slezské území Polska, odkud nedávno rak pruhovaný hranice ČR překročil (Ďuriš a Horká, 2007). Rak signální u nás byl zaznamenán zatím jen na několika lokalitách na Moravě a v jižních a západních Čechách, kde byl vysazen (Kozák a kol., 2001; Filipová a

kol., 2006b). Oba severoamerické druhy mohou v blízké budoucnosti proniknout na jihovýchod našeho území i tokem Moravy, na jejímž dolním toku byly v posledním desetiletí zaznamenány (Pöckl a Pekny, 2002; Petrusek a Petrusková, 2007).

Rak signální a rak pruhovaný jsou konkurenčně úspěšnější než původní evropské druhy (lépe snášejí znečištění vody, rychleji rostou a rozmnožují se, bývají agresivnější; Lindqvist a Huner, 1999) a k úbytku či vytlačení původního druhu tedy časem může dojít i bez přítomnosti původce račího moru (Schulz a kol., 2006). Proto jsou tyto severoamerické druhy v evropských vodách v každém případě nežádoucí.

Přestože se u nás vyskytují jak ohrožení raci citliví k račímu moru, tak jeho potenciální přenašeči, nevěnovalo se tomuto onemocnění až donedávna mnoho pozornosti a úhyny raků byly často dávány do souvislosti se znečištěním vody, aniž by se zjišťovala jejich přesná příčina. Teprve v posledních letech u nás probíhá výzkum rozšíření *A. astaci*. Jeho dosavadní výsledky spolu se souhrnem základních informací o račím moru přináší následující text.

Historie zkoumání původce račího moru

Račí mor zdecimoval během druhé poloviny 19. a začátku 20. století mnoho populací původních druhů raků v Evropě, což výrazně ovlivnilo objem úlovků raků a tehdy rozvinutý obchod s nimi. Proto byl velký zájem o to, aby byla poznána podstata nemoci a zjištěn původce, způsob jeho šíření a případná léčba nebo alespoň prevence. Šlo o zcela neznámou nemoc a vědci začínali hledat její příčinu, aniž by měli jakékoli vodítko, jakým směrem se ubírat.

Jako jeden z prvních se o identifikaci patogenu pokoušel profesor mnichovské univerzity B. Hofer na sklonku 19. století (Söderhäll a Cerenius, 1999). Za původce moru označil ve své práci z roku 1898 bakterii, kterou nazval *Bacillus pestis astaci* (Krupauer, 1968). Proti jeho zjištění ale v roce 1903 vystoupil F. Schikora, který popsal v souvislosti s račím morem organismus podobný vláknité houbě a zařadil ho do skupiny Oomycetes pod názvem *Aphanomyces astaci*. Spor o původce račího moru byl vyřešen až po více než třiceti letech, v roce 1934, kdy O. Nybelin provedl první úspěšnou izolaci *A. astaci* z hynoucích raků a infekčními pokusy potvrdil schopnost získaných kultur vyvolat račí mor u pokusných zvířat. To byl jednoznačný důkaz, že *A. astaci* je původcem onemocnění (Söderhäll a Cerenius, 1999).

Hofer se Schikorou se také neshodovali v otázce, zda je rak pruhovaný (tehdy označovaný jako *Cambarus affinis*) odolný proti račímu moru. Hofer tvrdil, že tento druh je stejně náchylný jako ostatní raci, Schikora naopak, že je vůči onemocnění imunní (Volf, 1926).

Výsledky Nybelinových pokusů záhy ověřili a v dalším výzkumu pokračovali W. Schäperclaus (1935) a E. Rennerfelt (1936). Druhý zmíněný autor publikoval studii o kultivaci, fyziologii a životním cyklu *A. astaci* a podal také první podrobnější popis parazita z čisté kultury (Söderhäll a Cerenius, 1999). Kromě hyf a sporangií (asexuální část životního cyklu) pozoroval a popsal struktury podobné oogoniím, které slouží k sexuálnímu rozmnožování oomycetů, a logicky usoudil, že *A. astaci* se rozmnožuje i pohlavně. Avšak indukovat tvorbu sexuálních stadií se od té doby nikomu dalšímu nepodařilo (Söderhäll a Cerenius, 1999) a dnes je *A. astaci* považován za druh bez pohlavního rozmnožování (Alderman a kol., 1984), což může být přizpůsobení k parazitickému způsobu života. Sexuální rozmnožování totiž chybí i u jiných parazitů z rodu *Aphanomyces* napadajících živočichy, např. u parazita ryb *A. invadans* (Diéguez-Uribeondo a kol., 2009). Závěru o chybějící schopnosti sexuálního rozmnožování odpovídají i výsledky analýzy genetické variability *A. astaci* (viz kap. Genetická variabilita *A. astaci*). Zjištění oogonií Rennerfeltem tedy zůstalo ojedinělé a je velmi pravděpodobné, že šlo o pozorování artefaktů nebo byla kultura kontaminována jiným, pravděpodobně neparazitickým druhem rodu *Aphanomyces*

množícím se i pohlavně (Söderhäll a Cerenius, 1999). Z Rennerfeltova popisu *A. astaci* vycházeli pak i další autoři. Zmínku o sexuálním rozmnožování tak najdeme i v pozdějších specializovaných monografiích o oomycetech (např. Cejp, 1959) nebo přímo rodu *Aphanomyces* (Scott, 1961).

Pracovištěm s dlouhou tradicí ve výzkumu račího moru je Univerzita v Uppsale ve Švédsku, kde se tímto onemocněním raků zabýval v 60. a 70. letech 20. století T. Unestam. Zajímal se především o fyziologii *A. astaci* v laboratorních podmínkách a o vztah mezi patogenem a jeho hostiteli. Na jeho práci později ve Švédsku plynule navázali K. Söderhäll, L. Cerenius a další. Račím morem se více zabýval také D. J. Alderman ve Velké Británii. V současnosti probíhá výzkum především v oblasti vyvíjení spolehlivých a rychlých postupů k diagnostice patogenu.

Zařazení, životní cyklus a fyziologie původce račího moru

Dnes víme, že patogenem způsobujícím onemocnění zvané račí mor je *Aphanomyces astaci* (aphano – z řečtiny skrytý, neviditelný; myces – houba; česky se druh nazývá hnileček račí; Cejp, 1959), organismus řazený do říše Chromista, oddělení Oomycota, třídy Oomycetes, řádu Saprolegniales a čeledi Saprolegniaceae (hnilobytkovitě).

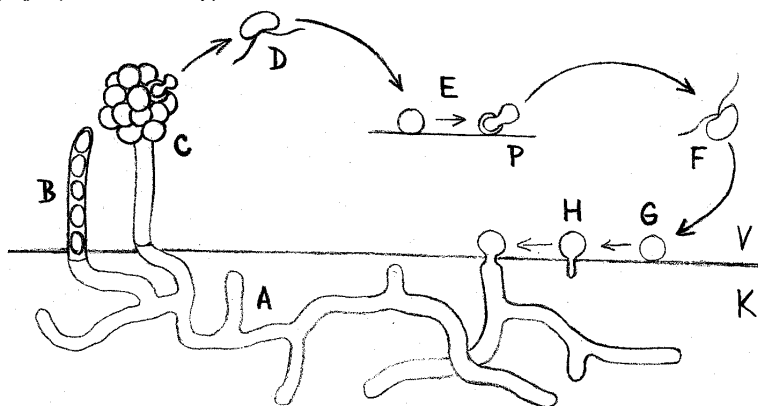
Jak bylo již výše popsáno, u *A. astaci* je znám pouze asexuální životní cyklus (Obr. 1). Mycelium rostoucí v substrátu (v těle hostitele – raka) tvoří za určitých podmínek sporangia. Ta produkují do vodního prostředí pohyblivé zoospory, které umožňují šíření patogenu. Po přisednutí na podklad vznikají ze zoospor cysty. Pokud je tímto podkladem povrch těla raka, cysty klíčí a parazit prorůstá do kutikuly, čímž se cyklus uzavírá. V případě, že zoospora encystuje na nevhodném povrchu, může se cysta znovu změnit v zoosporu a pokračovat ve vyhledávání vhodného hostitele (jev v anglické literatuře označovaný jako „repeated zoospore emergence“). U *A. astaci* nebyla nalezena žádná trvalá stadia (cysty vznikající po přisednutí zoospor na nevhodný substrát mají životnost v řádu dnů) a nebyl zjištěn ani žádný mezihostitel (Unestam, 1969a; Alderman a Polglase, 1986).

Obr. 1. Životní cyklus *Aphanomyces astaci*.

(K – kutikula raka; V – voda; P – jiný povrch než račí kutikula; A – mycelium; B – sporangium s primárními spory; C – „spore ball“; útvar tvořený primárními cystami; D – uvolněná zoospora; E – encystace a opětovné uvolnění zoospory; F – zoospora druhé generace; G – cysta, H – klíčící cysta), upraveno dle Cerenius a kol., 1988.

Fig. 1. Life cycle of *Aphanomyces astaci*.

(K – crayfish cuticle, V – water, P – other surface than crayfish cuticle, A – mycelium, B – sporangium with primary spores, C – spore ball, D – free zoospore, E – encystment and re-emergence of zoospore, F – zoospore of the second generation, G – cyst, H – germinating cyst), according to Cerenius et al., 1988.



Hyfy *A. astaci* jsou 7–10 μm široké, nepřehrádkované (přehrádky jsou jen v místech oddělení sporangii), větvené a rostoucí uvnitř substrátu, nejen na jeho povrchu (Cerenius a kol., 1988). V kultuře byly pozorovány také spirálovitě stočené hyfy (Alderman a Polglase, 1986). Hyfy rostou v kutikule hostitele často paralelně s vlákny chitinu (Nyhlén a Unestam, 1975). Podle druhu napadeného raka zůstane růst mycelia omezen jen na kutikulu nebo hyfy prorůstají do celého těla. Už Rennerfelt (1936; citováno v Söderhäll a Cerenius, 1999) zjistil, že růst je zastaven při teplotě vyšší než 25 °C a že patogen nepřežívá vyschnutí.

Tvorba sporangii je indukována kontaktem s vodou v případě, když mycelium vyroste na povrch těla hostitele (to se děje ve větší míře např. při svlékání nebo uhynutí raka). Indukce sporulace je pravděpodobně způsobena nedostatkem živin ve vodě oproti jejich vysoké koncentraci v substrátu (Söderhäll a Cerenius, 1999). Sporangia vznikají z nediferencovaných hyf, jsou protáhlá a mívají stejný průměr jako hyfy. Tvoří se většinou na jejich koncích, ale v kultuře byla pozorována i sporangia interkalární (Alderman a Polglase, 1986). Vytváření sporangii probíhá rychle (v kultuře trvá kolem 20 h) a rychlost tohoto procesu je ovlivněna teplotou vody (Alderman a Polglase, 1986).

Uvnitř sporangia se rozdělením cytoplazmy na menší jednotky formují primární spory. V jednom sporangiu vzniká kolem 15–30 spor uspořádaných za sebou. Uvolňují se otvorem na špičce sporangia, kde ihned probíhá první encystace. Spora se při ní zakulatí a na povrchu se vytvoří buněčná stěna (Olson a kol., 1984). Buněčné stěny primárních cyst jsou spolu spojeny, takže zacystované spory se hned nerozptýlí do okolí, ale vytváří pro rod *Aphanomyces* charakteristické kulovité útvary z cyst držících pohromadě (důležitý rozlišovací znak od jiných rodů oomycetů). V angličtině se pro tyto útvary používá elegantní výraz „spore balls“ (Obr. 1). Někdy se spory ze sporangia neuvolní a encystace proběhne uvnitř něj. I takové cysty jsou schopné normálního klíčení a tvorby hyf (Alderman a Polglase, 1986).

Z primárních cyst se uvolňují zeslabenou částí buněčné stěny zoospory o velikosti asi 8 x 12 μm . Jejich tvar je ledvinovitý a jsou pohyblivé. K pohybu jim slouží dva bočně připojené bičíky. Než se bičíky plně vytvoří, pohybují se zoospory pomalu a nekoordinovaně (Alderman a Polglase, 1986). Podle Rennerfelta (1936; citováno v Söderhäll a Cerenius, 1999) jsou zoospory uvolňovány už při velmi nízkých teplotách (2–6 °C).

Zoospory aktivně (chemotakticky) vyhledávají nového hostitele. Chemotaxi se sice nepodařilo jasně prokázat Unestamovi (1966), ale Cerenius a Söderhäll (1984a) později uspěli při pozorování pohybu zoospor směrem k račí končetině (výsledek byl stejný u raka říčního, pruhovaného i signálního). Nejvíce byly zoospory přitahovány ke kloubům a špičkám končetin, kde není kutikula sklerotizovaná. Chemotaktická odpověď byla pozorována při různých teplotách vody (5–20 °C). Také při použití kousku agaru obsahujícího extrakt z račích končetin zoospory chemotakticky reagovaly. Jelikož ale byly spory přitahovány i k jiným substrátům (reagovaly např. na extrakt z kořenů hrachu), autoři usoudili, že chemotaxe je nespecifická. Zoospora je podle nich přitahována různými potenciálními zdroji živin a chemotaxe tedy není zodpovědná za hostitelskou specifitu parazita k rakům.

Pohyblivá fáze je krátká, zoospory přežívají jen několik dnů až týdnů. Životnost zoospor byla hodně studována vzhledem k jejím praktickým důsledkům. Doba závisí na teplotě vody a kmenu parazita (Alderman a kol., 1987; Diéguez-Uribeondo a kol., 1995). V laboratorních podmínkách při teplotě 10 °C byly spory schopné infekce ještě po 6 dnech od uhynutí raka, po 9 dnech se však už nákaza zdravého raka nepodařila (Matthews a Reynolds, 1990). Ve 14 °C byly zoospory z uhynulých raků schopné infikovat pokusná zvířata déle než týden (Unestam, 1969a). Podle Rennerfelta (1936; citováno v Söderhäll a Cerenius, 1999) přežijí zoospory až 2 týdny v bahně. Studie citované v Oidtmann a kol. (2002b) ukázaly, že při nižších teplotách (od 0 do 10 °C) žijí zoospory 14 dní i déle. Životnost zoospor je prodloužena opakovanou schopností encystace na pevných substrátech na omezenou dobu (Söderhäll a Cerenius, 1999).

Bylo zjištěno, že tvorbě sporangií a tím i produkci zoospor zabraňuje přítomnost hořečnatých iontů (Rantamäki a kol., 1992). Také růst mycelia v kultuře byl zpomalen nebo zastaven, fáze tvorby sporangií je však k působení těchto iontů nejcitlivější. Přidání $MgCl_2$ (při výsledné koncentraci alespoň 100 mM) do akvária s nakaženým rakem fungovalo jako velmi účinná prevence přenosu onemocnění na zdravé pokusné jedince. Tento poznatek se zdá být vhodný pro použití v praxi (např. v chovech raků). Ovlivnění patogenu je však vratné, když přestane inhibitor působit, pokračuje *A. astaci* dál ve svém vývoji. Je možné, že právě zvýšená koncentrace hořečnatých iontů omezující produkci zoospor umožňuje dlouhodobé přežívání raků bahenních v některých tureckých jezerech s neobvyklým chemismem, v nichž je hlášen výskyt račího moru již od 80. let 20. století (Harlioğlu, 2008).

Po mobilní fázi následuje přisednutí zoospory na povrch těla raka, a to nejčastěji na části těla s měkkou kutikulou (např. spodní strana zadečku). Parazit se také spíše dostane do těla v místech poranění (Nyhlén a Unestam, 1980). Naopak proniknutí do hostitele skrz tvrdou kutikulu je méně pravděpodobné (Nyhlén a Unestam, 1975).

Zoospora po přisednutí na povrch odvrhne bičíky a mění se v cystu. Encystace probíhá velmi rychle (několik desítek sekund) (Olson a kol., 1984) a buněčná stěna je kompletně vytvořena do 15 minut (Cerenius a Söderhäll, 1984c). Cysta není pravým klidovým stadiem, její životnost je omezena na několik dnů (Edgerton a kol., 2002). Encystace zoospor byla v laboratoři vyvolána různými faktory, např. mechanicky (třepáním), přidáním růstového média (živin) nebo $CaCl_2$ (Cerenius a Söderhäll, 1984c).

Cysta asi během hodiny po přisednutí zoospory klíčí, narušuje kutikulu raka a prorůstá do ní. Klíčení se dá u cyst uměle vyvolat přidáním roztoku $CaCl_2$. Pronikání hyfy do kutikuly je umožněno nejprve její lipolytickou aktivitou narušující svrchní vrstvu kutikuly a dále produkcí extracelulárních proteináz a chitináz parazitem (Söderhäll a Cerenius, 1999). Chitinázy jsou u *A. astaci* produkovány neustále během klíčení a růstu mycelia (i v kultuře bez přítomnosti chitinu) na rozdíl od jiných příbuzných druhů oomycetů, které produkují tyto enzymy jen jako reakci na chitin. To je považováno za jedno z přizpůsobení parazitickému způsobu života (Andersson a Cerenius, 2002). Hostitel naopak produkuje inhibitory těchto enzymů (různě účinné u různých druhů raků), což je součástí jeho imunitní odpovědi (Diéguez-Uribeondo a Cerenius, 1998).

Pokud zoospora přisedne na nevhodný povrch, např. na tělo hmyzu, nemůže klíčit, protože zde chybí signál, jež by klíčení indukoval (Söderhäll a Cerenius, 1999). Změní se sice v cystu, ale následně se může opět přeměnit v pohyblivou zoosporu, která pokračuje v hledání vhodnějšího hostitele. Tento proces se povedlo v laboratoři zopakovat až třikrát. Třetí generace zoospor měla však o něco menší schopnost klíčit než generace předchozí. Jakmile ale cysta jednou začne klíčit, není už zpětná změna na zoosporu možná (Cerenius a Söderhäll, 1984c). Schopnost zoospor opakovaně encystovat je zřejmě dalším přizpůsobením k parazitismu (Söderhäll a Cerenius, 1999).

Zdá se, že fázi rozhodující o vysoké specifitě *A. astaci* k rakům není chemotaxe zoospor ani encystace, ale právě klíčení cyst (Söderhäll a Cerenius, 1999). Tomu by odpovídalo, že schopnost opakované tvorby zoospor z cyst (v případě, že na substrátu není cystou nalezen potřebný spouštěč klíčení) byla objevena i u jiných parazitických oomycetů (např. paraziti rostlin *Aphanomyces cochlioides* a *A. euteiches* nebo parazit ryb *Saprolegnia parasitica*) a naopak se zřejmě nevyskytuje u saprofytů (např. *A. laevis* a další) (Söderhäll a Cerenius, 1999).

K normálnímu průběhu různých fází životního cyklu *A. astaci* je potřebná přítomnost vápenatých iontů (Söderhäll a Cerenius, 1999). Např. při umělé iniciaci sporulace pomocí roztoku $CaCl_2$ se primární cysty normálně shlukly kolem otvoru ve sporangiu. Při použití destilované vody se však typické „spore balls“ nevytvořily a cysty se uvolnily do okolí,

protože jejich schopnost adheze na povrchy byla snížena. Přítomnost vápenatých iontů má vliv také na uvolňování zoospor z cyst.

Specifita *A. astaci*, vliv nákazy na různé druhy raků, příznaky račího moru

A. astaci je parazit s vysokou specifitou k rakům. Unestam (1972) prováděl experimenty, při kterých se pokoušel infikovat tímto patogenem různé druhy raků, několik druhů planktonních korýšů a jeden druh vidlonožce (Mysidacea). Infekce se však rozvinula a mohla způsobit úhyn jen u raků. Existují také nepublikované údaje o tom, že k onemocnění nejsou vnímaví a nepřenášejí jej běžní sladkovodní bentičtí korýši, např. blešivci nebo berušky (Söderhäll, os. sděl., 2005). Jediný případ infekce jiného korýše než raka zaznamenal Benisch (1940; citováno v Unestam, 1972), když se mu údajně podařilo infikovat kraba druhu *Eriocheir sinensis*, který na račí mor uhynul.

Severoamerické druhy raků jsou obecně velmi odolné k akutní fázi onemocnění. Souvisí to zřejmě s dlouhodobým vývojem vztahu hostitel – parazit, ve kterém se ustanovila rovnováha umožňující přežít oběma druhům (Alderman, 1996). Parazit je schopný žít v kutikule těchto raků, ale u jinak zdravých, neoslabených jedinců nezpůsobuje akutní onemocnění. Imunitní odpověď severoamerických raků je totiž mnohem silnější a účinnější než u raků nepocházejících ze Severní Ameriky. Hyfy většinou nemohou proniknout dovnitř do těla, ale zůstávají v kutikule, kde je jejich růst zastaven silnou melanizací.

Melanizace je obecně jednou z možných obranných reakcí bezobratlých a rostlin proti některým parazitům. Jde o produkci fenoloxidázy, což je enzym přeměňující fenoly na melanin a chinony. Inhibiční vliv těchto produktů na *A. astaci* byl prokázán in vitro. Melanin také může chránit hostitele před toxiny uvolňovanými parazitem. Fenoloxidáza je aktivována mimo jiné přítomností β -1,3-glukanů buněčných stěn oomycetů stejně jako jejich glykoproteiny (Söderhäll a Ajaxon, 1982; Cerenius a Söderhäll, 1984b). Fenoloxidáza je produkována buňkami hemolymfy a kutikulou. Váže se na povrch buněčné stěny patogenu, kde vytváří melanin (Unestam a Ajaxon, 1976).

Parazit je tak u severoamerických raků donucen setrvalvat v klidovém stavu, není však zahuben (Oidtmann a kol., 2004). V případě stresu (znečištění vody, nedostatek kyslíku, současné napadení jiným parazitem, atd.) nebo zranění se snižuje obranyschopnost raka a latentní infekce se může i u severoamerických druhů změnit v akutní onemocnění, při němž dojde k úhynu zvířete. Pokud je rak napaden extrémně vysokým množstvím zoospor (v laboratorních pokusech), může zřejmě na račí mor uhynout také (Diéguez-Uribeondo a Söderhäll, 1993). Hyfy v průběhu onemocnění a po uhynutí raka vyrůstají na povrch těla a do vody jsou produkovány zoospory (Cerenius a kol., 1988). Ty se uvolňují také při svlékání nakažených raků (Oidtmann a kol., 2002b) a zřejmě v menším množství i u neoslabených zvířat mimo období svlékání (Söderhäll a Cerenius, 1999; Kozubíková, nepublikovaná data).

Díky schopnosti nést latentní infekci jsou tedy severoamerické druhy raků hlavními přenašeči nemoci na citlivé druhy. Přítomnost latentní infekce byla prokázána u tří druhů, které mají potenciál se invazně šířit po Evropě, a to u raka pruhovaného, *Orconectes limosus* (Vey a kol., 1983), raka signálního, *Pacifastacus leniusculus* (Persson a Söderhäll, 1983; Alderman a kol., 1990) a raka červeného, *Procambarus clarkii* (Diéguez-Uribeondo a Söderhäll, 1993). Ne každý jedinec a zdá se, že ani ne každá populace těchto raků jsou však infikovány *A. astaci*, proto je pravděpodobnost přenosu nákazy na původní raky u různých populací různá. Procento infikovaných jedinců v populacích severoamerických raků může souviset s typem lokality, hustotou populace a historií osídlení lokality raky. Nezdá se ale, že by přítomnost infekce u severoamerických raků souvisela s pohlavím nebo velikostí těla u dospělců (Kozubíková a kol., 2009)

Výše zmiňovaná melanizace se projevuje jako hnědočervené, hnědé až černé skvrny na kutikule raků (od mikroskopické velikosti až do průměru několika mm). Nepřítomnost viditelných skvrn však neznamená, že raci nemohou být nosiči infekce (Cerenius a kol., 1988; Johnsen a kol., 2007; Kozubíková a kol., 2009) a naopak přítomnost melanizovaných skvrn jednoznačně nevypovídá o přítomnosti patogenu račího moru (Persson a Söderhäll, 1983; Kozubíková a kol., 2009). Některými autory jsou však tyto skvrny dávány do úzké souvislosti s nákazou *A. astaci*. Na sledování jejich přítomnosti jsou založeny dlouhodobé studie výskytu latentní nákazy tímto patogenem v populacích raků signálních ve finských jezerech (Nylund a Westman, 1983, 2000). Autoři provedli u některých jedinců mikroskopické vyšetření melanizovaných okrsků, ve kterých údajně našli vždy jen hyfy odpovídající morfologickým charakteristikám *A. astaci*. Skvrny podobné těm mikroskopovaným tedy dále považovali za projev nakažení tímto patogenem. Pomocí infekčních experimentů také ověřili schopnost raků s těmito skvrnami způsobit onemocnění se znaky račího moru u raků říčních.

Zajímavé je, že u jedné ze tří sledovaných finských populací raka signálního nebyly nikdy skvrny melaninu na racích nalezeny a raci signální zde dlouhodobě koexistovali s populací raků říčních, aniž by došlo k úhynu druhu citlivého na račí mor. Šlo tedy zřejmě opravdu o populaci patogenem neinfikovanou nebo nakaženou jen nepatrně.

Zmíněná populace raků signálních byla založena pouze juvenilními jedinci, kteří byli dříve pokládáni za nenakažené. Dnes je však díky velmi citlivým diagnostickým metodám jasné, že i juvenilové severoamerických raků mohou být nosiči infekce (Pursiainen a kol., 2008). Jsou však pravděpodobně infikováni méně než dospělci, což ukazuje uvedený příklad z finského jezera. To by mohlo být vysvětleno jednoduše tím, že juvenilové jsou vystaveni infekčnímu prostředí kratší dobu než dospělci a nakazit se mohou až později v průběhu života. Ráčata také mnohem častěji než dospělí raci svlékají kutikulu a efektivněji se tak zbavují parazitů, kteří na ní rostou (časté svlékání ale na druhou stranu může vést k častějšímu zvýšení množství zoospor v okolí raků, pokud jsou už infikováni, a tedy vyšší pravděpodobnosti zpětné nákazy ze svleček, ve kterých se parazit může rozrůstat a sporulovat). O přenosu infekce z matky na mláďata a míře nákazy u různých věkových kategorií severoamerických raků se zatím ví jen velmi málo.

Obecně se předpokládá, že vnímavost vůči onemocnění je společná všem druhům raků nepocházejícím ze Severní Ameriky. Vysoká citlivost k račímu moru byla prokázána u jedenácti druhů raků z čeledi Parastacidae z Austrálie a Nové Guiney, dále u jednoho japonského a většiny evropských druhů (Unestam, 1969c, 1975). Většina dalších výzkumů zabývajících se račím morem u citlivých druhů však byla prováděna na evropských racích.

Růst hyf *A. astaci* není u vnímavých druhů zastaven v kutikule (případně jen na nějakou dobu), ale hyfy prorůstají dovnitř těla a napadají nervový systém a svalstvo. V poslední fázi nemoci, kdy je zvíře už velmi slabé, napadá patogen ostatní orgány (Unestam 1973; Oidtmann a kol., 1999).

Zasažení raci jsou neklidní a vylézají i ve dne z úkrytů, což je netypické chování, protože evropské druhy raků vykazují za normálních okolností noční aktivitu. U raků se může objevit chůze na vysoko zvednutých nohách a křečovitě pohyby. Typická je ztráta koordinace a únikového reflexu (Alderman a kol., 1984). Později jsou raci neteční, zůstávají ležet na boku nebo na zádech a při vyzvednutí z vody jim volně visí končetiny. Běžné je upadávání nohou a klepet a v drtivé většině případů raci zhruba do týdne až dvou hynou (Krupauer, 1968; Alderman a kol., 1987; Oidtmann a kol., 1999; Oidtmann, 2000). Jednou z příčin smrti může být toxický efekt látek produkovaných patogenem (Unestam, 1973). Symptomy nemoci se mohou objevit za různou dobu po nakažení, od několika dnů do několika týdnů, Oidtmann (2000) uvádí až tři měsíce. Délka nemoci závisí na teplotě vody, při vyšší teplotě má onemocnění rychlejší průběh (Matthews a Reynolds, 1990), a na počtu

spor, kterým je zvíře infikováno (Alderman a kol., 1987; Oidtmann, 2000). Akutní fáze nemoci nezahrnuje vždy všechny popsané příznaky, průběh se může lišit právě v závislosti na rychlosti, s jakou nemoc probíhá. U nemoci trvající déle se vyvine více příznaků (včetně melanizace v kutikule) než u případů velmi rychlé nákazy (Alderman a kol., 1987).

Během více než století přítomnosti račího moru v Evropě, kdy byl na původní raky vyvíjen silný selekční tlak ve směru k odolnosti k *A. astaci*, nebyla publikována žádná zpráva o nalezení rezistentní populace evropských raků schopné dlouhodobě přežít v rovnováze s parazitem podobně jako severoameričtí raci. Podle osobního sdělení prof. Söderhälla (2005) však byli ve Švédsku nalezeni raci říční odolnější vůči infekci, šlo však o vzácné výjimky. Také raci říční z některých finských jezer přežívají v přítomnosti *A. astaci* ze skupiny (kmene) A (viz kap. Genetická variabilita *A. astaci*) déle, než při napadení *A. astaci* z jiných skupin (Viljamaa-Dirks, os. sděl., 2008). Může tedy jít o časem se zvyšující odolnost raků ke kmenu parazita, který se do Evropy dostal nejdříve a bylo tedy nejvíce času ke vzájemné adaptaci.

Zdá se však, že rak bahenní je o něco odolnější než jiné zkoumané druhy nepocházející ze Severní Ameriky. Při laboratorních pokusech, kdy byly do akvária přidány zoospory *A. astaci*, uhynuli jen tři jedinci z pěti testovaných při pokusu trvajícím 75 dnů (Unestam, 1969c). Z Turecka jsou také hlášeny případy, kdy jezerní populace tohoto druhu zdecimované morem nevyhynuly kompletně (Harlioğlu, 2008). Specifická je pak situace ve třech tureckých jezerech, kde údajně dochází k dlouhodobému přežívání raků bahenních, přestože je u nich patogen přítomen. Na těchto lokalitách je však atypický poměr hořečnatých a vápenatých iontů, je proto možné, že patogen není schopen se efektivně šířit pomocí zoospor a dynamika nákazy je extrémně zpomalena (Harlioğlu, 2008).

Kontakt mezi populacemi původních evropských a infikovaných severoamerických druhů raků končí ve většině případů nakažením původního druhu račím morem a následným vyhnutím celé populace. Dlouhodobá koexistence bez úhynu původních raků, pokud se vzácně vyskytne, většinou není způsobena rezistencí původního druhu k *A. astaci*, ale tím, že populace severoamerických raků na dané lokalitě není infikována, případně se zde *A. astaci* vyskytuje v nepatrné míře. Např. Nylund a Westman (2000) přes 30 let sledovali populaci raků signálních ve Finsku vyskytující se na jedné lokalitě společně s raky říčními. Rezistence raků říčních byla vyloučena pomocí infekčních experimentů, při kterých všichni nakažení jedinci uhynuli. Populace severoamerických raků přežívající dlouhodobě s původními evropskými raky byly nalezeny i v dalších zemích (Bubb a kol., 2005; Schulz a kol., 2006) a také u nás (Kozubíková a kol., 2009). Zatím však není jasné, zda podmínkou pro koexistenci musí být naprostá absence patogenu na lokalitě, nebo jestli původní raci mohou přežít v přítomnosti severoamerických raků s velmi nízkou mírou nákazy.

Evropské druhy raků však mohou nějakou dobu přežít i v přítomnosti více nakažených přenašečů *A. astaci*. Doba, než dojde k propuknutí hromadného hynutí vnímavých druhů, je různě dlouhá a závisí na hustotě populací raků. Počet zoospor v prostředí je zpočátku pravděpodobně nízký, protože se uvolňují v malém množství jen z přenašečů omezujících růst parazita svým imunitním systémem. Jakmile ale začnou hynout nakažení vnímaví raci, množství zoospor v prostředí se zvýší a nákaza se lavinovitě rozšíří, až dojde k vyhubení celé populace citlivého druhu (Oidtmann, 2000).

Přestože byly zaznamenány případy koexistence původních a severoamerických raků a *A. astaci* se na takových místech nevyskytuje (nebo jen v mizivých množstvích), američtí raci stále zůstávají substrátem pro patogen, který se teoreticky časem v populaci může objevit ve větší míře (např. po vysazení nebo imigraci infikovaných raků do stávající populace nebo při přenosu zoospor z jiných míst, např. při rybářských aktivitách).

Přenos patogenu

Přenos původce račího moru je vždy způsoben primárně lidskou činností a patogen se následně šíří samovolně v přírodě, a to vodou nebo migrací raků a dalších živočichů.

Na nové lokality se *A. astaci* může dostat především vysazením infikovaných raků, ať už jde o nakažené původní nebo o severoamerické druhy (Nylund a Westman, 1995). V řadě evropských států jsou raci vysazováni za účelem pozdějšího lovu. V našich podmínkách je častější nekontrolované vysazování severoamerických raků např. z estetických důvodů, na jejich šíření se někdy podílejí rybáři a potápěči, ať už vědomě či nevědomě. Nelze vyloučit i nebezpečí vypouštění raků z akvarijních chovů, tímto způsobem byly založeny evropské populace některých vzácnějších druhů rodu *Orconectes* (např. Ahern a kol., 2008). Raci mohou být také převáženi jako návnada nebo krmivo pro ryby (Oidtmann a kol., 2002b). V některých případech souvisí přenos nepůvodních raků na nové lokality s neinformovaností veřejnosti, kdy si lidé myslí, že pomáhají ohroženým druhům, a přitom je nerozeznají právě od druhů nepůvodních. Stejně tak není vyloučeno přemístění původních raků hynoucích na račí mor neinformovanými lidmi v domnění, že důvodem hynutí je např. znečištění vody.

Severoameričtí raci se z míst původního vysazení mohou dále šířit díky svým migračním schopnostem a vody jimi obsazené jsou pak kvůli latentní přítomnosti *A. astaci* neobyvatelné pro původní druhy. Vznikají tak trvalé rezervoáry nákazy.

Další prokázanou možností šíření patogenu lidskou činností je přenos živých zoospor při vysazování ryb. Alderman a kol. (1987) prováděli laboratorní pokusy se pstruhy simulující běžné zacházení s rybami (tedy aniž by ryby po odlovu přemístili několikrát do čisté vody). Tímto způsobem se infekce na raky přenesla. Stejně tak se může infekce šířit s rybami určenými jako návnada (Nylund a Westman, 1995). Mezi rybami mohou být někdy náhodně přeneseni i nakažení raci (Oidtmann a kol., 2002b). Infekce se šíří s vodou obsahující zoospory nebo na jakýchkoliv předmětech, které přišly s infikovanou vodou do styku a zůstaly mokré nebo alespoň vlhké. Může jít o mokré rybářské náčiní (sítě, vrše, atd.), pasti na odchyt raků, mokrou nebo zablácenou obuv, lodě, kola aut atd. (Alderman a kol., 1987; Reynolds, 1988; Taugbøl a kol., 1993; Oidtmann, 2000).

V případě úhynu raků na mor jsou další populace vnímavých druhů v tekoucích vodách ohroženy po proudu od zdroje infekce, kam jsou zoospory rychle přenášeny vodou. Přenos proti proudu je pomalejší, ale také velmi pravděpodobný, a to migrací infikovaných raků (Taugbøl a kol., 1993; Nylund a Westman, 1995) nebo ryb (Oidtmann, 2000). Rychlost tohoto pohybu závisí na hustotě populací, migrační aktivitě a případné přítomnosti překážek na vodním toku (hráze, jezy, vodopády), které zabraňují šíření těchto organismů (Nylund a Westman, 1995). Šíření infekce bylo ve dvou případech úhynů v ČR prokazatelně zastaveno pod hrází rybníka, nad níž již raci nebyli nemocí napadeni (Kozubíková a kol., 2008; Petrušek, nepublikovaná data).

Přenos nákazy pomocí ryb byl studován detailněji s cílem zjistit, jestli ryby fungují jako vektor patogenu v přírodních podmínkách. Bylo zjištěno, že *A. astaci* je *in vitro* schopen klíčit, vytvořit mycelium a produkovat zoospory na vyreparovaných žábrách lososa *Salmo salar* (Hall a Unestam, 1980). Výsledky naznačující, že by se obdobným způsobem mohla teoreticky šířit infekce i v přírodě, však zatím nebyly potvrzeny. Přenos infekce na povrchu těla ryb studovali Oidtmann a kol. (2002b) jak u zdravých, tak i u poraněných ryb (pstruh duhový). Při jednom pokusu byly ryby ponechány 24 h v kontaktu s nakaženými raky v poslední fázi nemoci a v druhém vystaveny stejnou dobu vodě s vysokou koncentrací zoospor. Pak byly třikrát přemístěny do čisté vody, aby se vyloučila možnost kontaminace vodou. Přenos na vnímavé raky nebyl zaznamenán ani po šesti měsících trvání pokusu. Stejnou prací byl však doložen přenos infekce po průchodu račí kutikuly obsahující hyfy *A. astaci* trávicím traktem ryby. Kutikula byla jen částečně natrávena, takže patogen mohl přežít, a po jednom až dvou měsících (záleželo na druhu ryby) byl zjištěn úhyn pokusných

raků. Dravé ryby, pro než jsou raci součástí potravy, tedy mohou v přírodě pravděpodobně napomáhat přenosu infekce. Ryby, kterým byla vpravena do žaludku suspenze zoospor nebo čisté myceliem, však infekční nebyly.

Také vodní ptáci a predátoři raků pravděpodobně mohou přispívat k šíření nákazy v přírodních podmínkách (Oidtmann, 2000). Změny v chování raků při akutní formě račího moru (denní aktivita, opouštění úkrytů, netečnost) způsobují, že se snadněji stávají potravou predátorů (např. vyder, norků, vodních ptáků). Ti pak mohou dále šířit nákazu (kontaktem, přenesením kořisti na jiné místo). Nepravděpodobné je však přežití zoospor po průchodu trávicím traktem savce nebo ptáka. Při laboratorních pokusech, kdy byli raci uhynulí na račí mor necháni 12 h ve 37 °C, nebyla nalezena žádná infekční stadia patogenu (kultivace i infekční pokusy byly negativní) (Oidtmann a kol., 2002b).

Metody detekce *A. astaci* a jejich vývoj

Kvůli závažnosti račího moru byly vyvíjeny snahy o co nejspolehlivější a nejrychlejší určení patogenu. Možné jsou následující způsoby:

1) Vizuální zhodnocení živých a uhynulých raků, sledování okolností úhynu

Pro masové úhyny citlivých druhů raků na račí mor je charakteristická velmi vysoká mortalita, typicky až 100 % populace (Oidtmann a kol., 1999). Ovlivněn však není jiný makrozoobentos (larvy hmyzu, blešivci apod.) ani ryby, protože patogen je specifický pouze pro raky. V tekoucích vodách se nákaza často šíří i proti proudu migrací infikovaných jedinců, čímž se račí mor odlišuje od úhynu způsobeného náhlým znečištěním vody. Pokud je epidemie zachycena v rozvinuté fázi, bývají raci nalézáni v různých stádiích onemocnění (jak zdánlivě zdraví, tak i umírající a mrtví), protože nákaza se mezi jedinci šíří postupně. Příznaky akutní fáze račího moru (viz výše), uváděné jako typické pro tuto nemoc, mohou být ale podobné i u jiných onemocnění (Edgerton a kol., 2004), takže samy o sobě nestačí ke správné diagnóze.

Hyfy parazita mohou být údajně viditelné pouhým okem, a to na kloubech končetin a na očních stopkách raka (Krupauer, 1968). Objevují se však až v poslední fázi nemoci nebo až po uhynutí raka, kdy patogen vyrůstá na povrch těla hostitele. *A. astaci* však nelze odlišit od jiných podobných oomycetů z řádu Saprolegniales, jejichž vegetativní mycelia jsou si morfologicky velmi podobná. Příbuzné saprofytické nebo fakultativně parazitické druhy jsou ve vodním prostředí běžné a často se nalézají i na povrchu těla raků, zvláště na uhynulých jedincích. Přítomnost porostu hyf na umírajících nebo čerstvě mrtvých racích nestačí jako důkaz, že zvířata uhynula na račí mor.

U raků (především severoamerických, ale někdy i u druhů citlivých k račímu moru) se mohou v souvislosti s nákazou *A. astaci* vytvořit pouhým okem viditelné depozice melaninu (viz výše). Tyto skvrny jsou však neodlišitelné od těch, které vznikly jako reakce na jiné parazity (Persson a Söderhäll, 1983). Melanizace je totiž obecnou součástí imunitní odpovědi raků na infekce různého původu, proto zjišťování přítomnosti *A. astaci* u raků podle výskytu skvrn melaninu není příliš spolehlivé (Kozubíková a kol., 2009).

2) Mikroskopické vyšetření vzorků kutikuly

Hyfy je často možné v kutikule napadeného raka mikroskopicky pozorovat (Obr. 2), a to i u odolných druhů a u jedinců bez vnějších známek onemocnění. Avšak ani v případě pozitivního nálezu nelze s jistotou tvrdit, že se jedná o *A. astaci* kvůli jeho podobnosti s jinými příbuznými druhy. Neexistují totiž žádné spolehlivé morfologické znaky na vegetativním myceliu, podle kterých by bylo možné odlišit *A. astaci* od jiných druhů rodu *Aphanomyces* (Royo a kol., 2004; Ballesteros a kol., 2006).

Obr. 2. Hyfy rostoucí v kutikule raka říčního infikovaného račím morem, lokalita Bojovský potok, 2005. Hyfy odpovídají charakteristice *A. astaci*. (Foto Eva Kozubíková).

Fig. 2. Hyphae growing in the cuticle of *Astacus astacus* infected by crayfish plague, locality Bojovský brook, 2005. Hyphae correspond to *A. astaci* characteristics. (Photo by Eva Kozubíková).



Rozlišování jednotlivých druhů v rámci čeledi Saprolegniaceae je většinou založeno na morfologii sexuálních stadií, nestačí tedy pozorovat pouze vegetativní mycelium, případně sporangia. Vzhledem k tomu, že pohlavní fáze nebyla u *A. astaci* potvrzena a pravděpodobně se u tohoto druhu ani nevyskytuje, zůstává jeho spolehlivá identifikace pomocí morfologických znaků téměř nemožná (Cerenius a kol., 1988). Je také vysoká pravděpodobnost, že při mikroskopickém vyšetření bude zkoumán vzorek kutikuly bez hyf, přestože je jedinec infikován na jiném místě těla. Mikroskopické vyšetření části kutikuly může být použito před kultivací patogenu, aby bylo zajištěno, že ve vzorku je přítomno inokulum pro kultivaci (Cerenius a kol., 1988). Přitom musí být pozorovány tyto znaky: vegetativní mycelium musí být nepřehrádkované (přehrádkou jsou oddělena jen sporangia), bývá větvené, hyfy mají 7–10 μm v průměru, konce hyf jsou zakulacené. Mycelium také musí růst uvnitř kutikuly, nejen na jejím povrchu (Cerenius a kol., 1988).

U severoamerických raků, přenašečů choroby, je někdy možné mikroskopické pozorování melanizovaných hyf nebo skvrn, což je přesnější než pozorování pouhým okem (zachytí se i menší depozice melaninu a lépe se rozliší např. od drobných poranění), avšak existuje zde stejné omezení (melanizace nemusí nutně znamenat přítomnost *A. astaci*). Jak už bylo zmíněno, není také možné mikroskopicky vyšetřit veškerou kutikulu raka (i kdyby se pozorovatel zaměřil jen na měkkou kutikulu, která bývá patogenem mnohem častěji napadena).

3) Kultivace patogenu a zpětné nakažení pokusných zvířat

Kultivace je v této práci uvedena mezi metodami detekce *A. astaci*, což byl dříve také její hlavní význam, je však třeba si uvědomit, že získat čistou kulturu mikroskopického patogenu je základní krok umožňující také jakýkoli jeho další výzkum (např. studie patogenity, morfologie, fyziologie, životního cyklu, atd.).

Kultivace *A. astaci* skrývá řadu potíží. Detekce patogenu tímto způsobem je časově náročná (test trvá minimálně tři týdny, Oidtmann a kol., 2004), vyžaduje kulturu citlivého druhu raků pro infekční pokusy (většinou ohrožených druhů), a zdaleka ne u každého případu

nákazy se podaří patogen kultivovat. Velkým problémem je kontaminace kultur bakteriemi a jinými druhy oomycetů běžnými ve vodním prostředí. Ty jsou většinou přítomny na tkáních raka použitých pro inokulaci a rostou rychleji než *A. astaci* (Oidtmann a kol., 1999; Kozubíková, vlastní pozorování). Kultivace je většinou úspěšná jen z umírajících nebo čerstvě mrtvých raků. V prvních fázích onemocnění je mycelium *A. astaci* ještě málo rozvinuté a naopak na tělech jedinců uhynulých před delší dobou se už vyskytuje příliš mnoho dalších organismů způsobujících kontaminaci kultury. Často není možné vhodný materiál pro kultivaci zajistit, např. kvůli pozdnímu zachycení úhynu, kdy jsou na lokalitě už jenom delší dobu uhynulí raci. Jindy není dostupná patřičně vybavená laboratoř, kde se kultivace dá provést. Oidtmann a kol. (1999) uvádí, že i při optimálních podmínkách je pravděpodobnost záchytu pomocí kultivace nanejvýš 70 %. *A. astaci* lze izolovat i z melanizovaných okrsků na kutikule infikovaných severoamerických raků, ale s ještě mnohem menší pravděpodobností. Např. Diéguez-Uribeondo a kol. (1995) úspěšně kultivovali patogen z raka červeného, *Procambarus clarkii*.

Ke kultivaci se používá speciálního živného média a postupu, který byl zdokonalován od 30. let 20. století. První úspěšnou kultivaci *A. astaci* provedl Nybelin (1934) za použití média složeného z agaru a račí hemolymfy. Inokulační tkání byla část nervu ze zadečku infikovaného raka a aby se zabránilo kontaminaci bakteriemi, byla kultura následně přeočkována na nové sterilní médium (citováno v Oidtmann, 1999).

Kultivací se dále zabýval Rennerfelt (1936; citováno Unestamem, 1965), který zkoušel *A. astaci* pěstovat na různých substrátech. Zaznamenal dobrý růst na mediu s přidáním hemolymfy raků rodu *Astacus* a *Orconectes* a na mediu s krví různých obratlovců. Oomycet však nerostl na sladu a ovoci, což naznačuje, že *A. astaci* s největší pravděpodobností není schopen žít jako saprofyt volně v prostředí.

V 60. letech pokračoval ve vylepšování kultivačního postupu Unestam (1965). K inokulaci s úspěchem použil kromě nervu (podle Nybelina) i kousky infikované račí kutikuly. Testoval také různá další média. Podařilo se mu na rozdíl od Rennerfelta kultivovat *A. astaci* na pepton-glukózovém mediu a dále také na jednoduchém minerálním mediu, což postup kultivace zjednodušilo.

Alderman a Polglase (1986) zkoušeli kultivaci *A. astaci* na mediu RGY (river-glucose-yeast) obsahujícím říční vodu, glukózu a výtažek z kvasnic, na kterém rostl dobře příbuzný parazitický druh *Saprolegnia parasitica*. Do RGY agaru přidali antibiotika, která neovlivňují růst *A. astaci*, a to penicilin G (zabraňuje růstu grampozitivních bakterií) a oxolinovou kyselinu (je účinná proti gramnegativním bakteriím), čímž vzniklo dostatečně selektivní médium poskytující dobré výsledky při pěstování *A. astaci*.

Cerenius a kol. (1988) přinesli další novinky ke kultivaci patogenu. K inokulaci používali přednostně měkkou kutikulu ze spodní strany zadečku raka a kontrolovali mikroskopicky, zda v ní rostou hyfy o morfologických charakteristikách odpovídajících *A. astaci*. Inokulum vkládali do skleněného kroužku předem zataveného do pepton-glukózového agaru. Hyfy mohly lehce prorůst do média pod kroužkem a rozrůstat se vně ohraničené oblasti, avšak pro bakterie rostoucí jen na povrchu média to byla účinná překážka. Cerenius a kol. (1988) také popsali kultivaci *A. astaci* z infikovaných severoamerických raků. Patogen lze kultivovat z kutikuly obsahující melanizované hyfy, ale je zde velké riziko kontaminace jinými oomycety, které také vyvolávají melanizaci. Proto je výhodnější postup založený na indukci akutního onemocnění, a to injekcí Zymosanu (bakteriálních buněčných stěn) do těla raka. To oslabí jeho imunitu a podlehne infekci, kterou přenáší. Další postup je stejný jako u citlivých vnímavých druhů uhynulých po setkání s patogenem.

Oidtmann a kol. (1999) zkombinovali předchozí metody a zvýšili tak účinnost kultivačního postupu. Měkká kutikula ze spodní strany zadečku raka byla před kultivací umístěna do sterilní vody, aby nevysychala. *A. astaci* je totiž k vyschnutí extrémě citlivý

(Alderman a Polglase, 1986). Před inokulací byla část vzorku mikroskopicky vyšetřena na přítomnost hyf. Pokud je obsahovala, použila se zbylá část k naočkování na RGY agar s antibiotiky (podle Aldermana). Mycelium vyrostlé vně skleněného kroužku se pak přeočkovalo na pepton-glukózový agar.

Nejnověji publikovaným postupem kultivace je metoda podle Viljamaa-Dirks a Heinikainen (2006). Autoři používají nově jako inokulum celou končetinu raka nebo celou kutikulu ze spodní strany zadečku bez předchozího mikroskopického vyšetření vzorku. Kontaminaci jinými organismy omezuje krátké umístění vzorku do 70% etanolu s následným omytím sterilní vodou. Vyrůstající hyfy jsou sledovány pod mikroskopem a přeočkována je jen ta část, kde se nevyskytují jiná vlákna oomycetů než ta, která odpovídají charakteristice *A. astaci*.

Ani u získané čisté kultury nelze *A. astaci* mikroskopicky s jistotou určit (Oidtmann a kol., 1999), proto bylo před vyvinutím molekulárních testů vždy potřeba ověřit, zda jsou zoospory vypěstovaných oomycetů infekční pro citlivé druhy raků a tedy jestli vyvolávají onemocnění s příznaky račího moru. V laboratorních podmínkách je typická 100% úmrtnost těchto raků. K infekčním pokusům je třeba získat zoospory vypěstované z kultury. *In vitro* se sporulace indukuje přemístěním mycelia do média s CaCl_2 nebo přidáním sterilní říční vody (Unestam, 1969b; Alderman a kol., 1984; Cerenius a Söderhäll, 1984c). Lze použít také destilovanou vodu (pro přesný postup indukce sporulace viz např. Cerenius a kol., 1988). Zoospory se pak přidávají do akvária s raky některého z vnímavých druhů. Po jejich úhynu by mělo být možné opět patogen z raků izolovat.

Kultivace s následnými infekčními pokusy byla před vyvinutím molekulárních detekčních metod jediným způsobem, jak potvrdit správnou diagnózu *A. astaci*.

4) Molekulární metody detekce pomocí analýzy DNA

Tento způsob detekce není na rozdíl od předchozích založen na pozorování a určování patogenu podle morfologických, fyziologických nebo infekčních charakteristik, ale jen na zjištění přítomnosti části jeho genomu ve vzorku. To umožňuje jednoduše odlišit *A. astaci* od jiných oomycetů vyskytujících se např. jako komenzálové na kutikule raků, což je u ostatních metod velmi obtížné. Molekulární metody podstatně zkracují dobu potřebnou k diagnóze nemoci (test trvá od získání biologického materiálu po výsledek 2–3 dny), jsou výrazně spolehlivější i citlivější než předchozí postupy. Využitelné jsou samozřejmě i pro určování neznámých vzorků v kulturách.

První metoda založená na analýze DNA se dala použít pouze k detekci *A. astaci* z čisté kultury (Oidtmann a kol., 2002a). Už to však bylo velmi významné, protože k diagnostikování moru nebylo třeba následně po kultivaci provádět infekční experimenty na ohrožených evropských druzích raků. Tato metoda využívala analýzu polymorfismu délky restričních fragmentů (RFLP). Prvním krokem byla amplifikace relativně konzervativní části genomu pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Konkrétně šlo o úsek 28S rDNA (jaderný gen kódující rRNA větší podjednotky ribozómu) o délce 1050 bp. Na namnoženou DNA byly aplikovány tři restriční enzymy (Alu I, Hind III a Ava I), které rozstříhaly úsek na kratší fragmenty. Počet a délka fragmentů (tzv. restriční vzor) je pro jednotlivé taxony specifický, takže bylo možné následnou elektroforézou odlišit *A. astaci* od jiných oomycetů.

V současné době už není pro účely detekce nutné patogen kultivovat, jelikož byly vyvinuty a dále vylepšovány PCR metody pro analýzu izolátů DNA získaných přímo z kutikuly jak hynoucích citlivých raků, tak severoamerických přenašečů (Oidtmann a kol., 2004, 2006). Nepoužívají se restriční enzymy, ale metody spočívají v amplifikaci (namnožení) druhově specifického fragmentu nekódující oblasti ITS (*internal transcribed spacer*) v části jaderného genomu obsahující geny pro stavbu ribozómů. Tato oblast se v každé buňce nachází v mnoha kopiích, a proto jsou metody využívající tuto část genomu

potenciálně vysoce citlivé. Byly navrženy specifické primery ohraničující úsek DNA, jenž by se měl vyskytovat výhradně u *A. astaci*. Přítomnost amplifikovaného fragmentu určité délky znamená, že ve směsi různých DNA získané ze vzorku račí kutikuly byla obsažena i DNA tohoto patogenu. Případné amplifikované úseky DNA jiných běžných druhů oomycetů jsou při stejném postupu (použití stejných primerů) jinak dlouhé. Naše výsledky prokázaly, že i tato molekulární metoda vzácně detekuje zřejmě zatím nepopsaný druh rodu *Aphanomyces* blízce příbuzný *A. astaci*, patogen račího moru lze nicméně jednoznačně potvrdit následnou sekvenací amplifikovaného fragmentu a srovnáním s referenčními sekvencemi *A. astaci* a příbuzných druhů (Kozubíková a kol., 2008, 2009).

Oidtmann a kol. (2006) vyvinuli metodu dále zvyšující citlivost detekce (tzv. *seminested-PCR*, při níž se používají dvě amplifikace, druhá reakce namnoží kratší úsek zevnitř delšího fragmentu získaného z první PCR). Touto metodou je teoreticky možné detekovat i jedinou zoosporu ve vzorku. Tuto metodiku (spolu s potvrzením určení *A. astaci* pomocí sekvenace) jsme využívali při detekci patogenu ve vzorcích z masových úhynů raků z území ČR (Kozubíková a kol., 2008) i pro sledování výskytu *A. astaci* v populacích severoamerických raků u nás (Kozubíková a kol., 2009).

Nejnovější publikovaný postup pro molekulární detekci račího moru je založen na kvantitativní polymerázové řetězové reakci, tzv. *real-time PCR* (Vrálstad a kol., 2009). Tato metoda umožňuje navíc kvantifikovat počáteční množství DNA patogenu ve vzorku a tím zjistit míru nákazy v jednotlivých racích. Cílovou částí genomu je podobně jako v případě výše zmiňovaných metod oblast ITS. Postup je ještě citlivější než předchozí metody a je také méně ohrožen potenciální laboratorní kontaminací.

Předpokladem pro úspěšnou diagnostiku *A. astaci* pomocí molekulárních metod je správný odběr a uchování vzorků raků. Pokud dojde k úhynu raků, je třeba sbírat jedince těsně před uhynutím nebo velmi brzy po něm, než se tělo raka začne rozkládat. Vzorky je třeba uchovat v chladu a velmi rychle dopravit do laboratoře ke zpracování nebo zamrazit v nízkoteplotním mrazicím boxu (ideálně $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, pro kratší dobu lze využít i teploty vyšší). Vhodná je také konzervace vzorků v 96% čistém etanolu.

Původ a rozšíření račího moru v Evropě

Patogen způsobující račí mor pochází ze Severní Ameriky. Svědčí o tom fakt, že pouze severoamerické druhy raků jsou schopné tomuto onemocnění odolávat, narozdíl od raků z ostatních částí světa, u nichž vyvolává ve většině případů 100% mortalitu (Unestam, 1969c, 1972). Parazit, který zcela ničí populace svého hostitele, by nemohl dlouhodobě přežít, proto je zřejmé, že jedinou oblastí, kde mohl být původní, je právě Severní Amerika. Nasvědčuje tomu i vysoká genetická podobnost některých izolátů patogenu z Evropy s izolátem ze Severní Ameriky (viz níže).

Do Evropy se patogen poprvé dostal ve druhé polovině 19. století, není však známo jakou cestou. Za nejpravděpodobnější způsob zavlečení *A. astaci* do Evropy je považován přenos s nakaženými severoamerickými raky (Alderman, 1996), avšak první záznam o záměrné introdukci těchto raků (jednalo se o raky pruhované) je až z roku 1890, tedy více než třicet let po prvním výskytu račího moru v Evropě. Existuje teorie, že infikovaní raci nebyli přivezeni záměrně, ale dostali se do Evropy ve sladkou vodou zaplavených prostorech zámořských lodí (Gherardi a kol., 1999).

Nezávislých invazí *A. astaci* ze Severní Ameriky do Evropy bylo pak během 20. století ještě několik (minimálně další tři) a tyto jasně souvisely s introdukcí severoamerických druhů raků, jak dokládá výzkum genetické variability kmenů parazita.

Detailní popis šíření nemoci Evropou podává Alderman (1996): První masové úhyny raků na evropském kontinentu byly zaznamenány v severní Itálii v údolí řeky Pádu v roce 1859. Zde mor řádil asi do roku 1865. Pak se objevil v letech 1874–5 v severovýchodní

Francii, odkud se snadno dostal do přilehlé části Německa. V roce 1877 se další ohnisko nákazy objevilo v jihovýchodním Německu. Z těchto dvou oblastí se pak račí mor během konce 19. a začátku 20. století souvisle šířil po celé Evropě a zdecimoval většinu populací původních evropských druhů raků. Z jižního Německa postupovala nákaza po Dunaji a dostávala se do jeho přítoků, čímž se stále zvětšovala zasažená plocha. Vznikla tak vlna šířící se jihovýchodním směrem přes Rakousko (1879) a Maďarsko až na Balkán. V roce 1885 dosáhla Černého moře. Mezitím se obě původní ohniska propojila a epidemie postupně zasáhla celé Německo. Na západě Evropy mor postupoval do dalších částí Francie a zemí Beneluxu (1880). Šíření severovýchodním směrem postupovalo přes dnešní Polsko (1880) do Ruska, kde byly pozorovány velké úhyny raků mezi lety 1890 a 1892 (např. na Volze nebo v Oněžském jezeře). V roce 1892 nákaza dosáhla Kaspického moře. Postup moru pokračoval a do konce 19. století zasáhl skoro celou evropskou část Ruska, Pobaltí a Finsko. Odtud se v roce 1907 dostal do Švédska, kde způsobil zhroucení obchodu s raky. Patogen se v rozlehlých skandinávských jezerech po desetiletí udržoval ve zbytkových populacích raků, způsobil stále se opakující úhyny a tím znemožnil reintrodukcii raků (viz poslední kapitola). Proto bylo koncem 60. let 20. století přikročeno k masovému vysazování nepůvodního raka signálního, který je proti moru odolný (Fürst, 1995). Lov a konzumace raků mají totiž ve Skandinávii (hlavně ve Švédsku a Finsku) dlouhou tradici a nedostatek raků musel být pod tlakem veřejnosti nějakým způsobem vyřešen.

Rozšiřování nákazy po Evropě napomáhal velmi čilý obchod s raky (především s raky říčními) ve druhé polovině 19. století, jehož objem si dnes už nedokážeme představit. Např. ve Francii, která byla hlavním cílem exportu raků ze zemí střední Evropy (Německo, české země, Rakousko, Polsko, atd.), se ročně konzumovaly miliony kusů. Později, po propuknutí račího moru v těchto zemích, se raci začali dovážet z Ruska (Krupauer, 1968). Zvýšený lov (a s ním spojená častější manipulace s raky a vybavením na jejich odlov v kombinaci s nedostatečnými karanténními opatřeními) pravděpodobně pomohl urychlit postup nemoci na východ. populace původních raků byly v Evropě v 19. století také mnohem početnější a souvislejší než v současnosti, což také výrazně přispívalo ke snadnějšímu šíření moru (Volf, 1926).

Izolované úhyny raků na mor se občas vyskytovaly během první poloviny 20. století např. v Německu, Pobaltí či již zmíněné Skandinávii. Ve druhé polovině 20. století se ale patogen začal opět rozšiřovat na dosud nezasazená území, a to v souvislosti s introdukcí severoamerických druhů raků. Dostal se i mimo kontinentální Evropu a do jejích odlehlejších částí. V roce 1958 byl poprvé zaznamenán ve Španělsku (Cuéllar a Coll, 1983) a v roce 1971 se dostal do Norska (Taugbøl a kol., 1993), v roce 1981 pak do Velké Británie (Alderman a kol., 1984), o rok později do Řecka (Alderman, 1996), v roce 1985 do Turecka (Rahe a Soyulu, 1989) a roku 1987 do Irska (Reynolds, 1988). V Turecku se úhyny týkaly raka bahenního a na Britských ostrovech a ve Španělsku byl zasažen druh *Austropotamobius pallipes* (jediný tamější původní druh). Dosud nebyl račí mor zaznamenán v jiných oblastech světa, kde také žijí vnímavé druhy raků (Evans a Edgerton, 2002) – na dálném Východě, v Japonsku, Austrálii, na Madagaskaru apod.

I v současnosti jsou úhyny raků na račí mor pozorovány v mnoha zemích Evropy a patogen se stále udržuje ve slabých populacích raků v mnoha skandinávských jezerech (Nylund a Westman, 1995; viz poslední kapitola). Další epidemie takového rozsahu jako v 19. století je dnes ale velmi nepravděpodobná, a to díky slabším a nesouvislým populacím původních raků. Dnešní úhyny tedy zůstávají většinou izolované na menším území.

Historie šíření račího moru a současný stav na území České republiky

Stejně jako většina evropských států, i české země byly zasaženy epidemií račího moru, která proběhla Evropou ve druhé polovině 19. století. Podle Krupauera (1968) se k nám tehdy

mor rozšířil pravděpodobně ze dvou směrů. Do Čech se dostal z jihozápadu (z Německa) a na Moravu ze severu (Polsko). V roce 1883 bylo zaznamenáno hynutí raků ve Slezsku, dále se Krupauer zmiňuje o úhynech v řekách Dyji, Svratce a Svitavě. Epidemie moru u nás byla nejsilnější v letech 1893–1904 (Lohniský, 1983), na Moravě trvala o něco déle, do roku 1906 (Krupauer, 1968). Populace raků byly z velké části zdecimovány, avšak konkrétních záznamů o úhynech raků na našem území je málo. Chybí také podrobnější zprávy o průběhu a okolnostech hynutí.

Během 20. století bylo zaznamenáno ještě několik izolovaných úhynů raků (Volf, 1926). Je však pravděpodobné, že řada dalších lokálních úhynů způsobených račím morem nebyla vůbec zachycena. Volf (1926) uvádí v Rybářském věstníku dva případy masového úhynu raků zaznamenané v roce 1924. Jeden v Jemčině u Jindřichova Hradce a druhý na řece Volyňce. Příklad z Volyňky je blíže popsán a z jeho okolností se dá usuzovat, že byl způsoben račím morem. Nákaza se totiž šířila proti proudu (u otravy by tomu bylo naopak) a zasáhla jen raky.

Další záznamy o hynutí raků, které bylo s největší pravděpodobností způsobeno *A. astaci*, jsou až z konce 90. let 20. století. V letech 1998 a 1999 bylo zjištěno hromadné hynutí raků říčních a bahenních v potoce Pšovka v CHKO Kokořínsko. Podle Kozáka a kol. (2000a) byly nalézány tisíce mrtvých raků. Výsledky rozboru vody odebrané na lokalitě byly v normě a úhyn nezasáhl žádné jiné živočichy kromě raků, což vyvrátilo podezření na otravu nárazovým znečištěním vody. V roce 1999 úhyn postoupil ještě výš proti proudu. Jediná menší populace raka říčního zůstala na horním toku Pšovky díky její izolaci asi dvoukilometrovým úsekem bez raků (Beran, 1999). V Pšovce se už v roce 1995 vyskytoval rak pruhovaný (Beran, 1995) a později bylo zjištěno, že jeho populace je silně infikována *A. astaci* (Kozubíková a kol., 2006). Jelikož tohoto druhu se úhyn nedotkl, je víc než pravděpodobné, že příčinou vyhynutí skoro celé populace raka říčního a bahenního v Pšovce byl račí mor. Původce nemoci nemohl být s jistotou určen kvůli tehdejší nedostupnosti vhodné diagnostické metody.

Začátkem srpna 1999 bylo pozorováno hynutí raků také v potoce Loděnice na Kladensku (Kozák a kol., 2000b). Úhyn se týkal jen raků říčních a rozbor vody neukázal přítomnost toxických látek. Navíc se hynutí rozšířilo i proti proudu. Přítomnost jiných druhů raků na této lokalitě nebyla zjištěna. Při vyšetření uhynulých raků se podařilo izolovat vláknitý organismus podobný *A. astaci*, avšak podle odborníků z Univerzity v Uppsale, kam byly vzorky zaslány k ověření identifikace, se o kulturu tohoto patogenu nejednalo (Kozák, os. sděl., 2005). Přesto je podle okolností úhynu velmi pravděpodobné, že byl způsoben račím morem.

Výzkumem račího moru se u nás ve 20. století nikdo soustavně nezabýval, byly pouze učiněny ojedinělé pokusy o diagnostiku onemocnění. Teprve od roku 2004 je u nás možné onemocnění rychle a spolehlivě určit pomocí molekulárních metod (analýzy přítomnosti DNA patogenu v hynoucích racích). Výzkum v posledních letech ukazuje, že problém račího moru je na našem území pravděpodobně značně podceňovaný. V letech 2004–2009 bylo totiž zaznamenáno a molekulární detekcí potvrzeno osm případů úhynu původních raků způsobených račím morem. V jednom z těchto případů byla zdecimována dříve silná populace raka kamenáče (Úpořský potok v CHKO Krivoklátsko, 2005), v ostatních byl postiženým druhem rak říční. Šlo o lokality Křivecký potok v Trinci ve Slezsku (2004), Bojovský potok pod obcí Bojov ve středních Čechách (2005), řeka Olše ve Slezsku a některé její přítoky (2006), přítok Pěnského rybníka u obce Horní Pěna na Jindřichohradecku (2007), Žebrákovský potok u Světlé nad Sázavou (2008), řeka Senice u obce Lidečko v CHKO Beskydy (2008) a potok Besének na Tišnovsku (2009).

Raci v posledních letech vymizeli také z dalších vodních toků, kde lze podle okolností případů usuzovat, že příčinou byl račí mor, ale jelikož nebyly z těchto míst dostupné vzorky

hynoucích raků k analýze přítomnosti patogenu, nebylo možné onemocnění přímo prokázat. Šlo např. o potok Klíčava ve středních Čechách (2005, rak říční), Koštěnický potok na Jindřichohradecku (2006, rak říční), Hýskovský potok (2006, rak kamenáč) a řeku Osoblahu ve Slezsku (2006, rak říční). Podrobnosti o uvedených případech úhynů raků (do roku 2007) jsou shrnuty v publikacích Kozubíková a kol. (2006, 2007 a 2008).

Výše zmíněné úhyny raků byly často nalezeny náhodně, nebyl prováděn žádný systematický průzkum populací původních raků, který by měl takové případy odhalovat. Z toho vyplývá, že další vymizení celých populací raků způsobené račím morem mohla zůstat bez povšimnutí. Zdá se tedy, že případů výskytu račího moru v poslední době přibývá, což může být způsobeno výrazným rozšířením přenašečů choroby u nás v posledních desetiletích, především raků pruhovaných. Svůj podíl na zvýšení zachytu úhynů má jistě také to, že je račímu moru věnována v současnosti větší pozornost než dříve.

Ve většině zmíněných případů hynutí raků na račí mor je nejasný zdroj nákazy, protože v blízkosti míst úhynů (ve stejném toku) nebyli nalezeni američtí raci a pravděpodobně tedy nedošlo k přímému přenosu nákazy (Kozubíková a kol., 2008). Výjimkou by mohlo být vymizení raka říčního z Osoblahy, neboť v jejím přítoku Prudník, který přitéká ze Slezska, byla objevena populace raků pruhovaných silně infikovaná *A. astaci* (Duriš a Horká, 2007; Kozubíková a kol., 2008).

Na území České republiky byla provedena také rozsáhlá studie promořenosti populací severoamerických raků patogenem račího moru (Kozubíková a kol., 2009). Byla použita molekulární detekce *A. astaci* (Oidtmann a kol., 2006) v racích pruhovaných z 22 populací a racích signálních ze šesti populací. Celkem byl patogen zachycen v 17 populacích těchto druhů. Rak signální byl výrazně méně infikován, latentní nákaza *A. astaci* byla potvrzena pouze u jednoho jedince ze 124 celkem testovaných. Naopak populace raka pruhovaného se velmi různily v míře nákazy, u populací z tekoucích vod bylo infikovaných obvykle 50–100 % zkoumaných jedinců, ve stojatých vodách (např. zatopené lomy a pískovny) bylo nalezeno velmi málo nakažených raků (do 10 %). Populace raků pruhovaných v tekoucích vodách jsou tedy nejrizikovějšími rezervoáry nákazy u nás. Vysvětlení může souviset s historií introdukce a populační dynamikou přenašečů nákazy i s rozdíly mezi jednotlivými habitaty. V tekoucích vodách se raci většinou šíří přirozenou migrací, ke které dochází spíše při vyšších populačních hustotách, které zároveň přispívají ke snadnějšímu přenosu parazitů. Díky proudu se pravděpodobně také lépe rozptylují ve vodním prostředí zoospory a mohou zasáhnout vyšší počet nových hostitelů. Do stojatých izolovaných vod se naopak raci dostávají nejčastěji vysazením omezeného počtu jedinců (kteří mohou být už při introdukci méně infikovaní) a v prostředí bez výrazných vodních proudů a při počátečních nízkých populačních hustotách raků se zoospory pravděpodobně dostávají k novým hostitelům v omezené míře. Více informací o tomto výzkumu je k nalezení v práci Kozubíková a kol. (2009). Přestože raci signální a některé populace raka pruhovaného u nás se zdají být málo nakaženy původcem račího moru, nikdy není možné s jistotou tvrdit, že populace severoamerických raků je úplně prostá patogenu. Proto není v žádném případě vhodné tyto raky rozšiřovat na nové lokality.

Genetická variabilita *A. astaci*

Výzkum genetické variability jednotlivých izolátů *A. astaci* je užitečný zejména ke zjištění původu patogenu na konkrétní lokalitě, přinesl však i řadu dalších zajímavých výsledků. K tomuto účelu je možné použít metodu náhodné amplifikace polymorfni DNA (RAPD, random amplification of polymorphic DNA), která spočívá v amplifikaci části DNA patogenu pomocí PCR za použití sady náhodně vybraných primerů (není tedy nutné předem znát jejich sekvence jako u jiných PCR metod). Tento postup vyžaduje získání čisté kultury patogenu a ověření jeho správné identifikace jako *A. astaci* jiným způsobem. RAPD není

příliš přesná metoda, slouží spíše k hrubému zjištění podobnosti DNA jednotlivých izolátů, ze kterého se dá usuzovat na možné příbuzenské vztahy.

Metodu RAPD-PCR poprvé aplikovali na *A. astaci* Huang a kol. (1994). Testovali podobnost mezi patnácti různými izoláty patogenu. Jejich kultury byly získány z raků (tři druhů) nakažených *A. astaci* v přirozených podmínkách na různých lokalitách v letech 1962 až 1988. Většina vzorků byla izolována z nakažených raků říčních a raků signálních ze švédských jezer. Dále byl testován izolát z raka signálního z jezera Tahoe v USA, odkud byl tento druh dovezen do Švédska a od roku 1969 ve velkém vysazován do tavných jezer. Další vzorek patogenu z raka signálního byl také ze švédského jezera, raci sem však byli prokazatelně přivezeni z jezera Pitt v Kanadě. Jeden izolát pocházel z raka bahenního z Turecka.

Testované kmeny bylo možné podle výsledků analýzy jednoduše rozdělit do tří skupin, jejichž variabilita byla tak nízká, že je pravděpodobné, že se jedná o geneticky identické klony. To by odpovídalo skutečnosti, že se doposud nepodařilo spolehlivě prokázat existenci sexuálních stadií *A. astaci* a že šíření nemoci mezi lokalitami je tedy výhradně v důsledku nepohlavního rozmnožování. Skupina (kmen) A obsahovala izoláty z raka říčního z doby před introdukcí raka signálního do Švédska i po ní a z raka bahenního. Pravděpodobně se jednalo o kmen, který způsobil epidemii moru na konci 19. století a ve švédských jezerech se udržel jako chronická podoba onemocnění mezi slabými populacemi raka říčního. K této skupině patřil i izolát z Turecka, což naznačuje, že mor nebyl do této země zavlečen z později introdukovaných nepůvodních druhů, ale jeho výskyt zřejmě patří k první vlně račího moru v Evropě. Tomu odpovídá i to, že z Turecka nikdy nebyl výskyt severoamerických druhů raků hlášen (Harlioğlu, 2008). Skupina B zahrnuje tři izoláty z raka říčního ze Švédska z let 1970 a 1973 a izoláty z raků signálních z jezera Tahoe (USA) a z lokality ve Švédsku, kam byli raci z Tahoe vysazeni. Izolace kmene *A. astaci* z uhynulých raků říčních, který je identický s kmenem z raka signálního svědčí o tom, že raci signální jsou vektory patogenu a přímo ohrožují původní evropské druhy. Masová introdukce raka signálního do Evropy tedy pravděpodobně způsobila druhou (mírnější) vlnu moru (Tab. 1). Tímto byl také podán důkaz o severoamerickém původu *A. astaci*. Izolát patogenu z raka signálního pocházejícího z Kanady se natolik odlišoval od ostatních, že byl zařazen do samostatné skupiny C.

Diéguez-Urbeondo a kol. (1995) dále pomocí stejné metody (RAPD-PCR) zjistili, že kultura *A. astaci* izolovaná z raka červeného (*Procambarus clarkii*) ve Španělsku není podobná žádné ze tří výše uvedených skupin, proto byla vytvořena nová skupina D, kam byl zařazen pouze tento izolát. Genetická podobnost tohoto kmene s izoláty jiných skupin je poměrně nízká. Kmen skupiny D se navíc liší i některými fyziologickými vlastnostmi. Nejvýznamnější je to, že snáší vyšší teploty pro růst, sporulaci i pohyb zoospor. Je to zřejmě přizpůsobení svému hostiteli *P. clarkii*, který je teplomilnější než jiné zde uváděné druhy raků a pochází ze subtropického jihovýchodu USA.

Další studie testující izoláty z různých evropských zemí již dále počet známých kmenů *A. astaci* nerozšířily, ale naznačily původ patogenu při jednotlivých úhynech. Lilley a kol. (1997) potvrdili, že úhyny britských populací raka *A. pallipes* způsobil kmen ze skupiny B, tj. pravděpodobně přenesený z raka signálního. Podobně dopadly analýzy izolátů z hromadných úhynů raka říčního v Německu roku 1996 (Oidtmann a kol., 1999) i raka *A. pallipes* ve Španělsku (Diéguez-Urbeondo a kol., 1999). Vennerström a kol. (1998) ve Finsku prokázali přítomnost *A. astaci* ze skupiny A i B, tj. invazi račího moru minimálně ze dvou různých zdrojů, pravděpodobně jak přetrvávající infekci původním kmenem patogenu, tak i pozdější přenos z raka signálního. Přehled výsledků výše popsanych studií shrnuje Tab. 1.

Z těchto výzkumů vyplývá, že *A. astaci* se do Evropy dostal minimálně čtyřmi nezávislými invazemi. Zdá se také, že první vlna moru, která způsobila na konci 19. století vyhynutí velké části populací raků v Evropě, byla způsobena invazí jedinou (kmenem A),

jelikož u dalších kmenů je jasně doložitelná jejich souvislost s později introdukovanými přenašeči. Zatím není známo, jaký kmen *A. astaci* se vyskytuje na raku pruhovaném, nejvýznamnějším přenašeči patogenu na území ČR.

Tab. 1. Skupiny izolátů *A. astaci* rozdělené podle výsledků RAPD-PCR

Tab. 1. Groups of *A. astaci* isolates based on results of RAPD-PCR

Skupina Group	Země původu izolátů <i>A. astaci</i> Country of isolate origin	Rok izolace Year of isolation	Druh raka Crayfish species
Skupina A	Švédsko (Sweden)	1962–1973	<i>Astacus astacus</i>
	Turecko (Turkey)	1988	<i>Astacus leptodactylus</i>
	Finsko (Finland)	1995	<i>Astacus astacus</i>
Skupina B	USA	1970	<i>Pacifastacus leniusculus</i>
	Švédsko (Sweden)	1971	<i>Pacifastacus leniusculus</i>
	Švédsko (Sweden)	1970	<i>Astacus astacus</i>
	Finsko (Finland)	1995	<i>Astacus astacus</i>
	Velká Británie (Great Britain)	1990	<i>Austropotamobius pallipes</i>
	Německo (Germany)	1996	<i>Astacus astacus</i>
	Španělsko (Spain)	1997	<i>Austropotamobius pallipes</i>
Skupina C	Švédsko (Sweden) (pův. Kanada/ originally from Canada)	1978	<i>Pacifastacus leniusculus</i>
Skupina D	Španělsko (Spain)	1992	<i>Procambarus clarkii</i>

Nemožnost léčby onemocnění, prevence, reintrodukce raků, praktická doporučení

Dosud nebyl nalezen žádný způsob léčby raků zasažených račím morem a zatím není také možné zbavit přenašeče latentní nákazy. Pokud se někde vyskytne akutní forma onemocnění (v podobě masového úhynu raků), **nemá smysl se jakýmkoli způsobem snažit raky zachraňovat, ale je třeba především udělat všechno pro to, aby se choroba nešířila dál. Naopak, manipulace s hynoucími raky nebo dokonce jejich přenášení na jiná místa a také jakékoliv práce probíhající na infikované lokalitě mohou vést k šíření onemocnění!**

K prevenci šíření nemoci z míst hromadných úhynů raků se dříve používalo vápnění vody hašeným vápnem (Vallin, 1936; citováno v Söderhäll a kol., 1977), jde však o drastický zásah do ekosystému a není tedy příliš vhodné. K zabránění šíření patogenu migrací nakažených raků proti proudu (ve vodním toku nebo z jezera do jeho přítoků) lze použít elektrické bariéry (Söderhäll a kol., 1977), které jsou odstraněny teprve tehdy, až je jisté, že lokalita je prostá původce moru. To lze zjistit umístěním vnímavých raků do klecí ponořených do vody na různých místech lokality a jejich následnou kontrolou (Taugbøl a kol., 1993). Raci z nezasažených horních toků mohou po odstranění elektrické bariéry lokalitu znovu kolonizovat. Také fyzické bariéry (např. jezy) brání přesunům raků proti proudu, ne však zcela účinně (závisí na výšce stupně a případně i možnosti překonat překážku po souši).

Dobrou prevencí přenosu moru je **dezinfekce věcí, jež mohly přijít do kontaktu s infikovanou vodou nebo zvířaty**. Účinné a pro praktické použití vhodné jsou dezinfekční **přípravky na bázi chloru a jodu** (Alderman a Polglase, 1985). Hall a Unestam (1980) zjistili silný fungicidní efekt malachitové zeleně dobře působící i proti růstu mycelia patogenu na povrchu těla ryb. Použití malachitové zeleně však není vhodné vzhledem k jejím

karcinogenním účinkům. **Nejjednodušší a velmi efektivní způsob zničení zoospor je dokonalé vysušení věcí kontaminovaných infikovanou vodou.** Patogen je totiž k vyschnutí vysoce citlivý. Nesnáší také vysoké teploty (**horká voda**). Zatím není jasné, jak dlouho *A. astaci* přežívá v mrazu. Oidtmann a kol. (2002b) byli schopni získat kulturu patogenu z těl mrtvých raků uložených 48 hodin v -20 °C. Dlouhodobější zmrznutí by se dalo využít při prevenci přenosu račího moru, např. při transportu raků určených ke konzumaci nebo k použití jako návnady, bylo by však potřeba dobře otestovat, jaká doba je potřebná k úplnému zahubení patogenu (Oidtmann a kol., 2002b). $MgCl_2$ inhibuje produkci zoospor a jejich uvolňování z infikovaných raků a tím brání přenosu infekce na další jedince (Rantamäki a kol., 1992).

Jelikož račí mor způsobuje většinou 100% mortalitu u citlivých druhů raků, zničí si tak substrát pro další šíření a tím i sám sebe. Vzhledem k vysoké specifitě parazita k rakům (nežije na jiných organismech ani volně v prostředí), nepřítomnosti jakýchkoli klidových stadií a krátké životnosti spor tedy vymizí s vymizením hostitele (Unestam a Ajaxon, 1978). Taková situace je běžná v tekoucích vodách a také na mnoha lokalitách se stojatou vodou po epidemii račího moru. Sem je pak možné (lépe však až po několika letech) opět raky vysadit. Je třeba ale před tím ověřit na menším počtu jedinců, jestli je lokalita opravdu už prostá račího moru a jestli se nákaza na lokalitu nedostává opakovaně (např. zoospory s vodou při vysazování ryb). **Reintrodukcí ale samozřejmě znemožňuje přítomnost přenašečů *A. astaci*, severoamerických raků, na lokalitě. Není také vhodné vysazovat naše raky na lokality v blízkosti populací severoamerických druhů, zvláště ne v rámci stejného povodí.** Takové populace původních druhů by byly pravděpodobně dříve nebo později odsouzeny k úhynu na račí mor.

Jiná je ale situace u rozsáhlých vodních ploch, typicky jde o skandinávská jezera (Fürst, 1995). Zde většina pokusů o reintrodukcí původních raků do jezer zasažených morem selhala přes často obrovské počty vysazených jedinců. Infekce se zde totiž zřejmě dlouhodobě udržuje v „chronické podobě“ ve zbytkových populacích raků, aniž by byli přítomni nepůvodní přenašeči. Příčina tohoto jevu není úplně jasná, avšak jako pravděpodobný se jeví následující proces. První epidemií moru na lokalitě nebyli vzhledem velké rozloze jezera zahubeni úplně všichni původní raci, jejich velmi slabá populace přežívá a jedinci se vyskytují v nižších hustotách. Občasný místní úhyn jednotlivých raků nezasáhne mnoho dalších jedinců, avšak alespoň některé zoospory uspějí při vyhledávání nového hostitele. Populace raků se však nemůže obnovit na původní velikost, protože při zvýšení její hustoty nad určitou mez dojde k nové epidemii račího moru. Takto se může infekce udržovat desítky let (Nylund a Westman, 1995; Taugbøl a kol., 1993). Zdá se tedy, že aby mohla být reintrodukcí původních raků úspěšná, musí dojít v takových případech nejdříve k odstranění všech raků a s nimi vymizí i patogen (Fürst, 1995). V podmínkách střední Evropy však popsána „chronická nákaza“ populací původních raků patogenem nebyla zaznamenána a je to nejspíše specifikum rozlehlých skandinávských jezer.

SOUHRN

Račí mor, jehož původcem je parazit *Aphanomyces astaci* (*Oomycetes*, *Saprolegniales*), byl v Evropě poprvé zaznamenán v roce 1859 a během následujících desetiletí zdecimoval populace původních raků v mnoha evropských zemích. *A. astaci* tvoří mycelium v kutikule raků a rozmnožuje se pomocí zoospor. Akutní fáze nákazy se projevuje neklidem a neobvyklou denní aktivitou postižených jedinců, křečemi, upadáváním končetin a hynutím. Parazit je vysoce specifický k rakům, jiné korýše ani ryby nenapadá. Diagnostika račího moru byla dříve založena na kultivaci patogenu, dnes jsou dostupné podstatně spolehlivější molekulární metody k určení *A. astaci*. Původními hostiteli a přenašeči *A. astaci* jsou severoamerické druhy raků, odolné vůči onemocnění. Parazit roste v jejich kutikule, ale je

omezován silnou imunitní odpovědí hostitelů, a tak obvykle nedochází k úhynu. S introdukcí severoamerických raků (především raka pruhovaného, *Orconectes limosus*, raka signálního, *Pacifastacus leniusculus*, a raka červeného, *Procambarus clarkii*) do Evropy a jejich šířením se račí mor opět stal aktuální hrozbou pro původní evropské druhy raků. K přenosu nákazy dochází kontaktem mezi raky nebo přenosem zoospor s vodou nebo na mokřích předmětech. V českých zemích byly zaznamenány rozsáhlé úhyny raků na přelomu 19. a 20. století. Z druhé poloviny 20. století ale existují pouze ojedinělé záznamy o pravděpodobném výskytu *A. astaci* na našem území. Během let 2004 až 2009 byl však račí mor potvrzen jako příčina vymizení původních raků (raka říčního, *Astacus astacus*, i raka kamenáče, *Austropotamobius torrentium*) na osmi lokalitách a infikovaní jedinci byli zjištěni v 17 z 28 zkoumaných populací severoamerických raků (raka pruhovaného a signálního) u nás. Patogen račího moru, *A. astaci*, je tedy v České republice v současnosti široce rozšířen a působí jako jeden z nejvýznamnějších faktorů ohrožujících dlouhodobé přežití našich původních druhů raků.

Poděkování

B. Oidtmann, J. Diéguez-Uribeondo a L. Cerenius poskytli hůře dostupnou literaturu o račím moru. Cenné poznámky O. Koukola, P. Kozáka a T. Petruskové přispěly k faktickému i stylistickému zkvalitnění textu. Výzkum račího moru na Katedře ekologie Univerzity Karlovy byl podpořen grantovými agenturami České republiky (projekt GA ČR 206/08/H049), Univerzity Karlovy (GA UK 141/2005), Akademie věd České republiky (GA AV IAA601870701) a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (výzkumný záměr MSM0021620828).

LITERATURA

- Ahern, D., England, J., Ellis, A., 2008. The virile crayfish, *Orconectes virilis* (Hagen, 1870) (Crustacea: Decapoda: Cambaridae), identified in the UK. *Aquatic Invasions*, 3: 102–104.
- Alderman, D.J., 1996. Geographical spread of bacterial and fungal diseases of crustaceans. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties*, 15: 603–632.
- Alderman, D.J., Polglase, J.L., 1985. Disinfection for crayfish plague. *Aquaculture and Fisheries Management*, 16: 203–205.
- Alderman, D.J., Polglase, J.L., 1986. *Aphanomyces astaci*: isolation and culture. *Journal of Fish Diseases*, 9: 367–379.
- Alderman, D.J., Polglase, J.L., Frayling, M., Hogger, J., 1984. Crayfish plague in Britain. *Journal of Fish Diseases*, 7: 401–405.
- Alderman, D.J., Polglase, J.L., Frayling, M., 1987. *Aphanomyces astaci* pathogenicity under laboratory and field conditions. *Journal of Fish Diseases*, 10: 385–393.
- Alderman, D.J., Holdich, D., Reeve, I., 1990. Signal crayfish as vectors in crayfish plague in Britain. *Aquaculture*, 86: 3–6.
- Andersson, M.G., Cerenius, L., 2002. Analysis of chitinase expression in the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 51: 139–147.
- Ballesteros, I., Martín, M.P., Diéguez-Uribeondo, J., 2006. First isolation of *Aphanomyces frigidophilus* (Saprolegniales) in Europe. *Mycotaxon*, 95: 335–340.
- Beran, L., 1995. Račí v CHKO Kokořínsko, část 1. *Ochrana přírody*, 50: 114.
- Beran, L., 1999. Znáte naše raky? *Světlem zvířat*, 4: 60–61.
- Bubb, D.H., Thom, T.J., Lucas, M.C., 2005. The within-catchment invasion of the nonindigenous signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana), in upland rivers. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, 376–377: 665–673.
- Cejp, K., 1959. Oomycetes I. *Flora ČSR, řada B mykologicko-lichenologická, sv.2.*, Nakladatelství ČSAV.
- Cerenius, L., Söderhäll, K., 1984a. Chemotaxis in *Aphanomyces astaci*, an arthropod parasitic fungus. *Journal of Invertebrate Pathology*, 43: 278–281.
- Cerenius, L., Söderhäll, K., 1984b. Isolation and properties of beta-glucan synthetase from the aquatic fungus, *Aphanomyces astaci*. *Physiologia Plantarum*, 60: 247–252.
- Cerenius, L., Söderhäll, K., 1984c. Repeated zoospore emergence from isolated spore cysts of *Aphanomyces astaci*. *Experimental Mycology*, 8: 370–377.
- Cerenius, L., Söderhäll, K., Persson, M., Axajon, R., 1988. The crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci* diagnosis, isolation, and pathobiology. *Freshwater Crayfish*, 7: 131–144.

- Cuéllar, L., Coll, M., 1983. Epizootiology of the crayfish plague (aphanomycosis) in Spain. *Freshwater Crayfish*, 5: 345–348.
- Diéguez-Uribeondo, J., Söderhäll, K., 1993. *Procambarus clarkii* Girard as a vector for the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci* Schikora. *Aquaculture and Fisheries Management*, 24: 761–765.
- Diéguez-Uribeondo, J., Cerenius, L., 1998. The inhibition of extracellular proteinases from *Aphanomyces* spp. by three different proteinase inhibitors from crayfish blood. *Mycological Research*, 102: 820–824.
- Diéguez-Uribeondo, J., Söderhäll, K., 1999. RAPD evidence for the origin of an outbreak of crayfish plague in Spain. *Freshwater Crayfish*, 12: 313–318.
- Diéguez-Uribeondo, J., Huang, T.S., Cerenius, L., Söderhäll, K., 1995. Physiological adaptation of an *Aphanomyces astaci* strain isolated from the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. *Mycological Research*, 99: 574–578.
- Diéguez-Uribeondo, J., García, M.A., Cerenius, L., Kozubíková, E., Ballesteros, I., Windels, C., Weiland, J., Kator, H., Söderhäll, K., Martín, M.P., 2009. Phylogenetic relationships among plant and animal parasites, and saprotrophs in *Aphanomyces* (Oomycetes). *Fungal Genetics and Biology*, 46: 365–376.
- Đuriš, Z., Horká, I., 2007. První nález invazního raka pruhovaného *Orconectes limosus* (Rafinesque) na území Moravy a Slezska v ČR. *Časopis Slezského muzea. Série A, Vědy přírodní*, 56: 49–52.
- Edgerton, B.F., Evans, L.H., Stephens, F.J., Overstreet, R.M., 2002. Synopsis of freshwater crayfish diseases and commensal organisms. *Aquaculture*, 206: 57–135.
- Edgerton, B.F., Henttonen, P., Jussila, J., Mannonen, A., Paasonen, P., Taugbøl, T., Edsman, L., Souty-Grosset, C., 2004. Understanding the causes of disease in European freshwater crayfish. *Conservation Biology*, 18: 1466–1474.
- Evans, L.H., Edgerton, B.F., 2002. Pathogens, parasites and commensals. In: Holdich, D.M. (editor), *Biology of Freshwater Crayfish*. Blackwell Science, Oxford, pp. 377–423.
- Filipová, L., Kozubíková, E., Petrušek, A., 2006a. *Orconectes limosus* (Rafinesque, 1817). In: Mlíkovský, J., Stýblo, P. (Editors), *Nepůvodní druhy ve fauně a flóře České republiky*. ČSOP, Praha, pp. 237–239.
- Filipová, L., Petrušek, A., Kozák, P., Polícar, T., 2006b. *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852). In: Mlíkovský, J., Stýblo, P. (Editors), *Nepůvodní druhy ve fauně a flóře České republiky*. ČSOP, Praha, pp. 239–240.
- Fürst, M., 1995. On the recovery of *Astacus astacus* L. populations after an epizootic of the crayfish plague (*Aphanomyces astaci* Shikora). *Freshwater Crayfish*, 8: 565–576.
- Gherardi, F., Baldaccini, G.N., Ercolini, P., Barbaresi, S., De Luise, G., Mazzoni, D., Mori, M., 1999. Case studies of alien crayfish in Europe: The situation in Italy. In: Gherardi, F., Holdich, M. (Editors), *Crayfish in Europe as alien species. How to make the best of a bad situation?* A.A. Balkema, Rotterdam, Brookfield, pp. 107–127.
- Hall, L., Unestam, T., 1980. The effect of fungicides on survival of the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*, Oomycetes, growing on fish scales. *Mycopathologia*, 72: 131–134.
- Harlioğlu, M.M., 2008. The harvest of the freshwater crayfish *Astacus leptodactylus* Eschscholtz in Turkey: harvest history, impact of crayfish plague, and present distribution of harvested populations. *Aquaculture International*, 16: 351–360.
- Huang, T.S., Cerenius, L., Söderhäll, K., 1994. Analysis of genetic diversity in the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*, by random amplification of polymorphic DNA. *Aquaculture*, 126: 1–9.
- Johnsen, S. I., Taugbøl, T., Andersen, O., Museth, J., Vrålstad, T., 2007. The first record of the non-indigenous signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* in Norway. *Biological Invasions* 9: 939–941.
- Kozák, P., Adámek, Z., Řehulka, J., 2000a. Úhyn raků v potoce Pšovka v roce 1998, studie č. 17. In: Svobodová, Z., Máchová, J. (Editors), *Ekotoxikologie, praktická cvičení, část 2, Diagnostika havarijních úhynů ryb a dalších vodních organismů*. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Brno, pp. 109–112.
- Kozák, P., Červinka, S., Vladík, P., 2000b. Úhyn raků na potoce Loděnický (Kačák) v roce 1999, studie č. 18. In: Svobodová, Z., Máchová, J. (Editors), *Ekotoxikologie, praktická cvičení, část 2, Diagnostika havarijních úhynů ryb a dalších vodních organismů*. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Brno, pp. 113–116.
- Kozák, P., Đuriš, Z., Polícar, T., 2001. Analýza migračních schopností nepůvodních druhů korýšů na území ČR – literární rešerše. *Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech*.
- Kozubíková, E., Petrušek, A., Đuriš, Z., Kozák, P., Geiger, S., Hoffmann, R., Oidtmann, B., 2006. The crayfish plague in the Czech Republic – review of recent suspect cases and a pilot detection study. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, 380–381: 1313–1324.
- Kozubíková E., Petrušek A., Đuriš Z., Oidtmann B., 2007. *Aphanomyces astaci*, the crayfish plague pathogen, may be a common cause of crayfish mass mortalities in the Czech Republic. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, 27: 79–82.
- Kozubíková E., Petrušek A., Đuriš Z., Martín M.P., Diéguez-Uribeondo J., Oidtmann B., 2008. The old menace is back: recent crayfish plague outbreaks in the Czech Republic. *Aquaculture*. 274: 208–217.

- Kozubíková, E., Filipová, L., Kozák, P., Ďuriš, Z., Martín, M.P., Diéguez-Uribeondo, J., Oidtmann, B., Petrusek, A., 2009. Prevalence of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* in invasive American crayfishes in the Czech Republic. Conservation Biology, DOI 10.1111/j.1523-1739.2009.01240.x.
- Krupauer, V., 1968. Zlatý rak. Nakladatelství České Budějovice.
- Lindqvist, O.V., Huner, J.V., 1999. Life history characteristics of crayfish: What makes some of them good colonizers? In: Gherardi, F., Holdich, D.M. (Editors), Crayfish in Europe as alien species. How to make the best of a bad situation? Crustacean Issues 11. A.A.Balkema, Brookfield, Rotterdam, pp. 23–30.
- Lilley, J.H., Cerenius, L., Söderhäll, K., 1997. RAPD evidence for the origin of crayfish plague outbreaks in Britain. Aquaculture, 157: 181–185.
- Lohniský, K., 1983. Raci v našich vodách. Rybářství, 6: 128–129.
- Matthews, M., Reynolds, J.D., 1990. Laboratory investigations of the pathogenicity of *Aphanomyces astaci* for irish fresh water crayfish. Hydrobiologia, 203: 121–126.
- Nyhlén, L., Unestam, T., 1975. Ultrastructure of the crayfish integument by the fungal parasite, *Aphanomyces astaci*, Oomycetes. Journal of Invertebrate Pathology, 26: 353–366.
- Nyhlén, L., Unestam, T., 1980. Wound reactions and *Aphanomyces astaci* growth in crayfish cuticle. Journal of Invertebrate Pathology, 36: 187–197.
- Nylund, V., Westman, K., 1983. Frequency of the visible symptoms of crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci* on the American crayfish *Pacifastacus leniusculus* in natural populations in Finland. Freshwater Crayfish, 5: 277–283.
- Nylund, V., Westman, K., 1995. The crayfish mortality register as an aid in the control of crayfish diseases in Finland. Freshwater Crayfish, 10: 363–373.
- Nylund, V., Westman, K., 2000. The prevalence of crayfish plague (*Aphanomyces astaci*) in two signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) populations in Finland. Journal of Crustacean Biology, 20: 777–785.
- Oidtmann, B., 2000. Diseases in freshwater crayfish. In: Rogers, D., Brickland, J. (Editors), Crayfish conference Leeds, pp. 9–18.
- Oidtmann, B., Cerenius, L., Schmid, I., Hoffmann, R., Söderhäll, K., 1999. Crayfish plague epizootics in Germany – classification of two German isolates of the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci* by random amplification of polymorphic DNA. Diseases of Aquatic Organisms, 35: 235–238.
- Oidtmann, B., Bausewein, S., Hölzle, L., Hoffmann, R., Wittenbrink, M., 2002a. Identification of the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci* by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. Veterinary Microbiology, 85: 183–194.
- Oidtmann, B., Heitz, E., Rogers, D., Hoffmann, R.W., 2002b. Transmission of crayfish plague. Diseases of Aquatic Organisms, 52: 159–167.
- Oidtmann, B., Schaefer, N., Cerenius, L., Söderhäll, K., Hoffmann, R.W., 2004. Detection of genomic DNA of the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci* (Oomycete) in clinical samples by PCR. Veterinary Microbiology, 100: 269–282.
- Oidtmann, B., Geiger, S., Steinbauer, P., Culas, A., Hoffmann, R.M., 2006. Detection of *Aphanomyces astaci* in North American crayfish by polymerase chain reaction. Diseases of Aquatic Organisms, 72: 53–64.
- Olson, L.W., Cerenius, L., Lange, L., Söderhäll, K., 1984. The primary and secondary spore cyst of *Aphanomyces* (Oomycetes, Saprolegniales). Nordic Journal of Botany, 4: 681–696.
- Persson, M., Söderhäll, K., 1983. *Pacifastacus leniusculus* Dana and its resistance to the parasitic fungus *Aphanomyces astaci* Schikora. Freshwater Crayfish, 5: 292–298.
- Petrusek, A., Petrusková, T., 2007. Invasive American crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Decapoda: Astacidae) in the Morava River (Slovakia). Biologia, 62: 356–359.
- Petrusek, A., Filipová, L., Ďuriš, Z., Horká, I., Kozák, P., Polícar, T., Štambergová, M., Kučera, Z., 2006. Distribution of the invasive spiny-cheek crayfish (*Orconectes limosus*) in the Czech Republic. Past and present. Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture, 380–381: 903–917.
- Pöckl, M., Pekny, R., 2002. Interaction between native and alien species of crayfish in Austria: Case studies. Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture, 367: 763–776.
- Pursiainen M., Viljamaa-Dirks, S., Määttänen, K., 2008. The production of plague-free crayfish offspring in aquaculture, In: Abstracts, 17th Symposium of International Association of Astacology, Kuopio, Finsko: pp. 82.
- Rahe, R., Soylu, E., 1989. Identification of the pathogenic fungus causing destruction to turkish crayfish stocks (*Astacus leptodactylus*). Journal of Invertebrate Pathology, 54: 10–15.
- Rantamäki, J., Cerenius, L., Söderhäll, K., 1992. Prevention of transmission of the crayfish plague fungus (*Aphanomyces astaci*) to the fresh water crayfish *Astacus astacus* by treatment with MgCl₂. Aquaculture, 104: 11–18.
- Reynolds, J.D., 1988. Crayfish extinctions and crayfish plague in central Ireland. Biological Conservation, 45: 279–285.

- Royo, F., Andersson, G., Bangyeekhun, E., Muzquiz, J.L., Söderhäll, K., Cerenius, L., 2004. Physiological and genetic characterisation of some new *Aphanomyces* strains isolated from freshwater crayfish. *Veterinary Microbiology*, 104: 103–112.
- Schulz, H. K., Smietana, P., Maiwald, T., Oidtmann, B., Schulz, R., 2006. Case studies on the co-occurrence of *Astacus astacus* (L.) and *Orconectes limosus* (Raf.): snapshots of a slow displacement. *Freshwater Crayfish*, 15: 212–219.
- Scott, W. W., 1961. A monograph of the genus *Aphanomyces*. Virginia Agricultural Experimental Station, Technical Bulletin, 151: 1–95.
- Söderhäll, K., Ajaxon, R., 1982. Effect of quinones and melanin on mycelial growth of *Aphanomyces* spp. and extracellular protease of *Aphanomyces astaci*, a parasite on crayfish. *Journal of Invertebrate Pathology*, 39: 105–109.
- Söderhäll, K., Cerenius, L., 1999. The crayfish plague fungus: History and recent advances. *Freshwater Crayfish*, 12: 11–35.
- Söderhäll, K., Svensson, E., Unestam, T., 1977. An inexpensive and effective method for elimination of the crayfish plague: barriers and biological control. *Freshwater Crayfish*, 3: 333–42.
- Taugbøl, T., Skurdal, J., Hastein, T., 1993. Crayfish plague and management strategies in Norway. *Biological Conservation*, 63: 75–82.
- Unestam, T., 1965. Studies on the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci* I. Some factors affecting growth in vitro. *Physiologia Plantarum*, 18: 483–505.
- Unestam, T., 1966. Studies on the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci* II. Factors affecting zoospores and zoospore production. *Physiologia Plantarum*, 19: 1110–1119.
- Unestam, T., 1969a. On the adaptation of *Aphanomyces astaci* as a parasite. *Physiologia Plantarum*, 22: 221–235.
- Unestam, T., 1969b. On the physiology of zoospore production in *Aphanomyces astaci*. *Physiologia Plantarum*, 22: 236–245.
- Unestam, T., 1969c. Resistance to the crayfish plague in some American, Japanese and European crayfishes. Report of the Institute of the Freshwater Research Drottningholm, 49: 202–209.
- Unestam, T., 1972. On the host range and origin of the crayfish plague fungus. Report of the Institute of the Freshwater Research Drottningholm, 52: 192–198.
- Unestam, T., 1973. Fungal diseases of Crustacea. Review of Medical and Veterinary Mycology, 8: 1–20.
- Unestam, T., 1975. Defence reactions in and susceptibility of Australian and New Guinea freshwater crayfish to European crayfish plague fungus. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, 53: 349–359.
- Unestam, T., Ajaxon, R., 1976. Phenol oxidation in soft cuticle and blood of crayfish compared with that in other arthropods and activation of the phenol oxidases by fungal and other cell walls. *Journal of Invertebrate Pathology*, 27: 287–295.
- Unestam, T., Ajaxon, R., 1978. The crayfish plague fungi, the ecological niche of a specialized fungus and the fate of the fungus in the crayfish host, abstrakt vzdělávacího filmu (16 mm, 35 min). *Freshwater Crayfish*, 4: 399–402.
- Vennerström, P., Söderhäll, K., Cerenius, L., 1998. The origin of two crayfish plague (*Aphanomyces astaci*) epizootics in Finland on noble crayfish, *Astacus astacus*. *Annales Zoologici Fennici*, 35: 43–46.
- Vey, A., Söderhäll, K., Ajaxon, R., 1983. Susceptibility of *Orconectes limosis* Raff. to the crayfish plague, *Aphanomyces astaci* Schikora. *Freshwater Crayfish*, 5: 284–291.
- Viljamaa-Dirks, S., Heinikainen, S., 2006. Improved detection of crayfish plague with a modified isolation method. *Freshwater Crayfish*, 15: 376–382.
- Volf, F., 1926. Račí mor a hynutí raků v řece Volyňce. *Rybářský věstník*, 6: 98–100, 116–118, 131–133.
- Vrålstad, T., Knutsen, A.K., Tengs, T., Holst-Jensen, A., 2009. A quantitative TaqMan MGB real-time polymerase chain reaction based assay for detection of the causative agent of crayfish plague *Aphanomyces astaci*. *Veterinary Microbiology*, 137: 146–155.