

Aus dem Department für Pathobiologie  
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Parasitologie

(Leiterin: Univ.Prof. Dr.med.vet. Anja Joachim)

**Barcoding und Genotypisierung von Stechmücken aus Österreich - mit dem  
Hauptaugenmerk auf den *An. maculipennis*-Komplex**

Bachelorarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Anja Pelzl

Wien, im Juli 2020

Betreuer: Priv.-Doz. Dr. Hans-Peter Führer  
Institut für Parasitologie  
Department für Pathobiologie  
Veterinärmedizinische Universität Wien

Begutachterin: Carina Zित्रा PhD  
Department für Limnologie und Bio-Ozeanographie  
Universität Wien

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Stechmücken</b> .....	<b>2</b>
3.1.	<i>Allgemein</i> .....	2
3.2.	<i>Biologie der Stechmücken</i> .....	2
3.3.	<i>Stechmücken in Österreich</i> .....	5
<b>4.</b>	<b>Molekulare Analyse</b> .....	<b>7</b>
4.1.	<i>Sammlung der Stechmücken</i> .....	7
4.2.	<i>DNA-Extraktion</i> .....	7
4.3.	<i>DNA-Barcoding</i> .....	8
4.4.	<i>Genotypisierung mittels Polymerase-Kettenreaktion</i> .....	12
4.5.	<i>Gelelektrophorese</i> .....	17
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>18</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>20</b>
<b>7.</b>	<b>Summary</b> .....	<b>21</b>
<b>8.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>22</b>
<b>9.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>23</b>
<b>10.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>26</b>
<b>11.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>26</b>
<b>12.</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>27</b>

## 1 Einleitung

Jährlich infizieren sich eine Milliarde Menschen mit vektor-übertragenen Krankheitserregern und Millionen davon kommen durch ihre Folgen ums Leben (Zittra 2017a). Stechmücken und die von ihnen übertragenen Pathogene spielen hierbei eine große Rolle, denn betrachtet man die Morbidität und Mortalität der von ihnen transferierten Krankheiten, ist eindeutig, dass sie zu den für den Menschen lebensgefährlichsten Tieren der Welt gehören (Becker et al. 2010).

Spezifische Arten von Culicidae können Vektoren für bestimmte Pathogene sein und da selbst nahe verwandte Spezies eine hohe Variation in ihrer Vektorkompetenz aufzeigen, ist es von hoher Wichtigkeit, diese Arten so präzise wie möglich unterscheiden zu können, um die Ausbreitung von Erregern beobachten und unter Kontrolle halten zu können (Collins und Paskewitz 1996, Becker et al. 2010).

Für die Differenzierung von weit entfernten – aber auch nahen verwandten – Spezies, gibt es einige verschiedene Ansätze, zwei davon werden in dieser Arbeit genauer erläutert. Eine dieser Techniken wird „Barcoding“ genannt – hierbei wird die Sequenz des mitochondrialen Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit I Gens der Proben amplifiziert, sequenziert und anschließend mit Datenbanken verglichen. Die andere Methode behandelt das Genotypisieren von Stechmücken über sogenannte Spacer-Sequenzen.

Ziel der Arbeit war es, gesammelte Stechmücken-Proben der Gattung *Anopheles* zu barcoden und genotypisieren, um anschließend mehr Information darüber zu haben, welche Formen des *Anopheles maculipennis*-Komplexes in Österreich vorkommen. Allerdings war dies aufgrund der von der Regierung auferlegten Ausgangsbeschränkungen hinsichtlich COVID-19 nicht möglich, weshalb mit dem Betreuer und der Veterinärmedizinischen Universität Wien vereinbart wurde, dass statt einer empirischen Arbeit eine Literaturarbeit verfasst wird. Infolgedessen konnten nur Hypothesen über das Vorkommen der jeweiligen Arten in Österreich aufgestellt werden.

## 2 Stechmücken

### 3.1. Allgemein

Stechmücken (Culicidae) – in Österreich auch „Gelsen“ genannt – sind eine Familie der Mücken (Nematocera), welche Teil der Ordnung der Zweiflügler (Diptera) sind und der Klasse der Insekten (Insecta) zugerechnet werden. Weltweit gibt es über 3.500 verschiedene Arten von Stechmücken, die in zwei Unterfamilien, Culicinae und Anophelinae, eingeteilt werden können (Abb.1). Es gibt über 110 Gattungen unter den Culicidae, welche aber größtenteils der Unterfamilie der Culicinae zugehörig sind (Harbach 2013).

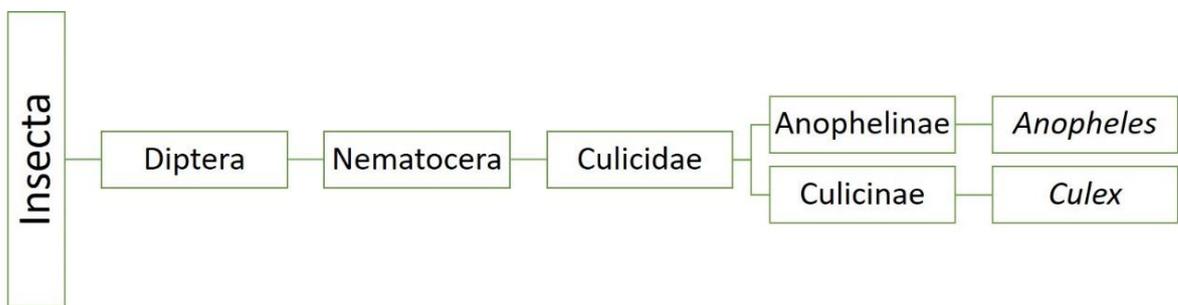


Abb. 1: Vereinfachter Überblick über die systematische Klassifizierung von Stechmücken

### 3.2. Biologie der Stechmücken

Als holometabole Insekten durchlaufen Stechmücken eine komplette Metamorphose – sie beginnen ihre Entwicklung als Ei, durchlaufen vier Larvenstadien, um sich dann in eine Puppe und schlussendlich in eine Imago (geschlechtsreifes, adultes Insekt) zu entwickeln (Becker et al. 2010, Dettner et al. 2010).

Für die Larvalentwicklung der Stechmücken sind Gewässer essentiell, aber ob dieses permanent oder temporär, stark verschmutzt oder sauber, klein oder groß, stillstehend oder fließend, oder auch nur eine geringe Akkumulation von Wasser sein kann, hängt jeweils von der Spezies ab (Becker et al. 2010).

Adulte Stechmücken unterscheiden sich im Hinblick auf die Wirtssuche, das Stechen, das Ausbreitungsverhalten und die Reproduktionsstrategie stark in ihrer Bionomie. Sie haben spezielle Adaptationsmechanismen und können sich daher unter den verschiedensten Umweltbedingungen erfolgreich vermehren (Becker et al. 2010, Dettner et al. 2010).

Überschwemmungsmücken präferieren temporär überflutete Gebiete entlang von Flüssen oder Seen mit Wasserspiegelschwankungen. Nach der Schneeschmelze oder starkem Regen bestehen für die sogenannten Frühjahrs­mücken ideale Bedingungen für ihre Fortpflanzung. Die Larven von *Anopheles* können gemeinsam mit anderen Stechmückenspezies beispielsweise in frischem Wasser, Salzwasser, Reisfeldern oder kleinen, temporären Wasseransammlungen gefunden werden. Außerdem gibt es Baumhöhlenbrüter, welche ein permanent wassergefülltes Bruthabitat benötigen (z.B. *An. plumbeus*). Spezies wie zum Beispiel *Culex pipiens* s.l. können sogar in verschiedensten kleinen Wasserbehältern, wie Regentonnen, Reifen oder Blumenvasen, brüten. Bestehen ungünstige Umweltbedingungen für die Larven, können diese in Diapause gehen, um ihre Entwicklung zu einem besser geeigneten Zeitpunkt fortzusetzen (Becker et al. 2010, Dettner et al. 2010).

Der apode Körper der Stechmückenlarven wird in folgende drei Teile gegliedert:

- 1.) Eucephaler Kopf mit beißend-kauenden Mundwerkzeugen, Augen und Antennen
- 2.) Thorax
- 3.) Abdomen, bestehend aus sieben identischen Segmenten und drei abgewandelten hinteren Segmenten, welche den Elektrolythaushalt regulieren (Becker et al. 2010)

Die Puppen der Culicidae leben ebenfalls im Wasser, wo die durchschnittliche Stechmücke zwei Tage in jenem Stadium verbringt – die Dauer der Entwicklung vom Ei zur Imago ist abhängig von der jeweiligen Stechmückenart und von der Temperatur. Sie sind gegenüber Austrocknung relativ tolerant und können selbst schlüpfen, wenn die Brutstätten fast ausgetrocknet sind. Es handelt sich um sogenannte Mumienpuppen, die im Vergleich zu den meisten anderen Mumienpuppen-ausbildenden Insekten beweglich sind. Im Gegensatz zu den Larven nehmen die Puppen keine Nahrung zu sich (Becker et al. 2010).

Adulte Culicidae sind kleine, zarte Lebewesen und haben den für ihre Klasse typischen Aufbau - sie werden in Caput, Thorax und Abdomen gegliedert. Dem Kopf entspringen paarige, gegliederte Antennen, Komplexaugen und stechend-saugendes Mundwerkzeug. Der Thorax ist dreiteilig, aus ihm ragen sowohl die sechs schlanken, langgezogenen Beine als auch die beiden Flügel inklusive Halteren. Im Abdomen befinden sich Fortpflanzungs- und Verdauungsorgane (Dettner et al. 2010).

Die Reproduktion von Culiciden ist abhängig von einer Blutmahlzeit, weshalb sie komplexe Mechanismen entwickelt haben, um an diese gelangen. Stechmücken finden ihre Wirte über thermale, visuelle und olfaktorische Reize – bei Letzteren spielen vor allem Kohlenstoffdioxid, Milchsäure, Aceton, Octanol, Butanon und Phenolverbindungen eine wichtige Rolle. Sobald sie zufällig in die Nähe eines Wirtes kommen und jene Signale registrieren, können sie gezielt auf den Wirt zugehen und den Vorgang der Blutaufnahme initiieren (Becker et al. 2010).

Culicidae verfügen vor allem für die Aufnahme von Pflanzensäften über ein stechend-saugendes Mundwerkzeug mit einem dünnen Rüssel. Das Mundwerkzeug der Weibchen ist allerdings auch darauf ausgerichtet durch Haut stechen zu können, damit sie an das für die Eireifung benötigte Blut kommen. Dafür beinhaltet der Rüssel das sogenannte Stiletbündel, welches aus dem Labroepipharynx (Essenskanal), dem Hypopharynx (Speichelkanal), zwei Maxillen zur Verankerung im Gewebe und zwei Mandibeln zum Durchdringen der Haut besteht. All dies wird außerhalb der Nahrungsaufnahme fest vom Labium zusammengehalten. Mithilfe des Labellums sucht die Stechmücke nach Kapillaren für die Blutaufnahme – hier geht man davon aus, dass sowohl die Dicke als auch die Temperatur der Haut eine entscheidende Rolle spielen, da sich daraus Rückschlüsse über die Anzahl der Kapillaren in der Haut ziehen lassen. Um während des Stechaktes die Gerinnung des Blutes zu unterbinden, injiziert das Weibchen ihren antikoagulativen Speichel in die Wunde, der oftmals eine Entzündungsreaktion hervorruft. Insgesamt kann ein Weibchen ca. das dreifache ihres Körpergewichtes in Form von Blut aufnehmen. Anautogene Weibchen benötigen für jede Eiablage eine Blutmahlzeit, während autogene Weibchen (z.B. *Culex pipiens form molestus*) ihre erste Eiablage auch ohne Blutmahlzeit vollziehen können (Becker et al. 2010).

Die verschiedenen Stechmückenarten weisen zudem unterschiedliche Vorlieben in ihren Lebensweisen auf. Es wird zwischen Exophagie und Endophagie differenziert – dies beschreibt, ob ein Tier lieber im Freien oder in Innenräumen seine Nahrung zu sich nimmt. Je nach bevorzugtem Aufenthalt in der Natur oder in Gebäuden außerhalb der Nahrungsaufnahme spricht man von Exophilie und Endophilie. Ebenso unterscheidet man abhängig vom präferierten Wirtstyp zwischen Herpetophilie, Ornithophilie, Mammophilie und Anthropophilie, falls keine Vorlieben bestehen spricht man von Zoophilie (Becker et al. 2010).

Am wichtigsten jedoch ist die Tatsache, dass Stechmücken auch Überträger diversester Pathogene, wie Viren, Bakterien, Protozoen und Nematoden sein können. Dies führt im Wirt zur Ausbildung vieler unterschiedlicher Krankheiten, wie beispielsweise Malaria, Dengue,

Gelbfieber, Chikungunya-Fieber, diverse Encephalitis-Erkrankungen sowie Filariosen. Diese können einerseits mechanisch (z.B. Schmierinfektion) und andererseits auch biologisch übertragen werden. Letzteres ist wesentlich komplizierter, da es eine Replikations- und Entwicklungsphase im Vektor voraussetzt. Zur biologischen Übertragung kommt es dadurch, dass sich die Pathogene im Bereich der Mundwerkzeuge ansammeln und anschließend mit dem Speichel des Tieres ins Blut des Wirtes übertragen werden (Becker et al. 2010).

Betrachtet man die Morbidität und Mortalität dieser Krankheiten, kann man eindeutig sagen, dass es sich bei Stechmücken um die für den Menschen gefährlichsten Tiere dieser Welt handelt (Becker et al. 2010).

### 3.3. Stechmücken in Österreich

Von den weltweit über 3.500 bekannten Stechmückenarten, sind circa 110 in Europa nachzuweisen (Zittra et al. 2017b). Diese Anzahl ist im Vergleich zu anderen Regionen der Welt sehr gering, allerdings kommen bestimmte Arten, beispielsweise *Cx. pipiens* s.l., mit einer hohen Häufigkeit vor (Führer 2019). Innerhalb der letzten Jahre stieg die Zahl an Stechmückenarten in Österreich stetig an. Während im Jahr 2002 noch nur 39 Spezies als heimisch bekannt waren, wuchs diese Zahl bis 2017 auf 49 Arten folgender sieben Gattungen: *Aedes/Ochlerotatus*, *Anopheles*, *Coquillettidia*, *Culex*, *Culiseta*, *Orthopodomyia* und *Uranotaenia* (Zittra et al. 2017b). Es gibt unterschiedliche Gründe, weshalb plötzlich so viele neue Arten in Österreich entdeckt worden sind: einerseits wurden neue molekularbiologische Verfahren zur Differenzierung von morphologisch ähnlichen Spezies etabliert, was zu einer Ent- und Aufdeckung von Artkomplexen, wie dem *Culex pipiens*-Komplex, führte. Andererseits kamen auch einige seltene, potentiell invasive sowie Arten, die bisher vor allem aus mediterranen Regionen bekannt waren (z.B. *Cs. longiareolata*), hinzu (Führer 2019).

Das Arteninventar von Culicidae in Österreich besteht aus über 50 % aus den Gattungen *Aedes* und *Ochlerotatus* – sie sind hauptsächlich Überschwemmungs- bzw. Wiesen- und Waldmücken (Zittra et al. 2014). Fast alle Arten dieser Gattung werden von Becker et al. (2010) als mammophil oder anthropophil beschrieben. Arten der Gattungen *Culiseta* und *Uranotaenia* sind in Österreich ebenfalls vertreten, allerdings fliegen sie den Menschen nur selten an, weshalb sie medizinisch weniger relevant sind. *Coquillettidia richiardii* ist die einzige Art, die die Gattung *Coquillettidia* repräsentiert, und wurde in Mitteleuropa bereits als Vektor für das West-Nil-Virus (WNV) als auch für das Sindbis-Virus beschrieben (Zittra et al. 2014).

Die Gattung *Anopheles* ist in Österreich durch sieben verschiedene Arten vertreten. Einen Bestandteil jener Gattung stellt der *Anopheles maculipennis*-Komplex dar, welcher aus folgenden acht Spezies besteht: *An. sacharovi*, *An. labranchiae*, *An. messeae*, *An. melanoon* (= *An. subalpinus*), *An. maculipennis*, *An. daciae*, *An. atroparvus* und *An. beklemishevi*. Allerdings sind die Mehrheit der in Österreich vorkommenden *Anopheles*-Mücken keine Angehörigen jenen Komplexes. Die meisten von ihnen nutzen Tümpel als Bruthabitate, mit Ausnahme von *An. plumbeus*, welche wassergefüllte Baumhöhlen zur Eiablage verwendet. Das Vorkommen von einst nicht einheimischen *An. hyrcanus*-Mücken in Österreich wurde erstmals von Lebl et al. (2013) und Seidel et al. (2013) beschrieben – nun gilt sie in Ostösterreich als etablierte Art. Verschiedene *Anopheles*-Mücken stellen hierzulande potentielle Überträger humaner Malaria dar, sowie Vektoren von WNV und *Dirofilaria repens* (Zittra et al. 2014, Silbermayer et al. 2014, Becker et al. 2010).

Spezies des *Culex pipiens*-Komplex sowie fünf andere Arten der Gattung *Culex* sind in Österreich heimisch. Erstere leben bevorzugt in der Nähe des Menschen und nutzen jegliche Wasseransammlungen als Bruthabitat (Zittra et al. 2014). Die Spezies *Culex pipiens* s.l., auch nördliche Hausmücke genannt, kommt in zwei unterschiedlichen Biotypen vor – als *Cx. pipiens* form *pipiens* und *Cx. pipiens* form *molestus*. Während *Cx. pipiens* f. *pipiens* ornithophil und autogen lebt, ist *Cx. pipiens* f. *molestus* mammolophil und anautogen. Es gibt jedoch auch Hybride dieser Ökoformen, welche als potentielle Überträger von Zoonosen dienen könnten (Zittra et al. 2017b). Der *Culex pipiens*-Komplex ist der wichtigste und häufigste Vertreter krankheitsrelevanter Stechmücken in Europa und Österreich. Verschiedene Arten dieser Gattung können als Vektoren für folgende Erreger dienen: West-Nil-Virus, Sindbis-Virus, Usutu-Virus (USUV), *Trypanosoma* spp., aviäre *Plasmodium* spp. sowie *Dirofilaria repens* (Lebl et al. 2015).

*Aedes albopictus* (Asiatische Tigermücke) und *Ae. japonicus* (Asiatische Buschmücke) sind beides Vertreter der in Europa und Österreich vorkommenden (potentiell) invasiven Arten. Vor allem die asiatische Tigermücke stellt einen ernstzunehmenden Überträger von WNV, Dengue- und Chikungunya-Viren dar (Zittra et al. 2017b, Zittra et al. 2014, Führer et al. 2020). Das Vorkommen abseits ihres Ursprungsortes ist einerseits durch globalen Handel und transkontinentales Reisen von Mensch und Haustier sowie durch den Klimawandel zu erklären (Zittra et al. 2017b).

## 4. Molekulare Analyse

Lange Zeit wurden auf Morphologie basierende Identifikationssysteme für die Artbestimmung genutzt, was allerdings grobe Einschränkungen mit sich bringt. Einige morphologische Charakteristika der Artbestimmung sind beispielsweise nur in einer bestimmten Lebensphase oder bei einem bestimmten Geschlecht differenzierbar, dies führt dazu, dass etliche Individuen nicht identifizierbar sind. Zusätzlich verlangt die morphologische Bestimmung verschiedener Arten höchste Expertise, welche allerdings durch die immer weniger werdenden Taxonomen stetig sinkt – dies resultiert schlussendlich in einer Häufung an falschen Speziesbestimmungen. Um diesen Problemen aus dem Weg zu gehen und auch Kryptospezies identifizieren zu können, wurden verschiedene molekularbiologische Verfahren etabliert (Hebert et al. 2003). Da DNA-basierende Identifikationstechniken nicht abhängig von Morphologie, Geschlecht oder Entwicklungsphase sind, haben sich diese Methoden für die Differenzierung von Arten und vor allem von Kryptospezies bewährt (Collins und Paskewitz 1996).

In diesem Kapitel wird das Vorgehen der Identifizierung von verschiedenen Arten des *An. maculipennis*-Komplexes erläutert.

### 4.1. Sammlung der Stechmücken

Als Proben dienen Stechmücken, die im Rahmen diverser Studien zwischen 2014 und 2019 in Ostösterreich gesammelt wurden. Mithilfe von BG-Sentinel Fallen (Biogents, Deutschland) werden sowohl visuelle als auch olfaktorische (z.B. CO<sub>2</sub>) Reize verwendet, um Stechmücken anzulocken. So werden adulte Weibchen gefangen, von denen jeweils 1-2 Beine für molekulare Analysen genutzt werden (Biogents 2020).

### 4.2. DNA-Extraktion

Für die DNA-Extraktion werden 1-2 Beine der jeweiligen Proben mit zwei Keramikugeln (2.8 mm Precellys Ceramic Beads, VWR, Deutschland) im TissueLyser II (Qiagen, Deutschland) homogenisiert und die DNA anschließend nach Protokoll des Qiagen DNeasy<sup>®</sup> Blood & Tissue Kit (Qiagen, Deutschland) isoliert.

Zu den in beschrifteten Eppendorf Tubes<sup>®</sup> (Eppendorf, Deutschland) befindlichen Proben, werden 180 µl ATL Puffer und 20 µl Proteinase K hinzugegeben. Diese werden anschließend 10-15 Sekunden gevortext und über Nacht bei 56 °C im Thermomixer inkubiert.

Nach vollendeter Inkubation werden die Tubes wieder für 10-15 Sekunden gevortext, bevor 200 µl AL Puffer hinzugefügt und sie nochmal für 10-15 Sekunden gemischt werden. Nachfolgend werden 200 µl 99%iger Ethanol hinzupipettiert und erneut für 10-15 Sekunden gemixt. Der gesamte Inhalt des Tubes wird auf die Membran einer beschrifteten DNeasy® Mini spin column (Qiagen, Deutschland) überführt und anschließend bei 8.000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Das Sammelgefäß wird inklusive dem entstandenen Überstand verworfen und durch ein neues ersetzt. Um die an die Membran gebundene DNA zu waschen, werden zuerst 500 µl AW1 Puffer auf die Säule pipettiert, bei 8.000 rpm für eine Minute zentrifugiert und der Überstand wieder entsorgt. Im Anschluss daran werden 500 µl des AW2 Puffers auf die Säule transferiert und bei 14.000 rpm für drei Minuten zentrifugiert.

Daraufhin wird die an die Säulen gebundene DNA zweimal eluiert, da es sein kann, dass der erste Elutionsschritt in zu viel extrahierter DNA resultiert, was bei der Gelelektrophorese nach der PCR unklare Ergebnisse liefern kann. Die DNeasy® Mini spin column wird in ein beschriftetes Tube gesteckt und mit 100 µl AE Puffer benetzt. Nach einer einminütigen Inkubationszeit werden die Säulen bei 8.000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Diese Schritte werden für die zweite Elution wiederholt und die Säulen anschließend entsorgt. Am Ende erhält man von jeder Probe ein Tube mit dem A-Sample (Ergebnis der ersten Elution) und eines mit dem B-Sample (Ergebnis der zweiten Elution). Die extrahierte DNA wird dann bis zur Durchführung der PCR bei -20 °C gelagert.

#### **4.3. DNA-Barcoding**

Wie bereits erwähnt, ist die morphologische Differenzierung vieler Arten nicht möglich, weshalb erweiterte Methoden zur Artidentifizierung notwendig sind. Ein Beispiel dafür stellt das DNA-Barcoding dar, welches auf der Verwendung von DNA-Sequenzen als Taxon-Barcodes basiert. Dies ist essentiell, um die Fähigkeit der Artunterscheidung aufrechtzuerhalten (Hebert et al. 2003). Das mitochondriale Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit I Gen (mtCOI) ist eines der am höchsten konservierten Gene im mitochondrialen Genom von Tieren, weshalb es gut für die Entwicklung molekularer Techniken für phylogenetische Studien diversester Organismen geeignet ist (Folmer et al. 1994).

Das Hauptaugenmerk von Barcoding liegt darin, eine Datenbank von DNA-Sequenzen zu erstellen, die es ermöglicht, Organismen anhand eines Sequenz-Vergleiches zu identifizieren. Hierbei spielen korrekte und aktuelle Datenbanken eine entscheidende Rolle, da dies die molekulare Analyse von Kryptospezies ermöglichen kann (Führer 2019). BOLD Systems

(Barcode of Life Data Systems) stellt hierfür eine äußerst wichtige Datenbank dar – bis dato beinhaltet sie über 7,5 Millionen Sequenzen von über 300.000 Arten (BOLD, 2020).

Für das Barcoden wird das mtCOI-Gen mittels PCR amplifiziert. Da noch nicht klar ist, welche Primer zum Barcoden des *An. maculipennis*-Komplex am besten geeignet sind, werden verschiedene Primer-Paare ausprobiert.

Die von Folmer et al. (1994) erstellten Primer LCO1490 und HCO2198 (Tab. 1) sowie das dazugehörige PCR-Protokoll (Tab. 2, Tab. 3) werden für die Amplifikation eines ca. 710 bp großen Fragments des mtCOI-Gens bei Metazoa angewendet.

Tab. 1: Primer für die Amplifikation des mtCOI-Gens nach Folmer et al. (1994)

Forward Primer	LCO1490	5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3'
Reverse Primer	HCO2198	5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3'

Tab. 2: Mastermix für die PCR zur Amplifikation des mtCOI-Gens nach Folmer et al. (1994)

Reagens	Menge [µl]	
	1 Reaktion	100 Reaktionen
Wasser	23,875	2.387,5
5x Green GoTaq® Reaction Buffer (Promega, USA)	10	100
LCO1490 (10 µM)	5	500
HCO2198 (10 µM)	5	500
dNTP Mix (25 mM)	1	100
GoTaq® DNA Polymerase (Promega, USA)	0,125	12,5
Template	5	100x5
<b>Gesamt</b>	<b>50</b>	<b>5.000</b>

Tab. 3: Temperaturprofil für die Amplifikation des mtCOI-Gens nach Folmer et al. (1994)

94 °C	2 min	Initiale Denaturierung
94 °C	1 min	40x
45 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	Finale Elongation

Hebert et al. (2004) designten Primer (Tab. 4) für die Amplifikation der mtCOI-Genregion von Insekten und Amphibien. Mit dem Mastermix aus Tabelle 5 und dem Temperaturprofil aus Tabelle 6 kann diese Region von 648 bp amplifiziert werden.

Tab. 4: Primer für die Amplifikation des mtCOI-Gens nach Hebert et al. (2004)

Forward Primer	LepF1	5'-ATT CAA CCA ATC ATA AAG ATA T-3'
Reverse Primer	LepR1	5'-TAA ACT TCT GGA TGT CCA AAA A-3'

Tab. 5: Mastermix für die PCR zur Amplifikation des mtCOI-Gens nach Hebert et al. (2004)

Reagens	Menge [µl]	
	1 Reaktion	100 Reaktionen
Wasser	13,675	1.367,5
5x Green GoTaq® Reaction Buffer (Promega, USA)	5	500
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1	100
LepF1 (10 pmol/µl)	1	100
LepR1 (10 pmol/µl)	1	100
dNTP Mix (25 mM)	0,2	20
GoTaq® DNA Polymerase (Promega, USA)	0,125	12,5
Template	3	100x3
<b>Gesamt</b>	<b>25</b>	<b>2.500</b>

Tab. 6: Temperaturprofil für die Amplifikation des mtCOI-Gens nach Hebert et al. (2004)

94 °C	2 min	Initiale Denaturierung
94 °C	1 min	6x
45 °C	1 min 30 s	
72 °C	1 min 15 s	
94 °C	1 min	36x
51 °C	1 min 30 s	
72 °C	1 min 15 s	
72 °C	5 min	Finale Elongation

Ein von Zittra et al. (2016a) publiziertes Primer-Paar (Tab. 7) ist für die Anwendung bei allen Culicidae und einigen anderen Zweiflüglern geeignet. Der dazugehörige Mastermix (Tab. 8) wird mit dem aus Tabelle 9 zu entnehmenden Temperaturprofil für die Herstellung eines ca. 730 bp langen Amplikons benötigt.

Nach vollendeter PCR werden die PCR-Produkte sequenziert und die Sequenzen den oben genannten Datenbanken hinzugefügt.

Tab. 7: Primer für die Amplifikation des mtCOI-Gens nach Zittra et al. (2016a)

Forward Primer	H15CuliCOIFw	5'-AGC CAT TTA ATC GCG ACA A -3'
Reverse Primer	H15CuliCOIRv	5'-GGA TGT CCA AAA AAT CAA AAT AAA TGT T -3'

Tab. 8: Mastermix für die Amplifikation des mtCOI-Gens nach Zittra et al. (2016a)

Reagens	Menge [µl]	
	1 Reaktion	100 Reaktionen
Wasser	10,675	1.067,5
5x Green GoTaq® Reaction Buffer (Promega, USA)	5	500
H15CuliCOIFw	2	200
H15CuliCOIRv	2	200
dNTP Mix (25 mM)	0,2	20
GoTaq® DNA Polymerase (Promega, USA)	0,125	12,5
Template	5	100x5
<b>Gesamt</b>	<b>25</b>	<b>2.500</b>

Tab. 9: Temperaturprofil für die Amplifikation des mtCOI-Gens nach Zittra et al. (2016a)

95 °C	2 min	Initiale Denaturierung
95 °C	1 min	35x
50 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	Finale Elongation

#### 4.4. Genotypisierung mittels Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird für das Klonieren und Analysieren von DNA-Sequenzen verwendet. Zu Beginn der PCR werden die beiden Stränge der DNA-Vorlage (Template) durch Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen voneinander getrennt. Anschließend kommt es zu einer Anlagerung der Primer an die DNA-Stränge – sie dienen als Beginn der neuen Einzelstränge. Schlussendlich setzt die DNA-Polymerase an den Primern an und verlängert diese, sodass am Ende erneut DNA-Doppelstränge entstehen. Je nach DNA-Sequenz und verwendeten Primern, werden unterschiedliche Reagenzien und Temperaturprofile benötigt (Alberts et al. 2008).

Um einen diagnostischen PCR-Assay für (Krypto-)spezies zu entwickeln, der auf artspezifischen Unterschieden basiert, muss die Struktur und Sequenz einer hypervariablen Genomregion, die allen Arten gemein ist, analysiert werden. Wichtig hierbei ist, dass man die Arten anhand spezifischer DNA-Sequenzen differenzieren kann, auch wenn sie sich nur um ein Basenpaar unterscheiden. Hierfür bietet ribosomale DNA (rDNA) eine gute Möglichkeit – sie ist von den meisten Spezies gut untersucht und beinhaltet hochkonservierte Strukturen und Sequenzen. Ebenso beinhaltet die rDNA gewisse Regionen, die selbst zwischen nahe verwandten Arten hochvariabel sind – diese befinden sich vorrangig in sogenannten Spacer-Sequenzen. All diese Punkte machen ribosomale RNA (rRNA) Gene zu wichtigen Werkzeugen für die phylogenetische Analyse stark abweichender sowie sehr nahe verwandter Taxa (Collins und Paskewitz 1996).

Der „internal transcribed spacer 2“ (ITS2) wird durch das 5,8 S und 28 S rRNA-Gen abgegrenzt. Diese Gene beinhalten Regionen mit sehr konservierten Sequenzen, welche als Basis für die PCR-Primer fungieren können. Die Verwendung der ITS2 Sequenz hat einerseits den Vorteil, dass sie relativ kurz ist und dadurch die Amplifizierung mittels PCR relativ einfach macht, und andererseits variiert jene Sequenz zwischen verschiedenen Arten deutlich mehr als innerhalb einer Art (Collins und Paskewitz 1996).

Jeder diagnostische Assay für die Identifizierung verschiedener Spezies benötigt ein detailliertes Wissen über den Grad an intraspezifischer Variation in Relation zu interspezifischer Varietät. Die Variation von rDNA Spacer-Sequenzen innerhalb von *Anopheles*-Arten hat sich im Vergleich zu interspezifischen Abweichungen als niedrig erwiesen. Deshalb bieten sich ITS2 Sequenzen zur Unterscheidung kryptischer Arten, wie jenen des *An. maculipennis*-Komplexes, an (Collins und Paskewitz 1996).

Um die artspezifischen ITS2 Sequenzen einer Stechmückenart zu erlangen, können die von Porter und Collins (1991), Wesson et al. (1992) und Collins und Paskewitz (1996) beschriebenen Primer ITS2\_5.8F und ITS2\_28R (Tab. 10), die komplementär zu hochkonservierten rDNA Regionen des 5,8 S und 28 S Gens sind, verwendet werden. Die PCR wird anhand des von Kronefeld et al. (2014) nach Proft et al. (1999) modifizierten Protokolls (Tab. 11, Tab. 12) durchgeführt. Die anschließend sequenzierte Nukleotidabfolge des PCR-Produktes kann dann einer Datenbank wie beispielsweise GenBank® (National Center for Biotechnology Information, USA) hinzugefügt werden.

Tab. 10: Primer für die Amplifikation der gesamten ITS2 Sequenz

Forward Primer	ITS2_5.8F	5'-TGT GAA CTG CAG GAC ACA TG-3'
Reverse Primer	ITS2_28R	5'-ATG CTT AAA TTT AGG GGG TA-3'

Tab. 11: Mastermix für die Amplifikation der gesamten ITS2 Sequenz

Reagens	Menge [ $\mu$ l]	
	1 Reaktion	100 Reaktionen
Wasser	9,8	980
2x QuantiTect Multiplex PCR-Kit (Qiagen, Deutschland)	10	1000
ITS2_5.8F (100 $\mu$ M)	0,1	10
ITS2_28R (100 $\mu$ M)	0,1	10
Template	5	100x5
<b>Gesamt</b>	<b>25</b>	<b>2.500</b>

Tab. 12: Temperaturprofil für die PCR Amplifikation der gesamten ITS2 Sequenz

95 °C	15 min	Initiale Denaturierung
95 °C	30 s	35x
53 °C	30 s	
72 °C	60 s	
72 °C	10 min	Finale Elongation

Damit nicht jede Probe einzeln sequenziert und anschließend mit Datenbanken verglichen werden muss, kann man anhand der bekannten ITS2 Sequenzen speziesspezifische Reverse-Primer (Tab. 13) erstellen (Proft et al. 1999, Kronefeld et al. 2014, Blažejová et al. 2018) und mit ihnen eine multiplex PCR designen. Der Mastermix für die multiplex PCR (Tab. 14) wurde von Kronefeld et al. (2014) nach Proft et al. (1999) modifiziert und das Temperaturprofil (Tab. 15) von Blažejová et al. (2018) optimiert. Die Artdifferenzierung wird durch diese Methodik deutlich vereinfacht und beschleunigt (Collins und Paskewitz 1996, Proft et al. 1999).

Tab. 13: Universaler Forward-Primer und speziesspezifische Reverse-Primer für die multiplex PCR

Forward Primer	5.8-UN_For (Complex universal)	5'-TGT GAA CTG CAG GAC ACA TG-3'
Reverse Primer	An. mac_Rev ( <i>An. maculipennis</i> s.s.)	5'-TTA TTT GAG GCC CAT GGG CTA-3'
	An. atop_Rev ( <i>An. atoparvus</i> )	5'-CGT TTG GCT TGG GTT ATG A-3'
	An. sachar_Rev ( <i>An. sacharovi</i> )	5'-CAA GAG ATG GAT GTT TTA CG-3'
	An. melan_Rev ( <i>An. melanoon</i> )	5'-TGC AAG TTG AAA CCT GGG GC-3'
	An. labra_Rev ( <i>An. labbranchiae</i> )	5'-GTA TCT CTG CTG CTA TGG TC-3'
	An. daciae_Rev ( <i>An. daciae</i> )	5'-CTT TCA ATG CAA GAA ATG GAT-3'

Tab. 14: Mastermix für die multiplex PCR zum Nachweis von Arten des *Anopheles maculipennis*-Komplexes

Reagens	Menge [ $\mu$ l]	
	1 Reaktion	100 Reaktionen
Wasser	33,2	3.320
5x GoTaq <sup>®</sup> Flexi Buffer (Promega, USA)	10	1.000
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3	300
GoTaq <sup>®</sup> Flexi DNA Polymerase (Promega, USA)	0,25	25
dNTP (25 mM)	0,2	20
5.8-UN_For (100 $\mu$ M)	0,3	30
An. mac_Rev (100 $\mu$ M)	0,15	15
An. atrop_Rev (100 $\mu$ M)	0,15	15
An. sachar_Rev (100 $\mu$ M)	0,15	15
An. melan_Rev (100 $\mu$ M)	0,15	15
An. labra_Rev (100 $\mu$ M)	0,15	15
An. daciae_Rev (100 $\mu$ M)	0,3	30
Template	2	100x2
<b>Gesamt</b>	<b>50</b>	<b>5.000</b>

Tab. 15: Temperaturprofil für die multiplex PCR

95 °C	15 min	Initiale Denaturierung
95 °C	30 s	35x
58 °C	30 s	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	Finale Elongation

#### **4.5. Gelelektrophorese**

Für die Überprüfung der PCR Produkte mittels Gelelektrophorese wird ein 2%iges Agarosegel hergestellt. Hierfür werden 2,7 g Agarosepulver mit 100 ml 1x Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE) und 35 ml Reinstwasser in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Sobald das Gemisch auf circa 60 °C abgekühlt ist, können 4,2 µl Midori Green Advance DNA Stain (Nippon Genetics Europe GmbH, Deutschland) dazugegeben und in einen Gelträger mit Kämmen gegossen werden – nach Aushärtung des Gels werden die Kämmen entfernt. Anschließend wird der Gelträger inklusive Gel eine Gelelektrophorese Kammer mit TBE-Puffer positioniert und die Taschen mit 10 µl der PCR-Produkte beladen. Die Ladder wird aus 3 µl 100 bp DNA Ladder (Promega, USA), 3 µl Blue/Orange 6x loading dye (Promega, USA) und 9 µl nukleasefreiem Wasser gemischt. Anschließend wird das Gel bei 120 Volt für mindestens 45 Minuten laufen gelassen. Die Banden können mittels einer ultravioletten Lampe sichtbar gemacht werden.

## 5. Diskussion

Einen der größten Rollen als Überträger von vektor-übertragenen Krankheitserregern spielen Stechmücken. Sie sind Vektoren verschiedenster Erreger, inklusive WNV, Dengue-Virus, Chikungunya-Virus, *Dirofilaria* spp., diversen *Trypanosoma* spp., *Plasmodium* spp. und vielen mehr. Weltweit infizieren sich etwa eine Milliarde Menschen pro Jahr mit derartigen Krankheiten und Millionen sterben an ihren Folgen (Zittra 2017a). Doch die diversen Pathogene werden nur von ganz bestimmten kompetenten Arten von Mücken übertragen.

Culicidae bestehen aus verschiedenen Gattungen, von denen einige sogenannte Artenkomplexe enthalten. Diese Artenkomplexe bestehen aus Kryptospezies, das bedeutet, dass sie morphologisch kaum bis nicht differenzierbar sind, sich allerdings in ihrer Genetik unterscheiden. Jedoch variieren innerhalb jener Komplexe beispielsweise die bevorzugten Wirts- und Habitatspräferenzen stark, weshalb sie schlussendlich auch unterschiedliche Vektorkompetenzen aufweisen. Aus diesem Grund ist es wichtig, präzise und vergleichbare Methoden zu entwickeln, die die Artdifferenzierung auch zwischen nahe verwandten Spezies ermöglichen (Collins und Paskewitz 1996).

Das Barcoding von Tieren mittels mitochondrialer Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit I zählt zu einer dieser Techniken. Hier werden hochkonservierte mitochondriale DNA-Regionen genutzt, um von jedem Tier denselben DNA-Bereich zu sequenzieren und so eine einfachere Möglichkeit zur Artidentifizierung zu bieten. Für die Unterscheidung der *Culex pipiens*- und *Anopheles maculipennis*-Artkomplexe funktioniert laut Zittra et al. (2016b) das Protokoll nach Folmer et al. (1994) nicht einwandfrei, weshalb noch andere Protokolle ausprobiert werden müssen. Eine zweite Methode, die es ermöglicht, selbst Kryptospezies zu unterscheiden, ist das Genotypisieren anhand hochkonservierter rDNA Gene und hochvariabler Spacer-Sequenzen. Die Verwendung von ITS2 Sequenzen zur Speziesbestimmung ist schon lange gängig und hat sich bei Proft et al. (1999), Kronefeld et al. (2014) und Blažejová et al. (2018) als gut funktionierend erwiesen.

Aufgrund der aktuellen Lage bezüglich COVID-19 und den von der Regierung auferlegten Ausgangssperren, war es mir leider nicht möglich, praktische Arbeiten im Labor selbst durchzuführen und meine eigenen Ergebnisse hinsichtlich Barcoding und Genotypisierung vorzulegen. Daher kann ich nur aus vorangegangenen Studien aus Österreich sowie österreichischen Nachbarländern auf die Artenpopulation des *An. maculipennis*-Komplexes in Österreich schließen.

Eine Studie von Lühken et al. (2016) kam zu dem Ergebnis, dass die Arten *An. maculipennis* s.s., *An. atroparvus* und *An. messeae* in Deutschland heimische Spezies des *An. maculipennis*-Komplexes darstellen, weshalb man davon ausgeht, dass ebendiese Arten auch in Österreich zu finden sind. In Deutschland wurden in einer Studie von 2016 (Czajka et al. 2020) dieselben Arten und zusätzlich *An. daciae* gesammelt und analysiert – man kann also darauf schließen, dass auch einige Populationen von *An. daciae* in Österreich vorkommen.

Di Luca et al. (2009) führten eine zweijährige entomologische Studie in Italien durch – hier wurden in vier verschiedenen Regionen Mücken gesammelt und mittels multiplex PCR nach Proft et al. (1999) genotypisiert. An einem der Standorte, der sich in der Provinz von Siena befindet und ähnliche landschaftliche Eigenschaften wie Österreich aufweist, wurden nur wenige Individuen der Art *An. labranchiae* registriert – dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese Spezies auch in Österreich kaum bis gar nicht vorkommt. Zusätzlich wurden nur an zwei der vier Standorte einige wenige Stechmücken der Art *An. melanoon* detektiert (Di Luca et al. 2009). Die Wahrscheinlichkeit, dass diese Spezies in Österreich aufzufinden ist, ist also ebenso sehr gering.

Bei einer Untersuchung der Verteilung von ehemaligen Malaria-übertragenden Stechmückenarten in Europa konnte man das Vorkommen von *An. sacharovi* entlang der Küste des Schwarzen Meeres, der Ägäis sowie der Ostküste des Adriatischen Meeres beobachten, jedoch nicht in Binnenländern oder abseits der Küstenregion (Kuhn et al. 2002). Man kann also davon ausgehen, dass es in Österreich unwahrscheinlich ist, Populationen dieser Art zu registrieren.

In Europa kommen noch einige andere Arten des *An. maculipennis*-Komplexes vor, allerdings in Ländern, deren Klima und Landschaft sich deutlich von jenen in Österreich unterscheidet und die keine Nachbarländer darstellen. Auf Grund dessen ist die Wahrscheinlichkeit, eine solche Art hierzulande nachzuweisen, sehr gering.

Bei den oben getätigten Äußerungen handelt es sich um reine Hypothesen – akkurate Aussagen über die tatsächlichen Artbestände in Österreich sind nur mittels molekularbiologischer Bearbeitung gesammelter Proben und der Auswertung ihrer Ergebnisse zu tätigen.

## 6. Zusammenfassung

Weltweit stellen Stechmücken wichtige Krankheitsüberträger dar, die es zu studieren und zu beobachten gilt. Der *Culex pipiens*-Komplex zählt zu den relevantesten und häufigsten Vertretern von als Vektoren diverser Krankheitserreger relevanten Stechmücken in Europa und Österreich, aber auch Spezies des *Anopheles maculipennis*-Komplexes sind besonders bedeutsam, da sie Überträger der humanen Malariaerreger sein können. Damit man das Risiko, mit dem man mit einem Pathogen in Berührung kommt, abschätzen kann, ist es wichtig zu wissen, welche Vektoren in Österreich auftreten.

Die genaue Spezies von Stechmücken zu identifizieren ist daher von großer Relevanz. Für diese Speziesbestimmung finden verschiedene Techniken Verwendung. In dieser Arbeit werden verschiedene Möglichkeiten des Barcodings mittels der mitochondrialen DNA des Cytochrom-Oxidase Untereinheit I Gens und die Genotypisierung mittels Spacer-Sequenzen behandelt. Dies eignet sich sowohl für entfernte als auch für nahe verwandte Spezies.

Aufgrund der Einschränkungen durch COVID-19 war es leider nicht möglich, die bereits gesammelten Stechmückenproben zu untersuchen, weshalb ich nur Hypothesen über das Vorhandensein von Arten des *Anopheles maculipennis*-Komplexes in Österreich aufstellen kann. Aufgrund ihres Vorkommens in Nachbarländern, kann man davon ausgehen, dass die Arten *An. maculipennis* s.s., *An. atroparvus*, *An. messeae* und *An. daciae* auch in Österreich heimisch sind.

## 7. Summary

Worldwide, mosquitoes are one of the most important disease vectors that need to be studied and observed. The *Culex pipiens* complex is one of the most relevant and most common representatives of disease-related mosquitoes in Europe and Austria, but species of the *Anopheles maculipennis* complex are also particularly important because they can be vectors of human malaria parasites. In order to estimate the risk of being exposed to a pathogen, it is important to know which vectors occur in Austria.

Identifying the exact species of mosquitoes is particularly important because of its disease-transmitting properties. Various methodologies are used for this species determination. In this thesis, different variations of barcoding using the mitochondrial DNA of the cytochrome oxidase subunit I gene and genotyping using spacer sequences are being discussed. This is suitable for both distant and closely related species.

Due to the limitations regarding COVID-19, it was unfortunately not possible to examine the mosquito samples that had already been collected, which is why I can only make assumptions about the presence of species of the *An. maculipennis* complex in Austria. Due to their occurrence in neighboring countries, it can be assumed that the species *An. maculipennis s.s.*, *An. atroparvus*, *An. messeae* and *An. daciae* are also indigenous to Austria.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

Ae.	Gattung <i>Aedes</i>
An.	Gattung <i>Anopheles</i>
bp	Basenpaare
Cs.	Gattung <i>Culiseta</i>
Cq.	Gattung <i>Coquillettidia</i>
Cx.	Gattung <i>Culex</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
f.	form
ITS	Internal transcribed spacer
min	Minute
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
µl	Mikroliter
mM	Millimolar
µM	Mikromolar
mtCOI	mitochondriale Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit I
pmol/µl	Pikomolar/Mikroliter
rDNA	ribosomale DNA
rRNA	ribosomale RNA
rpm	Rounds per minute
s	Sekunde
s.l.	sensu lato
sp./spp.	Spezies (Singular/Plural)
s.s.	sensu stricto
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride
u/µl	Unit/Mikroliter
USUV	Usutu-Virus
WNV	West-Nil-Virus

V

Volt

## 9. Literaturverzeichnis

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. 2015. Molecular Biology of The Cell. Sechste Auflage. New York: Garland Science, Taylor and Francis Group, 473

Becker N, Petric D, Zgomba M, Boase C, Madon MB, Dahl C, Kaiser A. 2010. Mosquitoes and their control. Zweite Auflage. London: Springer-Verlag, 9-10 & 16-25

Biogents. <https://eu.biogents.com/bg-sentinel/> (Zugriff 13.07.2020)

Blažejová H, Šebesta O, Rettich F, Mendel J, Čabanová V, Miterpáková M, Betášová L, Peško J, Hubálek Z, Kampen H, Rudolf I. 2018. Cryptic species *Anopheles daciae* (Diptera: Culicidae) found in the Czech Republic and Slovakia. Parasitol Res. 117(1):315-321. DOI: 10.1007/s00436-017-5670-0

BOLD. [https://www.boldsystems.org/index.php/IDS\\_OpenIdEngine](https://www.boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine) (Zugriff 12.07.2020)

Collins FH, Paskewitz SM. 1996. A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. Insect Mol Biol. 5(1):1-9.

DOI: 10.1111/j.1365-2583.1996.tb00034.x

Czajka C, Weitzel T, Kaiser A, Pfitzner WP, Becker N. 2020. Species composition, geographical distribution and seasonal abundance of the *Anopheles maculipennis* complex along the Upper Rhine, Germany. Parasitol Res. 119(1):75-84.

DOI: 10.1007/s00436-019-06551-z

Dettner K, Peters W. 2010. Lehrbuch der Entomologie, Zweite Auflage. Heidelberg: Springer Spektrum.

Di Luca M, Boccolini D, Severini F, Toma L, Barbieri FM, Massa A, Romi R. 2009. A 2-year entomological study of potential malaria vectors in central Italy. Vector Borne Zoonotic Dis. 9(6):703-711. DOI: 10.1089/vbz.2008.0129

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol Mar Biol Biotechnol. 3(5):294-299.

Führer HP. 2019. Mosquitoes and mosquito-borne parasitic diseases: distribution, ecology and molecular diagnosis of alien and neglected indigenous species in Austria [Habilitationarbeit]. Wien: Veterinärmedizinische Universität Wien.

Führer HP, Schöner E, Weiler S, Barogh BS, Zित्रा C, Walder G. 2020. Monitoring of alien mosquitoes in Western Austria (Tyrol, Austria, 2018). PLoS Negl Trop Dis. 14(6):e0008433. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008433

Harbach RE. 2013. Mosquito Taxonomic Inventory, <http://mosquito-taxonomicinventory.info/>, (Zugriff 09.07.2020)

Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proc Biol Sci. 270(1512):313-321. DOI: 10.1098/rspb.2002.2218

Kuhn KG, Campbell-Lendrum DH, Davies CR. 2002. A continental risk map for malaria mosquito (Diptera: Culicidae) vectors in Europe. J Med Entomol. 39(4):621-630. DOI: 10.1603/0022-2585-39.4.621

Lebl K, Nischler EM, Walter M, Brugger K, Rubel F. 2013. First record of the disease vector *Anopheles hyrcanus* in Austria. J Am Mosq Control Assoc. 29(1):59-60. DOI: 10.2987/12-6282.1

Lühken R, Czajka C, Steinke S, Jöst H, Schmidt-Chansit J, Pfitzner W, et al. 2016. Distribution of individual members of the mosquito *Anopheles maculipennis* complex in Germany identified by newly developed real-time PCR assays. Med Vet Entomol. 30:144-154. DOI: 10.1111/mve.12161

Porter CH, Collins FH. 1991. Species-diagnostic differences in a ribosomal DNA internal transcribed spacer from the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi* (Diptera: Culicidae). Am J Trop Med Hyg. 45(2):271-279. DOI: 10.4269/ajtmh.1991.45.271

Proft J, Maier WA, Kampen H. 1999. Identification of six sibling species of the *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) by a polymerase chain reaction assay. Parasitol Res. 85(10):837-843. DOI: 10.1007/s004360050642

Schoener E, Uebleis SS, Cuk C, Nawratil M, Obwaller AG, Zechmeister T, Lebl K, Rádová J, Zित्रा C, Votýpka J, Fuehrer HP. 2018. Trypanosomatid parasites in Austrian mosquitoes. PLoS One. 13(4):e0196052. DOI: 10.1371/journal.pone.0196052

- Seidel B, Hufnagl P, Indra A, Allerberger F. 2013. First record of *Anopheles hyrcanus* (Pallas, 1771) for Austria (Diptera: Culicidae). *Entomologische Zeitschrift* 125: 39-41.
- Silbermayr K, Eigner B, Joachim A, Duscher GG, Seidel B, Allerberger F, Indra A, Hufnagl P, Führer HP. 2014. Autochthonous *Dirofilaria repens* in Austria. *Parasit Vectors*. 7:226. DOI: 10.1186/1756-3305-7-226
- Wesson DM, Porter CH, Collins FH. 1992. Sequence and secondary structure comparisons of ITS rDNA in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Mol Phylogenet Evol*. 1(4):253-269. DOI: 10.1016/1055-7903(92)90001-w
- Zittra C, Joachim A, Führer HP. 2014. Stechmücken und Dirofilarien in Österreich. *Tierärztliche Umschau* 70: 000-000
- Zittra C, Flechl E, Kothmayer M, Vitecek S, Rossiter H, Zechmeister T, Führer HP. 2016a. Ecological characterization and molecular differentiation of *Culex pipiens* complex taxa and *Culex torrentium* in eastern Austria. *Parasit Vectors*. 9:197. DOI: 10.1186/s13071-016-1495-4
- Zittra C, Flechl E, Lebl K, Obwaller AG, Zechmeister T, Waringer J, Fuehrer HP. 2016b. DNA-Barcoding der österreichischen Culiciden (Insecta: Diptera) – Challenge für Taxonomie und Molekularbiologie. *Acta ZooBot Austria*. 153: 173-175
- Zittra C. 2017a. Mosquito Fauna in Eastern Austria With The Main Focus On Invasive Species – Molecular Phylogeny, Prevalence and Ecology [Dissertation]. Wien: Veterinärmedizinische Universität Wien
- Zittra C, Car M, Lechthaler W, Mohrig W. 2017b. Diptera: Culicidae. In Moog, O. & A. Hartmann (Eds.): *Fauna Aquatica Austriaca*, 3. Edition. BMLFUW, Wien.

## 10. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Vereinfachter Überblick über die systematische Klassifizierung von Stechmücken .....	2
--	---

## 11. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Primer für die Amplifikation des mtCOI-Gens nach Folmer et al. (1994) .....	9
Tab. 2: Mastermix für die PCR zur Amplifikation des mtCOI-Gens nach Folmer et al. (1994) .....	9
Tab. 3: Temperaturprofil für die Amplifikation des mtCOI-Gens nach Folmer et al. (1994) .....	10
Tab. 4: Primer für die Amplifikation des mtCOI-Gens nach Hebert et al. (2004) .....	10
Tab. 5: Mastermix für die PCR zur Amplifikation des mtCOI-Gens nach Hebert et al. (2004).....	10
Tab. 6: Temperaturprofil für die Amplifikation des mtCOI-Gens nach Hebert et al. (2004) .....	11
Tab. 7: Primer für die Amplifikation des mtCOI-Gens nach Zित्रa et al. (2016a).....	11
Tab. 8: Mastermix für die Amplifikation des mtCOI-Gens nach Zित्रa et al. (2016a) .....	12
Tab. 9: Temperaturprofil für die Amplifikation des mtCOI-Gens nach Zित्रa et al. (2016a) .....	12
Tab. 10: Primer für die Amplifikation der gesamten ITS2 Sequenz .....	14
Tab. 11: Mastermix für die Amplifikation der gesamten ITS2 Sequenz .....	14
Tab. 12: Temperaturprofil für die PCR Amplifikation der gesamten ITS2 Sequenz.....	14
Tab. 13: Universaler Forward-Primer und speziesspezifische Reverse-Primer für die multiplex PCR .....	15
Tab. 14: Mastermix für die multiplex PCR zum Nachweis von Arten des Anopheles maculipennis-Komplexes...	16
Tab. 15: Temperaturprofil für die multiplex PCR .....	16

## **12. Danksagung**

Abschließend möchte ich mich herzlichst bei meinem Betreuer Dr. Hans-Peter Führer dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, an diesem Thema zu arbeiten. Ebenfalls ein großes Dankeschön dafür, dass man ihm jederzeit Fragen stellen konnte und diese immer wahnsinnig schnell beantwortet wurden. Er hat sich in diesen herausfordernden Zeiten hinsichtlich COVID-19 auch sehr darum bemüht, mir alle nötigen Informationen und Planänderungen zukommen zu lassen.

Außerdem möchte ich mich bei seiner Mitarbeiterin Bita Shahi Barogh vielmals für ihre Unterstützung und ihre ebenso raschen Antworten bedanken.

Die beiden sorgten für ein sehr angenehmes Klima im Institut und haben stets darauf geachtet, dass man sich wohlfühlt.

Ebenso danke ich meiner Familie, vor allem meiner Schwester und Mama, Doris Fasching und im Speziellen meinem Freund Ben für die seelische Unterstützung und Motivation, die sie mir in diesen stressigen und herausfordernden Zeiten geboten haben.