© Zool.-Bot. Ges. Österreich, Austria; download unter www.zobodat.at

Acta ZooBot Austria **153**, 2016, 173–175

DNA-Barcoding der österreichischen Culiciden (Insecta: Diptera) – Challenge für Taxonomie und Molekularbiologie

Carina Zittra, Eva Flechl, Karin Lebl, Adelheid G. Obwaller, Thomas Zechmeister, Johann Waringer & Hans-Peter Fuehrer

Stechmücken gehören zu den bedeutendsten Überträgern einer Vielzahl von Pathogenen wie beispielsweise Flaviviren (z. B. West Nil Virus, Dengue und Gelbfieber), Protozoen (z. B. *Plasmodium* spp.) und filaroiden Helminthen (z. B. *Dirofilaria repens*, *D. immitis*). Für ein besseres Verständnis der Vektor-Pathogen Dynamik ist ein detailliertes Wissen über die Ökologie der Stechmücken notwendig, insbesondere über deren räumliche und zeitliche Verteilung. Die Basis hierfür liefert eine vollständige Erfassung des Arteninventars. Da unterschiedliche Arten unterschiedliche Wirte bevorzugen und dadurch eine unterschiedliche Vektorkompetenz aufweisen können, ist die taxonomische Bestimmung auf Artniveau ausschlaggebend. Einzelne Arten und Artkomplexe die morphologisch keine eindeutigen Unterschiede aufweisen sind bisher meist außer Acht gelassen worden.

Das Ziel unserer Studie ist, eine aktuelle Artenliste mit dazugehörigen DNA-Barcodes zu erstellen, um einerseits die taxonomische Auflösung zu verbessern und andererseits eine Vergleichsdatenbank von Sequenzen des *Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit I* Gens aller in Österreich nachgewiesenen Stechmückenarten anzulegen.

Hierfür wurden von April bis Oktober 2014 und 2015 ca. 30 Standorte in Ost-Österreich mit speziellen mit Kohlendioxid als Lockstoff ausgestatteten Stechmückenfallen kontinuierlich beprobt. Innerhalb dieser Sammelperiode wurden mehr als 29.000 weibliche Stechmücken gesammelt, die 31 Arten zugehören. Wenn möglich, wurden zumindest vier Individuen jeder Art die sämtliche art-spezifischen morphologischen Bestimmungsmerkmale darstellten fotografisch dokumentiert. Anschließend wurden entweder die Kopfkapsel oder drei Beine jeder einzelnen Stechmücke für die DNA Extraktion herangezogen (Werblow et al. 2016). Zu jeder Probe wurde entweder eine 2,8 mm oder drei 1,4 mm Keramikkügelchen (Precellys Ceramic Kit 2.8 mm/1.4 mm, Peqlab, Erlangen, Deutschland) hinzugegeben. Im Anschluss an die Homogenisierung mit einem TyssueLyser II (Qiagen, Hilden, Deutschland) wurde die DNA unter Verwendung des „DNeasy Blood and Tissue" Kits nach Herstellerprotokoll extrahiert (Qiagen, Hilden, Deutschland). Mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden spezifische Primer für eine Amplifizierung eines 667 bp langen Stückes des mitochondrialen *Cytochrome-c-Oxidase Untereinheit 1* Gens (*COI),* innerhalb der BOLD-Barcode Region (Folmer et al. 2004) verwendet (Zittra et al. 2016).

Mittlerweile wurden 154 Individuen, zugehörig zu 31 von 47 in Österreich bisher nachgewiesenen Arten, analysiert. Unsere vorläufigen Ergebnisse weisen auf den Nutzen des DNA-Barcodings zur Artbestimmung hin, ermöglichen jedoch nicht die Trennung von morphologisch kryptischen Artkomplexen. Um Artkomplexe, wie die von *Culex pipiens* und *Anopheles maculipennis*, genauer zu differenzieren, müssen zusätzliche Gene analysiert werden.

Zittra C., Flechl E., Lebl K., Obwaller A.G, Zechmeister T., Waringer J. & Fuehrer H.-P., 2016: DNA Barcoding of Austrian Culicidae (Insecta: Diptera) – A challenge for taxonomy and molecular analysis.

Mosquitoes are among the most important vectors for a variety of pathogens including flaviviruses (e.g. West Nile Virus, Dengue Fever and Yellow Fewer), protozoan parasites (e.g. *Plasmodium* spp.) and filarioid helminths (eg. *Dirofilaria repens, D. immitis*). To understand vector-pathogen dynamics in Austria, detailed information of mosquito species ecology and temporospatial distribution of mosquito communities is essential. For this, a comprehensive mosquito species inventory represents crucial basic data. Additionally, adequate mosquito species determination is highly important as host selectivity and vector capacities differ between species. At present, several taxonomically

© Zool.-Bot. Ges. Österreich, Austria; download unter www.zobodat.at

challenging cryptic taxa seem to have been neglected and disregarded, in particular morphologically highly similar species or members of species-complexes. In this study we aim to establish a valid species inventory of Austrian mosquitoes using molecular methods, such as DNA barcoding that might enhance taxonomic resolution, and further provide an informative database of *cytochrome c oxidase subunit I* gene sequences of each mosquito species reported from Austria.
Almost 30 sampling sites were monitored continuously from April to October 2014 and 2015 using carbon dioxide baited traps distributed across Eastern Austria. Within these sampling periods more than 29,000 female mosquitoes were sampled, comprising 31 species. Whenever possible, at least four individuals of good condition (with easy visible determination characters) of each detected species were used for photographic documentation. Afterwards three legs or the head capsule of a single mosquito was used for DNA extraction (Werblow et al. 2015). A 2.8 mm or three 1.4 mm Ceramic Bead (Precellys Ceramic Kit 2.8 mm/1.4 mm, Peqlab, Erlangen, Germany) were added to each mosquito sample. After homogenization with a TyssueLyser II (Qiagen, Hilden, Germany), DNA was extracted using the DNeasy blood and tissue isolation kit according to the manufacturer's protocol (Qiagen, Hilden, Germany). Subsequently, conventional polymerase chain reaction (PCR), targeting an approximately 667 bp fragment of the mitochondrial *cytochrome* c *oxidase subunit I* gene (*COI*) within the BOLD-barcode region was performed as reported previously (Folmer et al. 2004, Zittra et al. 2016).
Currently, 154 individuals comprising 31 of 47 species reported from Austria were sequenced. Our preliminary results indicate reliability of DNA barcoding as a tool to improve and support the identification of most mosquito species, but this method fails to resolve species complexes like *Culex pipiens* complex and *Anopheles maculipennis* complex taxa. In these cases other molecular loci should be used additionally.
This research was funded by the ERA-Net BiodivERsA, with the national funders FWF I-1437, ANR-13-EBID-0007-01 and DFG BiodivERsA KL 2087/6-1 as part of the 2012-13 BiodivERsA call for research proposals.

Keywords: Stechmücken, Cytochrome-c-Oxidase Untereinkeit I, Artkomplexe, Ost-Österreich.

Literatur

Werblow A., Flechl E., Klimpel S., Zittra C., Lebl K., Kieser K., Laciny A., Silbermayr K., Melaun C. & Fuehrer H.-P., 2016: Direct PCR of indigenous and invasive mosquito species: a time- and cost-effective technique of mosquito barcoding. Med. Vet. Entomol. 30, 8–13.

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, 294–299.

Zittra C., Flechl E., Kothmayer M., Vitecek S., Rossiter H., Zechmeister T. & Fuehrer H.-P., 2016: Ecological characterization and molecular differentiation of *Culex pipiens* complex taxa and *Culex torrentium* in eastern Austria. Parasit. Vectors. 9, 197.

Anschriften:

Mag. rer. nat. Carina Zittra, Institut für Parasitologie, Department für Pathobiologie, Veterinärmedizinische Universität Wien, Veterinärplatz 1, A-1210 Wien.
E-Mail: carina.zittra@vetmeduni.ac.at

Eva Flechl, BSc, MSc, Institut für Parasitiologie, Department für Pathobiologie, Veterinärmedizinische Universität Wien, Veterinärplatz 1, A-1210 Wien.
E-Mail: eva.flechl@ist.ac.at

© Zool.-Bot. Ges. Österreich, Austria; download unter www.zobodat.at

Dr. Karin Lebl, Institut für Öffentliches Veterinärwesen, Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin, Veterinärmedizinische Universität Wien, Veterinärplatz 1, A-1210 Wien. E-Mail: k.lebl@gmx.at

Mag. Adelheid Obwaller, Bundesministerium für Landesverteidigung und Sport, Roßauer Lände 1, A-1090 Wien. E-Mail: adelheid.obwaller@bmlvs.gv.at

Dr. Thomas Zechmeister, Biologische Station Neusiedler See, A-7142 Illmitz.
E-mail: thomas.zechmeister@bgld.gv.at

Ao. Univ.-Prof. Dr. Johann Waringer, Department für Limnologie und Bio-Ozeanographie, Universität Wien, Althanstraße 14, A-1090 Wien.
E-mail: johann.waringer@univie.ac.at

Mag. Dr. Hans-Peter Fuehrer, Institut für Parasitologie, Department für Pathobiologie, Veterinärmedizinische Universität Wien, Veterinärplatz 1, A-1210 Wien.
E-Mail: hans-peter.fuehrer@vetmeduni.ac.at

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Verhandlungen der Zoologisch-Botanischen Gesellschaft in Wien. Frueher: Verh.des Zoologisch-Botanischen Vereins in Wien. seit 2014 "Acta ZooBot Austria"

Jahr/Year: 2016

Band/Volume: 153

Autor(en)/Author(s): Zittra Carina, Flechl Eva, Lebl Karin, Obwaller Adelheid G., Zechmeister Thomas C., Waringer Johann, Fuehrer Hans-Peter

Artikel/Article: DNA-Barcoding der österreichischen Culiciden (Insecta: Diptera) - Challenge für Taxonomie und Molekularbiologie 173-175