



**Genetische Charakterisierung und Verbreitung von
Stechmücken (Diptera: Culicidae) in Deutschland: Träger
humanpathogener Krankheitserreger**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften
der Goethe Universität in Frankfurt am Main

von

Antje Werblow

aus Berlin

Frankfurt am Main 2015

(D30)

vom Fachbereich Biowissenschaften
der Goethe Universität als Dissertation angenommen.

Dekanin: Prof. Dr. Meike Piepenbring

Gutachter: Prof. Dr. Sven Klimpel
Prof. Dr. Jörg Oehlmann

Datum der Disputation: 17.09.2015

Für meine Familie

Vorwort

Die vorliegende Dissertation wurde im Rahmen des von der Leibniz-Gemeinschaft geförderten Projektes „Vorkommen und Vektorkompetenz von Stechmücken als Überträger von Arboviren in Deutschland“ angefertigt, wobei die Arbeit publikationsbasierend (kumulativ) bearbeitet wurde. Alle vier für die Promotion relevanten (ISI-) Veröffentlichungen wurden von mir sowie in Kollaboration angefertigt und in Fachzeitschriften veröffentlicht. Die darin behandelten Themenkomplexe werden in der vorliegenden Arbeit zunächst separat dargestellt und anschließend in einem übergeordneten Kontext erläutert und diskutiert. Die Publikationen sind mit römischen Ziffern nummeriert (s.u.) und dienen an den entsprechenden Stellen als Querverweise.

Promotionsrelevante Publikationen in chronologischer Reihenfolge:

- I. **Werblow A**, Bolius S, Dorresteijn WC, Melaun C, Klimpel S (2013) Diversity of *Culex torrentium* Martini, 1925 – a potential vector of arboviruses and filaria in Europe. Parasitology Research 112: 2495-2501.
- II. **Werblow A**, Klimpel S, Bolius S, Dorresteijn WC, Sauer J, Melaun C (2014) Population structure and distribution patterns of the sibling mosquito species *Culex pipiens* and *Culex torrentium* (Diptera: Culicidae) reveal different evolutionary paths. PLoS One 9: e102158.
- III. Melaun C, **Werblow A**, Cunze S, Zotzmann S, Koch LK, Mehlhorn H, Dörge DD, Huber K, Tackenberg O, Klimpel S (2015) Modelling of the putative distribution of the arbovirus vector *Ochlerotatus japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae) in Germany. Parasitology Research 114: 1051-1061.
- IV. **Werblow A**, Flechl E, Klimpel S, Zित्रa C, Lebl K, Kieser K, Laciny A, Silbermayr K, Melaun C, Führer H-P (2015) Direct PCR of indigenous and invasive mosquito species: a time and cost effective technique of mosquito barcoding. Medical and Veterinary Entomology (accepted).

Die jeweils relevanten Originaltexte sind dem Anhang unter Punkt 2 zu entnehmen. In der Arbeit zitierte Quellen sind in alphabetischer Reihenfolge im Literaturverzeichnis aufgelistet.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	V
Einführung	1
1 Einleitung	4
1.1 Taxonomische Einordnung von Culicidae (Stechmücken)	6
1.2 Morphologie	6
1.3 Lebenszyklus	11
1.4 Ernährung und Wirtssuche	14
1.5 Stechmücken als Krankheitserreger (medizinische Relevanz)	17
1.6 Invasive Stechmückenarten	19
1.7 Artdiagnostik	22
1.8 Stechmückenforschung in Deutschland	24
1.9 Zielsetzung der Arbeit	25
2 Ergebnisse	26
2.1 Werblow A, Bolius S, Dorresteijn AWC, Melaun C, Klimpel S (2013) Diversity of <i>Culex torrentium</i> Martini, 1925 – a potential vector of arboviruses and filaria in Europe. Parasitology Research 112 (7): 2495-2501	26
2.1.1 Zusammenfassung	26
2.2 Werblow A, Klimpel S, Bolius S, Dorresteijn WC, Sauer J, Melaun C (2014) Population structure and distribution patterns of the sibling mosquito species <i>Culex pipiens</i> and <i>Culex torrentium</i> (Diptera: Culicidae) reveal different evolutionary paths. PLoS One 9: e102158	28
2.2.1 Zusammenfassung	28
2.3 Melaun C, Werblow A, Cunze S, Zotzmann S, Koch LK, Mehlhorn H, Dörge DD, Huber K, Tackenberg O, Klimpel S (2015) Modelling of the putative distribution	

of the arbovirus vector <i>Ochlerotatus japonicus japonicus</i> (Diptera: Culicidae) in Germany. Parasitology Research 114: 1051-1061	31
2.3.1 Zusammenfassung	31
2.4 Werblow A, Flechl E, Klimpel S, Zित्रा C, Lebl K, Kieser K, Laciny A, Silbermayr K, Melaun C, Führer H-P (2015) Direct PCR of indigenous and invasive mosquito species: a time and cost effective technique of mosquito barcoding.	34
2.4.1 Zusammenfassung	34
3 Diskussion	37
3.1 Artidentifizierung.....	37
3.2 Zoogeographie heimischer und invasiver Stechmückenarten	39
3.3 Genetische Variabilität und Populationsstruktur der Arten <i>Cx. pipiens</i> und <i>Cx. torrentium</i>	43
3.4 Schlussfolgerungen und Ausblick.....	49
4 Zusammenfassung	52
5 Literaturverzeichnis	54
Anhang 1	76
Anhang 2	80

Abkürzungsverzeichnis

<i>ace2</i>	Acetylcholinesterase (Gen des Intron 2)
<i>Ae.</i>	<i>Aedes</i>
A	Adenin
AFLP	Amplified Fragment-Length Polymorphism
AMCA	American Mosquito Control Association
AMOVA	Analysis of Molecular Variance
<i>An.</i>	<i>Anopheles</i>
n	Anzahl, Stichprobe
bp	Basenpaare
BG	Biogents
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
ca.	Circa
<i>Cq.</i>	<i>Coquillettidia</i>
<i>Cx.</i>	<i>Culex</i>
<i>Cs.</i>	<i>Culiseta</i>
Cyt b	Cytochrom b
cox1-3	Cytochrom c Oxidase Untereinheit 1-3
C	Cytosin
DEET	Diethyltoluamid
DGVN	Deutsche Gesellschaft für die Vereinten Nationen e.V.
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DWD	Deutscher Wetterdienst
ECDC	European Centre for Diseases Prevention and Control
EVS	Encephalitis Vector Survey
et al.	Et alii
F _{ST}	fixation index
°C	Grad Celsius
G	Guanin
GC	Guanin/Cytosin
ISI	International Statistical Institute
ITS	Internal Transcribed Spacer
Jh.	Jahrhundert

Abkürzungsverzeichnis

km	Kilometer
L1-L4	Larvalstadien 1-4
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Mrd.	Milliarde
Mio.	Million
NADH4	Nicotinamidadenindinukleotid-Dehydrogenase Untereinheit 4
<i>Oc.</i>	<i>Ochlerotatus</i>
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
%	Prozent
RKI	Robert Koch Institut
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
s.l.	Sensu lato
s.u.	siehe unten
sp.	Spezies
spp.	Spezies pluralis
Tsd.	Tausend
T	Thymin
USA	United States of America
u.a.	unter anderem
<i>Ur.</i>	<i>Uranotaenia</i>
v. Chr.	vor Christus
WHO	World Health Organisation
z.B.	Zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Schematische Darstellung des Körperbaus von Culicidae (Stechmücken). (Quelle: Becker et al. 2010).....	8
Abbildung 1.2 Schematische Darstellung morphologischer Merkmale von Stechmückenlarven (Culicidae). (Quelle: Becker et al. 2010).....	10
Abbildung 1.3 Schematische Ansicht (lateral) einer Stechmückenpuppe. (Quelle: Becker et al. 2010)	11
Abbildung 1.4 Schematische Darstellung des Lebenszyklus von Culicidae (Stechmücken). (Quelle: nach Villarreal 2010).....	13
Abbildung 1.5 Schematischer Aufbau der Mundwerkzeuge weiblicher Culicidae (Stechmücken). (Abbildung nach Mackean 2015, Beschriftung und Farbkennzeichnung nach Becker et al. 2010)	16
Abbildung 1.6 Darstellung der invasiven Arten <i>Aedes aegypti</i> , <i>Aedes albopictus</i> , <i>Aedes atropalpus</i> , <i>Aedes koreicus</i> sowie <i>Ochlerotatus japonicus japonicus</i> in Europa. (nach ECDC Stand Januar 2015).....	21

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 In Deutschland bekannte Stechmückenarten bei denen Erreger wie Viren, Bakterien (B), Filarien (F) und Protozoen (P) nachgewiesen wurden. Bei diesen Nachweisen wurde nicht unterschieden, ob die Tiere in der Wildnis oder im Labor infiziert wurden (Art und Wirtspräferenz nach Becker et al. 2014a).....	76
--	----

Einführung

Im Laufe der Evolution haben sich nicht nur unterschiedliche Tier- und Pflanzenarten, sondern mit ihnen auch vielfältige Formen des Zusammenlebens von Individuen der gleichen Art (Autökologie) oder artverschiedenen Organismen (Synökologie) entwickelt (Schnieder 2006, Deplazes et al. 2012). Die daraus entstandenen Beziehungen können entweder von beiderseitigem Nutzen (Mutualismus) oder aber dem Vorteil einer Seite (Antagonismus) geprägt sein. Bei Lebensgemeinschaften, die auf reinem Mutualismus beruhen, beziehen beide Partner Vorteile aus der Verbindung, ohne dass jedoch eine Lebensnotwendigkeit für beide Seiten besteht. Anders hingegen bei einer echten Symbiose, bei der die Partner in ihrer Lebensweise, insbesondere auf trophischer Ebene, aufeinander angewiesen und ohne einander nur eingeschränkt oder nicht lebensfähig sind (Hiepe 2006, Lucius und Loos-Frank 2008).

Im Rahmen antagonistischer Beziehungen haben sich hinsichtlich der beteiligten Organismen ebenfalls unterschiedliche Variationen des Zusammenlebens herausgebildet. Häufig profitiert hierbei ein meist kleinerer Organismus (Parasit) vom meist größeren (Wirt). Diese Strategie, welche allgemein hin als Parasitismus bezeichnet wird, ist eine der erfolgreichsten Lebensformen, die sich im Laufe der Evolution entwickelt haben (Poulin und Morand 2000). Schätzungen zufolge weisen rund 30% der knapp 1,8 Millionen rezent lebenden Eukaryoten eine parasitische Lebensweise auf (Deplazes et al. 2012). Sowohl der Befall des Menschen als auch der Tiere durch Parasiten ist bereits seit der Antike bekannt. Zudem finden sich in medizinischen Schriften aus China um 2600 v.Chr. Beschreibungen der Krätze, einer durch Milben (Spinnentiere) hervorgerufenen Hauterkrankung. Des Weiteren wurden während der Zeit der Ägypter um 1500 v.Chr. sowie der griechischen Epoche um Hippokrates (ca. 460-377 v.Chr.) verschiedene Darmwürmer beschrieben (Hiepe und Aspöck 2006). Der Begriff „Parasit“ im biowissenschaftlich-medizinischen Sinn wurde jedoch erst 1796 von Latreille (1762-1833) eingeführt (Hiepe und Aspöck 2006). Abgeleitet ist er von dem griechischen Wort parasitos, welches „Bei- oder Mitesser“ bedeutet (Deplazes et al. 2012, Mehlhorn 2012). Je nach Kriterium lassen sich Parasiten in verschiedene Kategorien unterteilen. Meist werden sie ausgehend davon, ob die äußere Oberfläche oder die inneren Organsysteme des Wirts besiedelt werden, in Ekto- respektive Endoparasiten unterteilt (Eckert et al. 2008, Mehlhorn

2012, Bowman 2014). Weitere Kategorien beziehen sich beispielsweise auf die Kontaktdauer zwischen Parasit und Wirt (temporär oder stationär) oder aber auf die Dauer der parasitären Lebensweise (permanent oder periodisch) (Hiepe 2006, Deplazes et al. 2012, Lucius und Loos-Frank 2008). Einer der wesentlichen Unterschiede des Parasitismus zu anderen Lebensformen wie dem Kommensalismus, dem Mutualismus oder der Symbiose ist die Pathogenität des Parasiten gegenüber dem Wirtsorganismus (Eckert et al. 2008, Deplazes et al. 2012). So können Parasiten beispielsweise Zell- und Gewebeschäden sowie Veränderungen der Zellstrukturen hervorrufen (Deplazes et al. 2012). Auch der Entzug von Nährstoffen oder durch Stoffwechselprodukte der Parasiten hervorgerufene Vergiftungen sind möglich. Eine weitere wichtige Rolle spielen Parasiten jedoch auch bei der Übertragung von Krankheitserregern (Mehlhorn und Piekarski 2002, Eckert et al. 2008, Lucius und Loos-Frank 2008, Deplazes et al. 2012).

Parasiten, die in der Lage sind bestimmte Pathogene oder andere Parasiten von Mensch zu Mensch oder von Tieren auf den Menschen (Zoonose) zu übertragen, werden als Vektoren bezeichnet und sind eine besondere Form von Ektoparasiten (Mehlhorn 2012, WHO 2014a). Viele dieser Vektoren werden dem Tierstamm der Arthropoden zugerechnet und sind sogenannte hämatophage (sich von Blut ernährende) Organismen. Die wohl bekanntesten hämatophagen Arthropoden sind Stechmücken (Familie: Culicidae) sowie Flöhe (Ordnung: Siphonaptera), Zecken (Ordnung: Ixodida) und Wanzen (z.B. Bettwanzen; Familie: Cimicidae). Weitaus weniger bekannt sind hingegen Fliegen (Unterordnung: Brachycera, z.B. Tse-Tse Fliegen, Bremsen) oder Käfer (Ordnung: Coleoptera). Zudem ernähren sich einige Wasserschnecken hämatophag, zählen jedoch zu den Mollusken (Delaunay et al. 2011, Deplazes et al. 2012, Gubler 2013, WHO 2014a). Sowohl die Aufnahme als auch die Übertragung der Pathogene wie Nematoden, Protozoen, Bakterien und Viren erfolgt in den meisten Fällen während der Blutmahlzeit der als Vektor fungierenden Arten, wobei die Übertragung der Krankheitserreger auf zwei Wegen stattfinden kann. Zum einen kann die Übertragung mechanisch z.B. durch kontaminierte Mundwerkzeuge oder andere Körperteile erfolgen, zum anderen kann eine biologische Übertragung stattfinden bei der das Pathogen im Regelfall eine Entwicklung im Vektor durchläuft und anschließend während der Blutmahlzeit in den

Wirt gelangt (Kuno und Chang 2005, Goddard 2008, Mehlhorn 2012, Gubler 2013, Little 2014).

Welche hohe medizinische Relevanz vektor-assoziierte Krankheiten haben, zeigen die jährlichen Zahlen der Weltgesundheitsorganisation (WHO). Mehr als die Hälfte der Erdbevölkerung lebt momentan in Gebieten, in denen das Risiko, sich mit einer vektor-assoziierten Krankheit wie Malaria, Denguefieber, Gelbfieber, Leishmaniose oder der Schlafkrankheit anzustecken, sehr hoch ist. Darüber hinaus infizieren sich jährlich über eine Milliarde Menschen mit Krankheiten, deren Erreger durch Vektoren übertragen werden (WHO 2014b). Mehr als eine Million Menschen sterben an den Folgen dieser Krankheiten. Dabei sind vor allem Menschen in Entwicklungsländern mit einer schlechten Grundversorgung an Nahrungsmitteln, sauberem Wasser und medizinischer Versorgung betroffen (WHO 2014a).

Aber auch in der nördlichen Hemisphäre spielen vektor-assoziierte Krankheiten eine große Rolle. In Nordamerika sowie auch in Europa stellt beispielsweise die durch Zecken übertragene Lyme-Borreliose die am häufigsten auftretende vektor-assoziierte Krankheit dar (CDC 2015, DGVN 2014, RKI 2014, Wilking und Stark 2014). Zudem wird die Ausbreitung von Erregern wie dem West-Nil-Virus, Dengue-Virus, Gelbfieber-Virus oder Leishmaniose sowie deren Vektoren durch die Klimaerwärmung, aber auch in hohem Maße durch globale Güter- und Reiseaktivitäten vorangetrieben (Frimmel et al. 2009, Becker et al. 2014a).

Neben den Infektionskrankheiten des Menschen stellen vektor-assoziierte Krankheiten auch ein großes ökonomisches Problem dar. So können Nutztierbestände sowie Kulturpflanzen in der Landwirtschaft von Infektionen betroffen sein, die beispielsweise Einfluss auf den (wirtschaftlichen) Ertrag oder die Qualität des Produktes haben. Zudem verursachen Bekämpfungsmaßnahmen wie die Impfung von Tieren oder das Ausbringen von Insektiziden erhebliche Kosten (Deplazes et al. 2012). Um sowohl die Gesundheit des Menschen als auch die von Tieren und Pflanzen vor vektor-assoziierten Krankheiten zu schützen, ist die stetige Kontrolle der als Vektor fungierenden Arten besonders wichtig (Little 2014). Hierzu zählen sowohl die stetige Überwachung bereits bestehender Populationen und neu eingeführter (invasiver) Arten als auch die Analyse des Vektorpotentials für bereits bestehende, aber auch neu auftretende Krankheitserreger (Becker et al. 2014a).

1 Einleitung

Weltweit sind über 1,3 Mio. rezente Tierarten beschrieben (Wehner und Gehring 2013), wobei die Arthropoda und Mollusca die artenreichsten Tierstämme darstellen. Innerhalb der Arthropoda werden mehr als 85% dieser bereits beschriebenen Tierarten zusammengefasst, wodurch dieser nicht nur die artenreichste, sondern auch die erfolgreichste Gruppe des Tierreiches darstellt (Goddard 2008, Goater et al. 2013). Der Begriff Arthropoda setzt sich aus den griechischen Wörtern *arthron* = Gelenk sowie *podos* = Fuß zusammen, aus denen auch die deutsche Bezeichnung Gliederfüßer hervorging (Hickman et al. 2008, Mehlhorn 2012). Wie der Begriff vermuten lässt, sind die Vertreter dieses Stammes durch ihre gegliederten Extremitäten gekennzeichnet (Goater et al. 2013). Des Weiteren zeichnet sich der Bauplan der Arthropoden durch einen segmentierten Körperbau aus. Grundlegend besteht der Körper aus 10-25 Einzelsegmenten, welche jedoch im Laufe der Evolution häufig zu funktionellen Gruppen (Tagmata) verschmolzen sind. Meist finden sich die Segmente in 2-3 Tagmata wieder (Hickman et al. 2008, Goater et al. 2013). Als weitere Merkmale können das Exoskelett sowie die Bilateralsymmetrie angesehen werden (Goddard 2008, Goater et al. 2013).

Bereits aus dem Kambrium sind mit den Trilobiten die ersten Vertreter der Arthropoden bekannt, welche jedoch vor rund 245 Mio. Jahren ausgestorben sind (Purves et al. 2006). Bei den Trilobiten handelte es sich um reine Meeresbewohner, wohingegen heute vorkommende Arthropoden ubiquitär vom Äquator bis zu den Polarregionen, von den Bergen bis in die Tiefsee, aber auch in Regenwäldern und Wüsten verbreitet sind. Somit sind sie in fast allen Habitaten zu finden, in denen sie zudem wichtige ökologische Aufgaben übernehmen (u.a. Goddard 2008, Hickman et al. 2008, Thorp und Rogers 2014). Trotz der fossilen Nachweise sind die phylogenetischen Zusammenhänge innerhalb des Stammes noch nicht vollständig geklärt (Hickman et al. 2008, Goater et al. 2013). Einige Quellen geben eine Einteilung in Chelicerata und Mandibulata (Crustacea, Insecta) an, welche sich auf den Bau der Mundwerkzeuge stützt (Mehlhorn 2012). Meist werden die Vertreter dieses Phylums jedoch in die Unterstämme Chelicerata (Fühlerlose), Crustacea (Krebstiere), Myriapoda (Tausendfüßer) sowie Hexapoda (Sechsfüßer) unterteilt (Purves et al. 2006, Goater et al. 2013). Die Hexapoda bilden den größten Unterstamm der Arthropoden und sind mit ca. 1 Mio. beschriebenen Arten von der

Klasse der Insekten geprägt (Gullan und Cranston 2010). Neben den typischen Merkmalen der Arthropoden ist der Körper der Insekten in die drei Tagmata Kopf, Thorax und Abdomen gegliedert, wobei sich am Thorax drei Beinpaare befinden (Goddard 2008). Des Weiteren besitzen viele Vertreter dieser Klasse ein oder zwei Paar Flügel (Goater et al. 2013). Diese können vor allem bei parasitisch lebenden Arten jedoch reduziert oder vollkommen zurückgebildet sein (Goddard 2008). Die Evolution der Flügel und des damit verbundenen aktiven Fliegens trug maßgeblich zur Verbreitung der Insekten und somit auch zu ihrem Erfolg bei. Eine weitere Anpassung ist die Strategie der Eiablage. Die meisten Insekten sind ovipar, das bedeutet, sie legen Eier. Durch ihre geringe Größe ist es diesen Insekten möglich, ihre Eier an geschützten und für andere Arten meist unzugänglichen Orten abzulegen und damit die Überlebenschancen der Nachkommenschaft zu erhöhen (Goater et al. 2013). Aufgrund der Häufigkeit ihres Auftretens spielen Insekten eine wichtige Rolle in den von ihnen besiedelten Ökosystemen. Neben der Zersetzung von organischem Material sind sie als Bestäuber von Pflanzen sowie als Nahrungsquelle (hoher Gehalt an Proteinen sowie Vitaminen und Mineralstoffen) vieler Vertebraten wie Vögel oder Reptilien nicht zu ersetzen. Vom Menschen werden etwa 2000 Arten als Nahrungsquelle herangezogen. Als Modelorganismen tragen manche Arten (z.B. *Drosophila melanogaster*) zum Verständnis biologischer Prozesse bei. Zudem haben sie einen starken Einfluss auf die Lebensgemeinschaften, indem sie als Überträger von Pathogenen, aber auch als Räuber oder Parasiten von kleineren Lebewesen fungieren (Goater et al. 2013, Gullan und Cranston 2014). Bislang sind etwa 400.000 Insektenarten bekannt, die als obligate oder fakultative Parasiten an Menschen, Tieren sowie Pflanzen leben und diese auf unterschiedlichste Weise schädigen können (Hiepe 2006, Mehlhorn und Piekarski 2002). Medizinisch hoch relevant sind vor allem Insekten, die sich hämatophag ernähren und so als Überträger von krankheitsauslösenden Pathogenen dienen können. Dabei stellen Stechmücken (Culicidae) die wichtigsten Vertreter blutsaugender Insekten dar. Jährlich sterben über eine Million Menschen an den Folgen von Krankheiten, deren Erreger durch Stechmücken übertragen werden (AMCA 2014).

1.1 Taxonomische Einordnung von Culicidae (Stechmücken)

Die Culicidae (Stechmücken) sind eine Familie innerhalb der Insekten, welche der Ordnung Diptera (Zweiflügler) und der Unterordnung Nematocera (Mücken) zugeordnet wird. Weltweit sind derzeit mehr als 3500 Arten beschrieben, die in den zwei Unterfamilien Anophelinae sowie Culicinae und zahlreichen Tribi und Gattungen zusammengefasst werden (Becker et al. 2010, 2014a). Mit Ausnahme der arktischen Regionen sind Culicidae weltweit verbreitet. Die höchste Artenvielfalt mit rund 30% der bisher bekannten Arten findet sich in der Neotropis und dem Orient. In der Paläarktis kommen ca. 14% und in den nearktischen Regionen noch 5% der Stechmückenarten vor (Rueda 2008). In Deutschland sind nach aktuellem Stand 51 Stechmückenarten nachgewiesen, welche in sieben Gattungen unterteilt werden (Becker et al. 2014b). Die meisten Vertreter weist die Gattung *Ochlerotatus* (*Oc.*) mit 22 Arten auf, gefolgt von den Gattungen *Culiseta* (*Cs.*, n=8), *Anopheles* (*An.*, n=8), *Culex* (*Cx.*, n=6), *Aedes* (*Ae.*, n=5) sowie *Coquillettidia* (*Cq.*) und *Uranotaenia* (*Ur.*) mit je nur einer in Deutschland vertretenen Art. Von den 51 bekannten Arten gelten 50 als etabliert, was bedeutet, dass sie in der Lage sind, stabile Populationen mit fertilen Nachkommen zu bilden. Die Art *Aedes albopictus* (Asiatische Tigermücke) wird bislang nur regelmäßig, wahrscheinlich durch den Reiseverkehr über die Alpen, nach Deutschland verbracht, konnte jedoch bislang keine stabilen Populationen ausbilden (Becker et al. 2014a, 2014b, Werner und Kampen 2014). Anders hingegen die Asiatische Buschmücke (*Ochlerotatus japonicus japonicus*), welche sich seit 2003 erfolgreich in Europa und seit 2011 auch in Deutschland etabliert hat (Melaun et al. 2015). Die Arten *Cs. longiareolata* und *Ur. unguiculata* stammen ursprünglich aus dem mediterranen Raum. Für die Unterscheidung der verschiedenen Arten werden vor allem morphologische Merkmale, aber auch die biologischen Besonderheiten herangezogen. Dabei werden z.B. das Paarungs- und Eiablageverhalten sowie die Wirtspräferenz, aber auch das Flug-, Stech- und Überwinterungsverhalten der Arten berücksichtigt (Becker et al. 2014a).

1.2 Morphologie

Adulttiere

Wie bei vielen Arthropoden ist auch der Körper der Culicidae bilateralsymmetrisch aufgebaut und unterteilt sich in die drei Tagmata Kopf, Thorax und Abdomen (Abbildung 1.1a), welche von einem chitinhaltigen Exoskelett umgeben sind (Mohrig

1969). Auf den Tagmata befinden sich verschiedenartige Setae (Borsten), welche taxonomische Relevanz besitzen (Becker et al. 2010).

Der Kopf einer Stechmücke ist geprägt von einer ovoiden Form und besitzt neben zwei großen Facettenaugen zwei lange und vielgliedrige Fühler, welche sich je aus den beiden Grundgliedern Scapus und Pedicellus sowie der Fühlergeißel zusammensetzen (Abbildung 1.1b) (Mohrig 1969, Rueda 2008). Die zwei ebenfalls am Kopf sitzenden Maxillarpalpen (Taster) sind bei den meisten weiblichen Culicidae lediglich halb so lang wie die Proboscis (Becker et al. 2010). Eine Ausnahme bilden die Weibchen der Gattung *Anopheles*, bei denen die Maxillarpalpen annähernd die Länge der Proboscis erreichen (Mohrig 1969). Die Männchen (Abbildung 1.1c) weisen ebenfalls lange Maxillarpalpen auf, die zudem behaart sind. Des Weiteren besitzen sie stark befiederte Fühlergeißeln, durch welche sie deutlich von den Weibchen abgrenzbar sind (Becker et al. 2010).

Die Mundwerkzeuge der Stechmücken setzen sich, wie auch bei anderen Insekten, aus Labrum, Hypopharynx, Mandibeln, Maxillen und Labium zusammen. Jedoch besitzen sie aufgrund der spezialisierten Nahrungsaufnahme sowie der Beschaffenheit der Haut ihrer Wirte Mundwerkzeuge, bei denen die einzelnen Bauteile zu einer Proboscis (Stechrüssel, Abbildung 1.5) verlängert sind (Wahid et al. 2003, Becker et al. 2010, Krenn und Aspöck 2012). Anhand dieses Merkmals können Stechmücken von anderen Nematocera (Mücken) unterschieden werden. Gebildet wird die Proboscis von Labrum, Hypopharynx, zwei Mandibeln sowie den zwei Maxillen, welche ein vom Labium umschlossenes Stiletbündel formen (Lehane 2005, Becker et al. 2010). Durch diese Anpassung sind weibliche Culicidae in der Lage sowohl die Haut als auch die in der Hypodermis gelegenen Blutgefäße zu penetrieren (Becker et al. 2010, Service 2012, Goater et al. 2013). Bei männlichen Stechmücken sind die Maxillen und Mandibeln entweder stark verkürzt oder ganz zurückgebildet, wodurch sie lediglich zur Aufnahme von Pflanzensäften befähigt sind (Service 2012).

Zwischen dem Kopf und dem Abdomen befindet sich der Thorax, welcher dorsal vom Mesonotum bedeckt wird. Dieses ist dicht mit Schuppen besetzt, die durch ihre Anordnung und Färbung spezifische Muster bilden (Mohrig 1969, Rueda 2008). Unterteilt wird der Thorax in die drei Segmente Pro-, Meso- und Metathorax, wobei jedes dieser Segmente auf der ventralen Seite ein paar ebenfalls segmentierte Beine aufweist. Jedes Bein setzt sich aus Coxa, Trochanter, Femur, Tibia, Tarsus sowie

Pretarsus zusammen und ist oft artcharakteristisch beschuppt. Manche Arten besitzen zudem Pulvilli. Zusätzlich zu den Gliedmaßen befinden sich dorsal am Mesothorax ein paar Flügel für den aktiven Flug. Die Flügeladern sind ebenfalls mit verschiedenen Schuppen besetzt, die der morphologischen Bestimmung dienen. Am Metathorax befinden sich die Hinterflügel, welche zu kleinen Schwingkölbchen reduziert sind und als Haltere bezeichnet werden (Mohrig 1969, Becker et al. 2010). Mit diesen regulieren die Tiere das Gleichgewicht während des Fluges (Becker et al. 2010). Am Ende des Thorax befindet sich das Scutellum, welches entweder gerundet (Gattung *Anopheles*) oder dreilappig (andere Gattungen) ausgebildet sein kann (Mohrig 1969).

Das Abdomen der Culicidae setzt sich aus zehn Segmenten zusammen, wobei die letzten drei Segmente mit ihren Organen auf die Reproduktion sowie Exkretion spezialisiert sind (Rueda 2008, Becker et al. 2010). Die morphologische Unterscheidung der Männchen ist meist nur anhand des Aufbaus der Kopulationsorgane (Hypopygidium) möglich (Mohrig 1969).

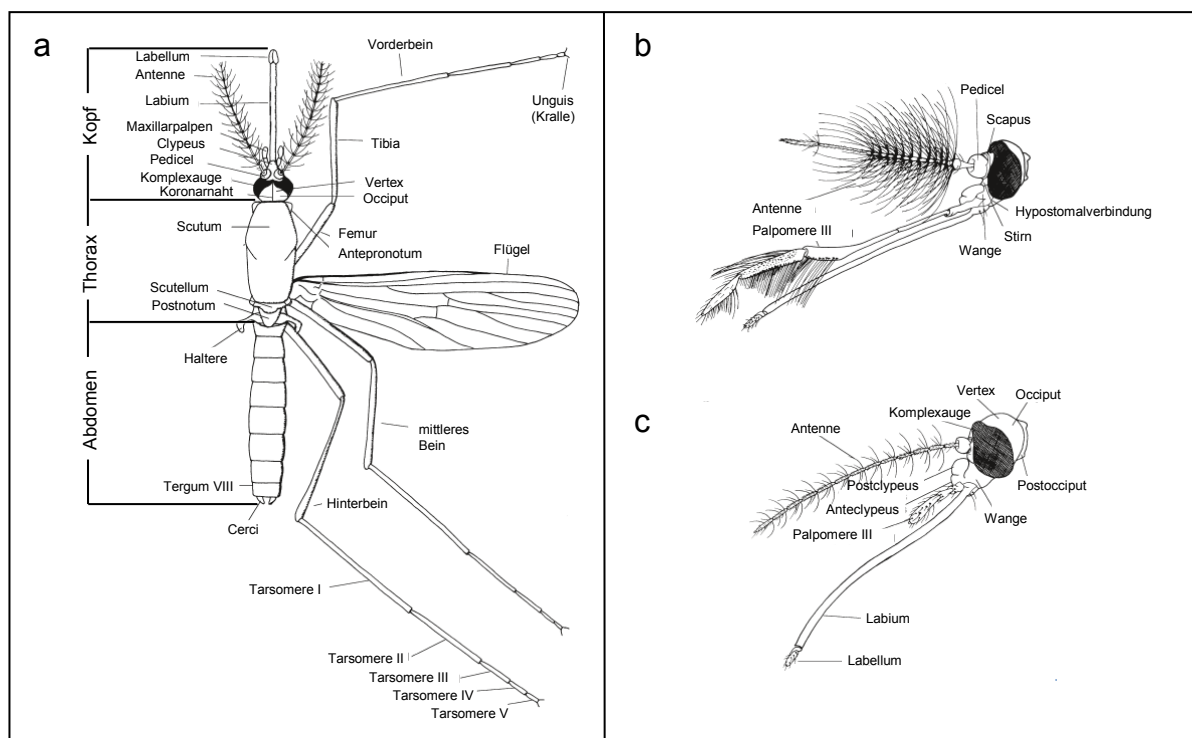


Abbildung 1.1 Schematische Darstellung des Körperbaus von Culicidae (Stechmücken). (a) weibliche Stechmücke mit deutlicher Unterteilung in die drei Tagmata Kopf, Thorax sowie Abdomen. Außerdem deutlich zu sehen sind die ebenfalls gegliederten Gliedmaßen. (b) Kopf einer männlichen Stechmücke mit stark ausgebildeten Maxillarpalpen und befiederten Antennen. (c) Kopf einer weiblichen Stechmücke. Deutlich sichtbar sind die lange Proboscis sowie die verkürzten Maxillarpalpen und die im Vergleich zu den Männchen weniger stark befiederten Antennen (Quelle: Becker et al. 2010)

Larven

Wie alle Dipteren durchlaufen auch Stechmücken eine holometabole Entwicklung. Dies bedeutet, dass sich die Larven hinsichtlich ihres Körperbaus eindeutig von den Adulttieren unterscheiden (Goater et al. 2013). Dennoch lässt sich bereits in diesem Stadium die typische Dreiteilung in Kopf, Thorax und Abdomen erkennen (Rueda 2008). Stechmückenlarven weisen vor allem im Bereich des Kopfes sowie des Abdomens Setae (Borsten) auf, deren Anordnungen und Ausprägungen auch hier gattungs-, aber auch artspezifisch sind und so zur morphologischen Bestimmung herangezogen werden. Aufgrund der Wachstumshäutungen, welche die einzelnen Larvalstadien (L1-L4) voneinander trennen, verändern sich die Kopfkapsel sowie die Anzahl der Setae und Pektenzähne, wodurch eine eindeutige Artbestimmung erst mit dem Erreichen des L4-Stadiums möglich ist (Becker et al. 2010). Am stark sklerotisierten Kopf befinden sich kurze, schlanke Antennen sowie Komplexaugen und beißend kauende Mundwerkzeuge mit vielborstigen Mundbürsten (Abbildung 1.2a-b, Lucius und Loos-Frank 2008, Becker et al. 2010). Der Thorax besteht aus weichem Gewebe und setzt sich, wie bei den Adulttieren, aus den Segmenten Pro-, Meso- und Metathorax zusammen. Das ebenfalls aus weichem Gewebe bestehende Abdomen der Larven ist aus zehn Segmenten zusammengesetzt. Ausgehend von Abdominalsegment VIII befindet sich dorsal gelegen ein ebenfalls sklerotisiertes Atemrohr (Siphon, Abbildung 1.2c-d), mit dem die Larven durch die Wasseroberfläche Luftsauerstoff aufnehmen. Eine Ausnahme bilden in Deutschland die Vertreter der Gattungen *Anopheles* und *Coquillettidia*, deren Atemrohre in Anpassung an die Lebensweise stark abgeändert sind (siehe Abbildung 1.2e-f). Das Analsegment der Larven ist mit einem sogenannten Sattel bedeckt und um die Afteröffnung befinden sich vier Analpapillen (Abbildung 1.2c-f). Diese dienen der Regulation des Elektrolythaushalts und variieren sowohl in Form und Länge, was unter anderem auch auf Umweltvariablen zurückzuführen sein kann (Mohrig 1969, Rueda 2008, Becker et al. 2010).

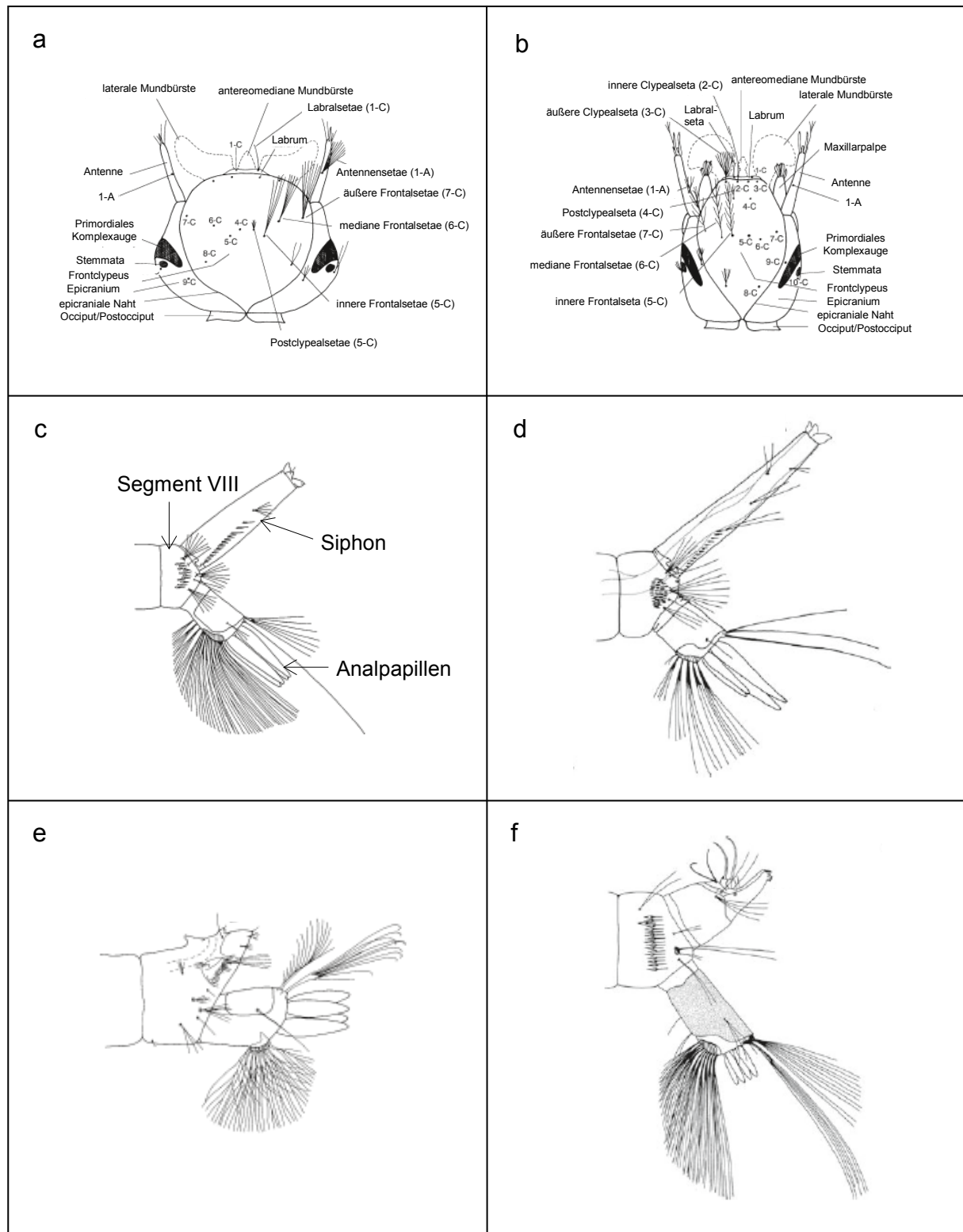


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung morphologischer Merkmale von Stechmückenlarven (Culicidae). (a) dorsale Ansicht des Kopfes einer Culicinae Larve mit deutlich sichtbaren Setae, welche zur morphologischen Artbestimmung herangezogen werden. (b) dorsale Ansicht des Kopfes einer Anophelinae (c) Abdominalsegment VIII von *Aedes* sp. mit Siphon sowie Afteröffnung mit Analpapillen. Auch hier befinden sich artspezifische Setae. (d) Abdomenenende von *Culex pipiens pipiens*. (e) Abdominalende von *Anopheles* spp. ohne Siphon (f) Abdomenenende von *Coquillettidia richiardii* mit spezialisiertem Siphon, um die Atemluft aus dem Luftgewebe von Wasserpflanzen zu beziehen. (Quelle: Becker et al. 2010)

Puppen

Die Puppen der Culicidae sind gekennzeichnet durch große Paddel, welche sich am Ende des Abdomens befinden und der Puppe eine aktive Bewegung erlauben. Da keine Nahrungsaufnahme stattfindet, besitzt dieses Stadium keine Mundwerkzeuge (Rutledge 2008). Der Kopf und der Thorax sind zu einem Cephalothorax verschmolzen, an dem sich die Prothorakalhörnchen für die Atmung befinden (Abbildung 1.3). Allerdings besitzen Puppen kaum Merkmale, die eine Artidentifizierung ermöglichen, wodurch im Feld gefangene Puppen meist im Labor bis zur vollständigen Metamorphose herangezogen und als Adulttiere wenn möglich morphologisch bestimmt werden (Becker et al. 2010).

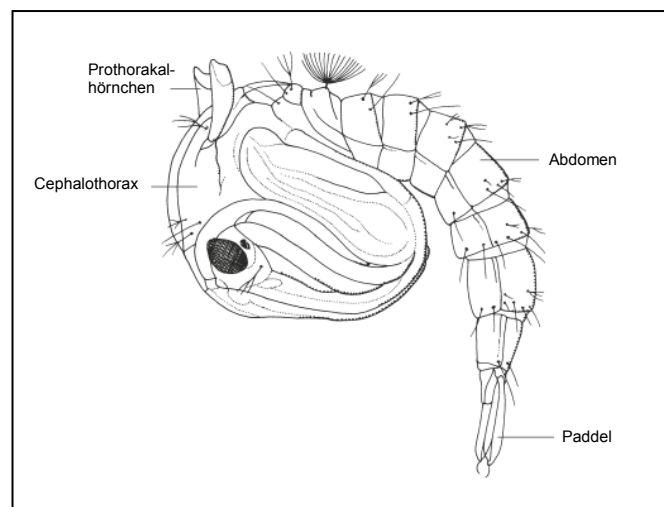


Abbildung 1.3 Schematische Ansicht (lateral) einer Stechmückenpuppe. Deutlich sichtbar die Paddel (für die Bewegung) am Ende des Abdomens sowie die Prothorakalhörnchen am Cephalothorax, die der Atmung dienen. (Quelle: Becker et al. 2010)

1.3 Lebenszyklus

Wie bei allen Dipteren findet auch bei den Stechmücken eine holometabole Entwicklung statt (Goater et al. 2013). Während dieser Entwicklung durchlaufen die Tiere vier Larven- (L1-L4) und ein Puppenstadium, welche ausschließlich im aquatischen Milieu zu finden sind, bevor aus der Puppe durch Metamorphose die terrestrisch lebenden Adulttiere schlüpfen. Alle Stadien sind durch Wachstumshäutungen voneinander abgegrenzt. Aufgrund ihrer hohen Adaptivität können Stechmücken nahezu alle aquatischen Habitate als Brutstätte nutzen, wobei Faktoren wie die Wasserqualität, der Lichteinfall sowie die Vegetation, das verfügbare Nahrungsangebot und das Vorhandensein anderer Gelege eine entscheidende Rolle für diese Wahl spielen (Becker et al. 2010). Die Ablage der bis zu 500 Eier erfolgt anschließend entweder einzeln, wie bei Arten der Gattungen

Aedes, *Anopheles* und *Ochlerotatus*, oder verpackt in sogenannten Eischiffchen wie bei den Gattungen *Culex*, *Culiseta* oder *Coquillettidia*. Zudem kann unterschieden werden, ob die Eier auf die Wasseroberfläche meist stehender Wasseransammlungen (z.B. *Culex*, *Coquillettidia*, *Culiseta*) oder in feuchtes Sediment (*Aedes*, *Ochlerotatus*) abgegeben werden (Lehane 2005, Mehlhorn 2012, Burkett-Cadena 2013). Befinden sich die Eier im Sediment, findet die Embryonalentwicklung mit der einsetzenden Überflutung des Bruthabitats durch Schneeschmelze im Frühjahr oder starke Regenfälle im Sommer statt. Ungeachtet des Eiablageverhaltens der Arten schlüpft das erste Larvalstadium (L1) sobald die Embryonalentwicklung im Ei abgeschlossen ist. Im Vergleich zu den meisten anderen wasserbewohnenden Larven grenzen sich die Larven der Stechmücken vor allem durch das Fehlen der Gliedmaßen von diesen ab (Becker et al. 2010).

Während aller aquatischen Lebensphasen atmen die meisten Larven und Puppen ausschließlich Luftsauerstoff. Hierfür hat sich am achten Abdominalsegment bei der Mehrheit der Stechmücken ein sogenannter Siphon entwickelt, mit dem an der Wasseroberfläche Luft in das Tracheensystem eingesogen wird (Abbildung 1.2c-d). Dabei nehmen die Larven der Unterfamilie Culicinae eine typische Schrägstellung zur Wasseroberfläche ein. Bei Larven der Unterfamilie Anophelinae bildet das Segment lediglich spirakuläre Lobi aus (Abbildung 1.2e), an denen sich die Tracheen nach außen hin öffnen, wodurch die Larven parallel zur Wasseroberfläche liegen (Lehane 2005, Becker et al. 2010, Mehlhorn 2012, Service 2012). Larven der Arten *Coquillettidia* und *Mansonia* beziehen ihre Atemluft aus dem Aerenchym von Wasserpflanzen, welches sie mit ihren spezialisierten Siphons durchbohren (Abbildung 1.2f). Bei anderen Arten wiederum wird angenommen, dass sie in der Lage sind, gelösten Sauerstoff aus dem Wasser über vergrößerte Analpapillen oder Antennen aufzunehmen (Harbach 2007, Becker et al. 2010, Lucius und Loos-Frank 2008, Deplazes et al. 2012). Die Atmung der Puppen erfolgt meist über sogenannte Prothorakalhörnchen (Abbildung 1.3) ebenfalls an der Wasseroberfläche (Wichard et al. 1999). Eine Ausnahme bilden auch hier die Vertreter der Gattungen *Mansonia* und *Coquillettidia*, bei denen die Puppen den benötigten Sauerstoff - wie bereits die Larven - aus dem luftführenden Gewebe von Wasserpflanzen beziehen (Service 2012).

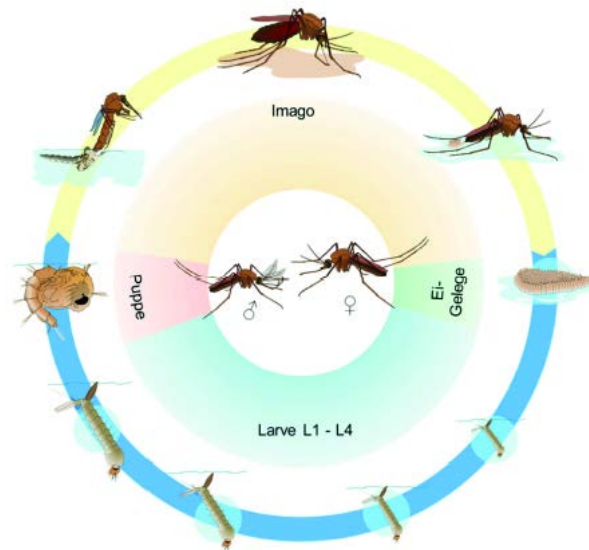


Abbildung 1.4 Schematische Darstellung des Lebenszyklus von Culicidae (Stechmücken), hier der Gattung *Culex* beginnend mit der Eiablage („Schiffchen“) des Weibchens auf die Wasseroberfläche. Andere Gattungen wie beispielsweise *Ochlerotatus* oder *Aedes* legen ihre Eier (einzeln) bevorzugt in feuchtes Sediment. Nach der vollständigen Entwicklung der Eier schlüpft das erste von vier Larvenstadien (L1-L4). Nach Abschluss des vierten Larvenstadiums (L4) findet die Verpuppung und anschließend die Metamorphose zum Imago statt. (Quelle: nach Villarreal 2010)

Neben dem Vorhandensein von Wasser ist der Lebenszyklus der Stechmücken stark temperaturabhängig. So benötigen Überschwemmungsmücken, die hauptsächlich im Sommer auftreten, höhere Temperaturen für ihre Entwicklung als Arten, welche bereits im Frühjahr zu finden sind. Je nach Temperaturoptimum einer Art kann die Entwicklung vom Ei bis zum vollständig entwickelten Imago innerhalb weniger Tage erfolgen oder aber Wochen in Anspruch nehmen. Zusätzlich hat das verfügbare Nahrungsangebot einen Einfluss auf die Entwicklung der Tiere (Becker et al. 2010). Das Nahrungsspektrum der Larven der verschiedenen Stechmückenarten erstreckt sich dabei von Mikroorganismen über Algen und Detritus bis hin zu anderen Larven und Kleinstlebewesen, welche sich im Wasser befinden (Gullan und Cranston 2010). Durch Filtrieren des Wassers erzeugen die Larven mit den spezialisierten Mundwerkzeugen eine Strömung, mit der das Wasser zur Mundöffnung gebracht und die Nahrungspartikel herausgefiltert werden. Andere Larven, wie die meisten Vertreter der Gattungen *Aedes* und *Ochlerotatus*, sind sogenannte „Graser“, welche ihre Nahrung durch das Abgrasen von Oberflächen aufnehmen. Die dritte Gruppe beinhaltet fakultative oder obligate Prädatoren, die sich von anderen Stechmücken-Larven oder den Larven anderer Wasserinsekten ernähren (Lehane 2005, Becker et al. 2010).

Mit Beendigung des vierten Larvalstadiums kommt es zur Verpuppung. In diesem nach wie vor mobilen Stadium findet keine Nahrungsaufnahme mehr statt. Die

einsetzende Metamorphose innerhalb der Puppe nimmt etwa zwei Tage in Anspruch, wobei die Zeitspanne je nach Temperatur variieren kann (Becker et al. 2010).

Im Anschluss an die Metamorphose schlüpfen die Adulttiere durch einen dorsalen, längsverlaufenden Schlitz im Brustbereich der Puppenkutikula (Mehlhorn 2012). Da die adulten Männchen etwa 24 Stunden benötigen, um geschlechtsreif zu werden, schlüpfen sie im Regelfall ein bis zwei Tage vor den Weibchen, um eine synchrone Geschlechtsreife zu gewährleisten. Die Männchen der meisten Culicidae-Arten bilden zur Paarung Schwärme aus, in welche die Weibchen hineinfliegen und begattet werden (Eurygamie). Angelockt werden die Weibchen durch Pheromone sowie artspezifische Töne, welche die Männchen mit ihrem Flügelschlag erzeugen. Findet eine Paarung ohne Schwarmbildung statt, wird dies als Stenogamie bezeichnet (Lehane 2005, Becker et al. 2010, Lucius und Loos-Frank 2008, Burkett-Cadena 2013). Die Überwinterung der Stechmücken erfolgt entweder als Adulttier (z.B. *Cx. pipiens pipiens*), als Ei (z.B. *Ae. vexans*) oder aber als Larve wie bei Schmelzwasserarten z.B. *Oc. communis* oder *Oc. punctor* (Becker et al. 2010).

1.4 Ernährung und Wirtssuche

Sowohl adulte weibliche als auch männliche Stechmücken nutzen zuckerhaltige Pflanzensäfte als Kohlenhydrat- und somit als Energiequelle. Zusätzlich zu dieser Ernährung benötigen die Weibchen der meisten bekannten Stechmückenarten Blut, um daraus Proteine für die Eiproduktion zu beziehen, was als anautogen bezeichnet wird (Wahid et al. 2003, Becker et al. 2010, Krenn und Aspöck 2012). Ausnahmen von dieser Weise der Eiproduktion stellen beispielsweise die Arten *Cx. pipiens* Biotyp *molestus* oder *Aedes atropalpus* dar, welche autogen und somit auch ohne vorherige Blutmahlzeit in der Lage sind ein erstes Eipaket abzulegen (Weitzel et al. 2009, Burkett-Cadena 2013). Andere Stechmückenarten wie *Toxorhynchites rutilus*, welche in tropischen Regionen vorkommen benötigten keine Blutmahlzeiten, da sie bereits als Larven durch ihre räuberische Lebensweise genügend Protein-Ressourcen für die Eiproduktion geschaffen haben (Burkett-Cadena 2013). Für gewöhnlich wird die Blutmahlzeit nach der Paarung, bei einigen Arten aber auch bereits vor der Paarung aufgenommen. Dabei saugen die Weibchen meist alle 3-5 Tage zu artspezifischen Zeiten Blut (Rueda 2008, Mehlhorn 2012, Service 2012).

Die Ortung eines geeigneten Wirtes für die Aufnahme der Blutmahlzeit basiert bei den weiblichen Culicidae hauptsächlich auf olfaktorischen, visuellen sowie

thermischen Stimuli, welche durch ungerichtete Flüge lokalisiert werden (Sutcliffe 1987, Debboun et al. 2006). Um diese Reize wahrnehmen zu können, besitzen die Weibchen eine Vielzahl von Rezeptoren in den Antennen sowie den Maxillarpalpen. Mithilfe dieser Rezeptoren können Stimuli wie Kohlestoffdioxid, Ammonium, Aceton, Milchsäure, Octenol, Butan, Fettsäuren, aber auch Phenolverbindungen lokalisiert werden (Lehane 2005, Rueda 2008, Syed und Leal 2009). Häufig werden dabei Veränderungen der Konzentration des in der Atemluft vorhandenen CO_2 in Verbindung mit anderen Duftstoffen der potentiellen Wirte von den Stechmücken wahrgenommen (Becker et al. 2010). Je mehr Stimuli registriert werden können, umso besser kann die Lokalisierung des Wirtes erfolgen (Lehane 2005). Abhängig von der Wirtspräferenz einer jeden Art, sind die einzelnen Komponenten sowie deren Zusammensetzung für die Weibchen jedoch von unterschiedlicher Bedeutung. Der Mensch nutzt die verschiedenen Stimuli beispielsweise bei der Herstellung von „Mückensprays“, indem die Chemorezeptoren durch Repellentien wie Diethyltoluamid (DEET) inhibiert werden und eine Lokalisierung des Wirtes nur noch bedingt gewährleistet ist (Rueda 2008). Nachdem ein Weibchen mit einem Wirtsstimulus in Kontakt gekommen ist, findet der gezielte Flug in Richtung des Wirtes statt, wobei sich die Konzentration der Stimuli stetig erhöht (Sutcliffe 1987). Befindet sich der mögliche Wirt in unmittelbarer Nähe, werden neben den chemischen Stimuli auch die Körperwärme sowie Konvektionsströme des Wirtes zu wichtigen Orientierungsfaktoren. Zudem können Stechmücken die relative Bewegung eines möglichen Wirtes zum Hintergrund wahrnehmen. Dabei spielen vor allem Veränderungen des Farbkontrastes und der Lichtintensität eine Rolle (Lehane 2005). Nachdem ein Wirt eindeutig identifiziert wurde, suchen Stechmückenweibchen mithilfe ihres Labroepipharynx eine für die Blutmahlzeit geeignete Hautstelle. Das Ausprobieren verschiedener Hautstellen wird „Probing“ genannt (Ribeiro 2000, Kong und Wu 2010). Anschließend wird die Haut des Wirtes zunächst mit Hilfe der spitzzulaufenden Mandibeln angestochen und die Maxillen sowie das Labrum und der Hypopharynx durch die Einstichstelle unter die Haut gebracht (Becker et al. 2010). Das Labium wird während des Stich- und Saugaktes zurückgeschoben und verbleibt an der Oberfläche der Haut (Krenn und Aspöck 2012). Ist das Blutgefäß angestochen, wird das Blut mit Hilfe der Cibarial- und Pharyngeal-Pumpe in den Darm transportiert. Dabei kann ein Weibchen bis zur dreifachen Menge ihres Körpergewichtes an Blut aufnehmen (Becker et al. 2010). Bei der Aufnahme von

Pflanzensäften agieren die Pumpen mit gleicher Funktionsweise (Lehane 2005, Becker et al. 2010). Um eine Gerinnung des Blutes sowie eine Schmerz- und Allergieentwicklung während des Saugaktes zu unterbinden, werden über den Hypopharynx Speichel mit unterschiedlichsten Anti-Koagulantien oder Anti-Histaminen sowie schmerzstillende Verbindungen in die Wunde injiziert (Lehane 2005). Wie andere hämatophag lebende Organismen können auch Stechmücken über die Blutmahlzeit verschiedenen Krankheitserreger aufnehmen und wieder abgeben, wodurch sie eine hohe human-, aber auch veterinärmedizinische Bedeutung erlangt haben (z.B. Lehane 2005).

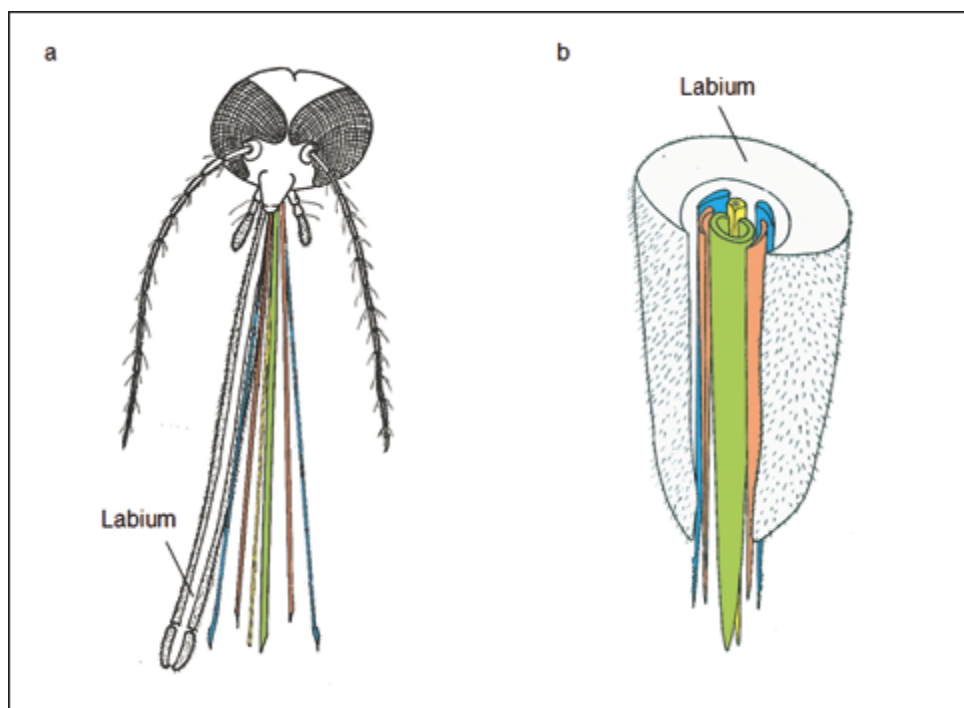


Abbildung 1.5 Schematischer Aufbau der Mundwerkzeuge weiblicher Culicidae (Stechmücken), die wie folgt farblich gekennzeichnet sind: Labrum (grün), Hypopharynx (gelb), Maxillen (blau) und Mandibeln (orange). (a) Kopf einer weiblichen Stechmücke mit der Position der Proboscis (Stechrüssel), deren Bauteile zur Veranschaulichung hier außerhalb des Labiums liegen. (b) Querschnitt der Proboscis, zusammengesetzt aus den einzelnen Komponenten und umschlossen vom Labium. (Abbildung nach Mackean 2015, Beschriftung und Farbkennzeichnung nach Becker et al. 2010)

Je nach bevorzugter Wirts-Gruppe werden Stechmücken als anthropophil oder zoophil bezeichnet, wobei hier meist noch eine Unterscheidung in ornithophil vorgenommen wird (Becker et al. 2010). Bevorzugt suchen Stechmücken Säugetiere auf. Weniger bekannt ist jedoch, dass es auch Arten gibt, die ihre Blutmahlzeiten vorzugsweise an Vögeln, Reptilien oder Amphibien aufnehmen (Lehane 2005, Rueda 2008, Burkett-Cadena 2013). Des Weiteren können Stechmücken anhand ihres bevorzugten Nahrungsaufnahme- und Rastverhaltens unterscheiden werden.

Neben tag- oder nachtaktiven Weibchen, können die Arten danach unterschieden werden ob sie außerhalb (exophag) oder innerhalb (endophag) von Behausungen auf Wirtssuche gehen oder dort nach der Blutmahlzeit rasten (exophil/endophil).

Diese Umstände sind vor allem bei der Bekämpfung von krankheitsübertragenden Stechmücken von großer Bedeutung, da ausgebrachte Insektizide den Gewohnheiten der zu bekämpfenden Art angepasst werden müssen (Lucius und Loos-Frank 2008).

1.5 Stechmücken als Krankheitserreger (medizinische Relevanz)

Die medizinische Relevanz von Stechmücken wurde erstmals im Jahr 1877 deutlich, als Sir Patrick Manson entdeckte, dass der Humanparasit *Wuchereria bancrofti* eine wichtige Entwicklungsphase innerhalb der Stechmücke *Culex quinquefasciatus* durchläuft (Lehane 2005). In den folgenden Jahren konnte zudem gezeigt werden, dass die Erreger der Malaria (Ross 1897), des Gelbfiebers (Reed et al. 1900) und des Denguefiebers (Graham 1902) durch Stechmücken übertragen werden (Lehane 2005). Ausgehend von diesen Entdeckungen entwickelte sich die wissenschaftliche Fachrichtung der medizinischen Entomologie (Tabachnik 2009). Mit der Entdeckung synthetischer Insektizide in den 1940er Jahren begannen umfassende Eliminierungs- und Kontrollprogramme, um den Infektionen mit Stechmücken-assoziierten Krankheiten entgegenzuwirken. Durch den Rückgang der Stechmücken, unter anderem durch die Trockenlegung ihrer Bruthabitate, konnten Krankheiten wie Gelbfieber oder Malaria stark zurückgedrängt werden, und galten in den 1960er Jahren in vielen Gebieten außerhalb Afrikas nicht länger als Gesundheitsproblem (Gubler 1998, WHO 2014b). Im Jahr 1973 wurde Europa als malariefrei deklariert (Krüger et al. 2014). Durch die erfolgreiche Eindämmung der krankheitsübertragenden Vektoren ergaben sich jedoch weltweit Aspekte wie rückläufige Kontrollprogramme und Prävention, wodurch seit den 1970er Jahren ein erneuter Anstieg der Infektionszahlen der zuvor erfolgreich eingedämmten Krankheiten zu verzeichnen ist (Gubler 1998, WHO 2014b). Mehr als die Hälfte der Weltbevölkerung lebt derzeit in Risikogebieten für vektor-assoziierte Erkrankungen, wobei Entwicklungsländer nach wie vor am stärksten betroffen sind. Malaria ist, was die absoluten Sterblichkeitszahlen angeht, die mit Abstand tödlichste Infektion, deren Erreger durch Vektoren übertragen wird. Fast 600 Tsd. Menschen, 90% davon in Ländern südlich der Sahara, sterben jährlich an den Folgen der Malaria. Obwohl die

Infektionen zwischen den Jahren 2000 und 2012 um 25% zurückgedrängt werden konnten, infizieren sich jährlich noch immer etwa 200 Mio. Menschen mit dieser durch Protozoen der Gattung *Plasmodium* verursachten Krankheit (DGVN 2014, Frank et al. 2014, WHO 2014b). Von allen durch Stechmücken übertragenen Krankheiten hat sich jedoch das Denguefieber innerhalb der letzten 50 Jahre am stärksten ausgebreitet. Jährlich erkranken rund 100 Mio. Menschen, häufig sind dabei Kinder betroffen. Übertragen wird dieser Flavivirus vor allem durch die Stechmückenart *Aedes aegypti* (Frank et al. 2014, WHO 2014b). Ein Grund für die schnelle Ausbreitung von Vektoren und Erregern stellt der in früheren Jahren intensive Einsatz von Insektiziden und Medikamenten gegen die Erreger dar, welcher zu Resistenzen innerhalb der Stechmücken- sowie den Erregerpopulationen führte (Haas 2005). Ein weiteres Problem ist, dass es für eine Vielzahl vektor-assoziiertes Krankheiten bislang keine Impfungen gibt (WHO 2014b).

Traten Krankheiten wie West-Nil-Fieber, Malaria, Denguefieber, Chikungunyafieber oder Gelbfieber früher zumeist in den tropischen Regionen der Erde auf, so sind sie heute auch in vielen Teilen der westlichen Welt ein ernstzunehmendes Problem (Gubler 1998). Sowohl der zunehmende internationale Reiseverkehr und (Waren-)Transport als auch der Klimawandel und die sozio-demographische Evolution sind Faktoren, welche innerhalb der letzten Jahrzehnte die Einschleppung sowie die Etablierung von Vektoren, Reservoirwirten und Pathogenen in neue Regionen stark begünstigt haben (Becker et al 2014a, RKI 2014). In den vorangegangenen Jahren traten beispielsweise Krankheiten wie das Chikungunyafieber (Italien 2007) oder das Denguefieber (Frankreich 2010/2013) in Europa auf (Rezza et al. 2007, Liunbruno et al. 2008, La Ruche et al. 2010, Marchand et al. 2013, RKI 2014). In allen Fällen wird vermutet, dass die eingeschleppte Art *Aedes albopictus* diese Viren übertragen hat (Bonilauri et al. 2008, Gould et al. 2010, Marchand et al. 2013).

Seit 1999 hat sich das West-Nil-Virus in Nordamerika rasant verbreitet. Im Jahr 2013 gab es dort rund 2500 Fälle, von denen 119 zum Tod führten. Die relative Sterblichkeitsrate lag mit 4,7% deutlich höher als die der Malaria mit 0,3% (CDC 2014, WHO 2014b). Jedoch gilt hier keine eingeschleppte Art als Hauptüberträger des Virus. Wahrscheinlicher ist eine veränderte Wirtspräferenz der heimischen *Culex* Arten durch z.B. die Ausbildung von Hybriden, die als Brückenvektoren zwischen Vögeln und Menschen dienen. So ist das West-Nil-Virus ein gutes Beispiel dafür, wie

ein neu eingeschleppter Krankheitserreger durch einheimische Stechmückenarten verbreitet werden kann (Turell et al. 2005, Kilpatrick et al. 2006).

Auch in Deutschland dienen nicht nur eingeschleppte, sondern auch einheimische Stechmückenarten als Überträger von Krankheitserregern (Anhang 1). Das Wissen um das Vektorpotential der heimischen Stechmücken konnte vor allem durch die seit 2009 initiierten Monitoring-Programme stetig erweitert werden (z.B. Becker et al. 2014a). Bereits im Jahr 1968 konnte das Tahyna-Virus erstmals in den Überschwemmungsmücken der Art *Aedes vexans* nachgewiesen werden. Das Batai-Virus, Sindbis-Virus sowie das Usutu-Virus wurden erstmals 2009 identifiziert und können z.B. durch die Arten *Culex pipiens*, *Culex torrentium* und *Anopheles maculipennis* s.l. übertragen werden (Jöst et al. 2010, Jöst et al. 2011a, 2011b, Becker et al. 2014a). Zudem wurde der Erreger *Dirofilaria repens* in deutschen Stechmücken nachgewiesen. Vektoren sind unter anderem *Culiseta annulata*, *Aedes vexans* sowie *Anopheles maculipennis* s.l. (Czaika et al. 2014). Auch die Erreger der Lyme-Borreliose, die Borrelien konnten bereits in heimischen Stechmücken detektiert werden (Melaun et al. submitted). Insgesamt können mindestens 32 der 51 in Deutschland nachgewiesenen Stechmückenarten Träger von Viren, Bakterien und Filarien sein (siehe Anhang 1).

1.6 Invasive Stechmückenarten

Bereits früher wurden durch den Handel Arten in Gebiete verbracht, in denen sie ursprünglich nicht heimisch waren und auch heute noch kommt es durch die Globalisierung immer wieder zur Einschleppung neuer Arten. Mehr als 1000 neue Tierarten sind bislang in Deutschland nachgewiesen worden, von denen ca. 250 als etablierte Arten gelten (BUND 2015, WWF 2014). Ein Teil der eingeschleppten Arten gilt als invasiv, das bedeutet, sie verbreiten sich sehr schnell und sind sowohl ökologisch als auch ökonomisch sowie gesundheitlich bedenklich (BUND 2015). Neben den bekannten Arten wie dem nordamerikanischen Waschbär, dem asiatischen Marienkäfer oder dem Grauhörnchen sind seit den späten 1990er Jahren auch zunehmend einige Stechmückenarten bekannt, die sich in Deutschland und Europa ausbreiten (Becker et al. 2014a, Petrić et al. 2014, WWF 2014). Derzeit leben ca. 45% der europäischen Bevölkerung in Gebieten mit dem Risiko invasiver Stechmücken sowie den Pathogenen, die sie übertragen könnten (Petrić et al. 2014).

Die wichtigsten Arten sind *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Aedes atropalpus* sowie *Aedes koreicus* und *Ochlerotatus japonicus japonicus* (Schaffner et al. 2013, ECDC 2014a-e). Als weltweit invasivste Stechmückenart gilt *Aedes albopictus* (Asiatische Tigermücke), welche ursprünglich aus den tropischen Wäldern Südostasiens stammt und sich in den letzten 30 Jahren rasant verbreitet hat (Buhagiar 2009). Die Gefahr, die von dieser Art ausgeht, besteht vor allem in der Vielzahl an Pathogenen, für die bereits eine Vektorkompetenz sowohl im Labor als auch in wildgefangenen Tieren nachgewiesen worden ist (siehe Anhang 1, Petrić et al. 2014). Des Weiteren stellt das breite Wirtsspektrum ein enormes Problem dar, wodurch Weibchen von *Aedes albopictus* als sogenannte Brückenvektoren fungieren können (Eritja et al. 2005, ECDC 2014b). Als Hauptverbreitungsmechanismen werden der Handel mit Altreifen sowie mit Glücksbambus angenommen (Scholte et al. 2008a, Roiz et al. 2011). In Europa wurde *Aedes albopictus* erstmals 1979 in Albanien nachgewiesen (Adhami und Reiter 1998). Seit 1990 ist die Art für Italien beschrieben, wo sie heute ihre Hauptverbreitung für Europa hat (siehe Abbildung 1.6, ECDC 2014b). Nach Deutschland wird *Aedes albopictus* bislang nur sporadisch eingeschleppt, konnte aber bisher keine stabilen Populationen ausbilden (Becker und Hoffmann 2011, Werner et al. 2012, Kampen et al. 2013). Studien haben jedoch gezeigt, dass Populationen im gemäßigten Klima, in der Lage sind, Eier für die Diapause zu produzieren, wodurch auch kältere Temperaturen überstanden werden können (Hanson und Craig 1995, Roiz et al. 2011). Durch die Adaptation an kälteres Klima besteht also die Gefahr, dass mit *Aedes albopictus* auch Krankheitserreger in nördlichere Gebiete vordringen und sich dort etablieren könnten (Paupy et al. 2009). Eine weitere wichtige invasive Stechmückenart ist *Ochlerotatus j. japonicus* (asiatische Buschmücke), welche ursprünglich aus Japan, Korea, China und Taiwan stammt (Tanaka et al. 1979, Bevins 2007). Erstmals in Europa konnte diese Art im Jahr 2000 in Nordfrankreich nachgewiesen werden, wo sie sich jedoch nicht etablieren konnte (Schaffner et al. 2003). Seit 2008 wird *Oc. j. japonicus* regelmäßig in Deutschland nachgewiesen und konnte in den letzten Jahren stabile Populationen in Baden-Württemberg sowie in Nordrhein-Westfalen, Rheinland-Pfalz und Niedersachsen ausbilden (Becker et al. 2011, Werner und Kampen 2013).

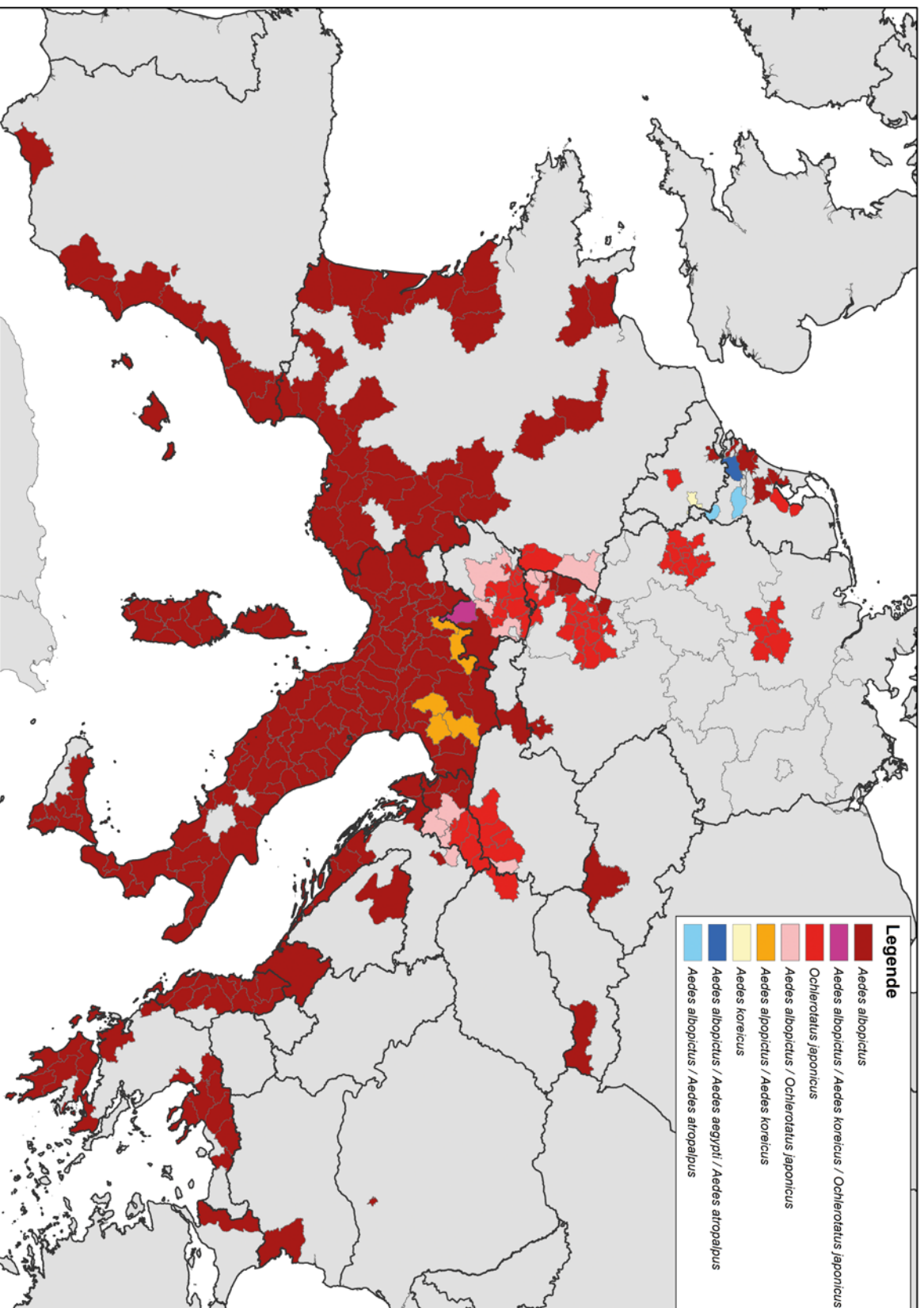


Abbildung 1.6 Darstellung der invasiven Arten *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Aedes atropalpus*, *Aedes koreicus* sowie *Ochlerotatus japonicus* in Europa. Unterschiedliche Farben stehen entweder für den Nachweis einer Art allein oder zusammen mit anderen hier aufgelisteten invasiven Arten (siehe Legende). Bei den Nachweisen wurde keine Unterscheidung zwischen etablierten oder eingeschleppten Populationen vorgenommen. Nicht dargestellt sind die Nachweise für: *Aedes aegypti* – Georgien sowie Russland (Schwarzmeer Küste); *Aedes albopictus* – Russland (Schwarzmeer Küste); *Aedes koreicus* – Russland (Schwarzmeer Küste). (nach ECDC Stand Januar 2015)

Zudem ist *Oc. j. japonicus* in Belgien, der Schweiz, Frankreich, Österreich sowie in Slowenien nachgewiesen worden (siehe Abbildung 1.6, ECDC 2014e). Wie bereits bei *Aedes albopictus* wird auch hier der Handel mit Gebrauchtreifen als Haupteintragsquelle betrachtet (Versteirt et al. 2009, Huber et al. 2012). *Ochlerotatus j. japonicus* besitzt unter anderem Vektorkompetenz für das West-Nil-Virus (Sardelis und Turell 2001), das Chikungunya- und Dengue-Virus (Schaffner et al. 2011) oder das Rift-Valley-Fieber-Virus (Turell et al. 2013) (siehe auch Anhang 1).

Die ebenfalls als invasiv angesehenen Arten *Aedes koreicus*, *Aedes atropalpus* und *Aedes aegypti* sind in Europa noch durch einzelne kleinere Vorkommen repräsentiert, könnten sich in den nächsten Jahren jedoch weiter ausbreiten. Auch sie sind von medizinischem Interesse, da sie beispielsweise als Überträger des Gelbfieber-Virus (*Aedes aegypti*), des West-Nil-Virus (*Aedes atropalpus*) oder des Japanischen Encephalitis-Virus fungieren können (ECDC 2014a,c,d). Für eine effektive Kontrolle dieser invasiven Arten ist es wichtig, die Haupteintrags- und Verbreitungswege, die Wirtspräferenzen sowie ihre Ökologie und Vektorkompetenzen zu kennen.

1.7 Artdiagnostik

Bis vor 30 Jahren, bedurfte es fundierter taxonomischer Kenntnisse, um Vektoren wie Stechmücken (Diptera: Culicidae) identifizieren zu können. Um mögliche Krankheitserreger zu analysieren, mussten diese zunächst aus dem Vektor isoliert oder mit speziellen Färbemethoden sichtbar gemacht werden (Aspöck 2008). Beide Verfahren erforderten sowohl Erfahrung als auch Zeit (Boenigk und Wodniok 2014). Auch heute noch ist die morphologische Bestimmung der Culicidae ein wichtiger Schritt in der Untersuchung der Vektorpopulationen. Allerdings ergibt sich dabei eine Vielzahl von Problemen, welche die Bestimmung der Arten nicht immer einfach macht. Besonders zu erwähnen sind die verfügbaren Bestimmungsschlüssel, in denen meist nur die morphologischen Merkmale bestimmter Entwicklungsstadien wie Larven oder weiblichen Culicidae berücksichtigt sind (Mohrig 1969, Tanaka et al. 1979, Becker et al. 2010). Da sich jedoch bei Larven durch die Wachstumshäutungen die Form der Kopfkapsel sowie die Anzahl der Setae und Pektenzähne verändert, ist eine eindeutige Bestimmung erst mit dem Erreichen des L4-Stadiums möglich. Auch bei vielen weiblichen Culicidae basiert eine eindeutige Bestimmung vor allem auf Setae und Schuppen, welche jedoch leicht auf natürliche

Weise, z.B. während des Fliegens, verloren gehen können (Becker et al. 2010). Durch das Fangen der Tiere sowie den Transport in das Labor kann es ebenfalls zu einem Verlust der bestimmungsrelevanten Merkmale kommen, wodurch eine eindeutige Identifizierung erschwert wird. Eine weitere Herausforderung stellen Artkomplexe und Hybride zweier Arten dar. So sind Vertreter des *Anopheles maculipennis*-Komplexes beispielsweise nur anhand des Eichenrions voneinander zu unterscheiden, während eine Identifizierung der Larven und Adulttiere nahezu unmöglich ist (Becker et al. 2010). Eine eindeutige Identifizierung ist jedoch essentiell, da einige Vertreter als Vektoren für die Malariaerreger *Plasmodium* spp. fungieren können (siehe Anhang 1, Hemmer et al. 2007, Lundström et al. 2013). Auch die Vertreter des *Culex pipiens*-Komplexes sind morphologisch nur sehr schwer zu unterscheiden, können aber z.B. Krankheiten wie das West-Nil-Virus übertragen. Des Weiteren bilden einige Vertreter Hybride aus (Crabtree et al. 1997, Rudolf et al. 2013, Silberbush et al. 2014), deren eindeutige Bestimmung besonders wichtig ist, da diese als Brückenvektoren für Erreger zwischen Mensch und Tier fungieren können und so medizinisch von besonderem Interesse sind (Rudolf et al. 2013). Ein weiteres Problem bei der Bestimmung können zudem neu eingeschleppte Arten sein, zu denen keine genauen ökologischen und morphologischen Merkmale vorliegen und für die Bestimmungsschlüssel aus den Ursprungsländern herangezogen werden müssen (z.B. Tanaka et al. 1979 für *Oc. j. japonicus*). Durch die Entwicklung verschiedener PCR-basierter Assays sowie günstiger Sequenzierungstechniken und die Speicherung von Gensequenzen wird heute eine detaillierte Analyse von Vektoren sowie der durch sie übertragenen Krankheitserreger ermöglicht, welche von morphologischen Aspekten unabhängig sind (Aspöck 2008).

Die gängigste Methode für die molekularbiologische Artbestimmung ist die Analyse von sogenannten Markergenen. Diese Gene können bei Tieren entweder im Zellkern oder im Mitochondriengenom (Cytochrom c Oxidase Untereinheiten I, II und III (cox1-3), Cytochrom b (Cyt b) oder NADH Dehydrogenase Untereinheit 4 (NADH4)) codiert sein. Der Vorteil der im Mitochondrium codierten Gene liegt insbesondere in der hohen Kopienzahl, in denen sie vorliegen, wodurch sie leichter zugänglich sind als sogenannte „single copy“ Gene im Kerngenom. Zudem unterliegen diese Gene keiner Rekombination, evolvieren jedoch schneller als Kerngene, da die mitochondrielle Replikation fehlerhafter ist (Saccone et al. 1999, Kumar et al. 2007, Storch et al. 2013). Dadurch entstehen schneller genetische Unterschiede zwischen

Arten. Andere Methoden beruhen auf der Analyse unterschiedlicher DNA-Fragmentlängen (z.B. Mikrosatelliten-Analyse, AFLP-Analyse oder DNA-Fingerprinting) (Storch et al. 2013). Für die Identifizierung von Stechmücken wurden bislang die Gene NADH4 sowie *ace-2* (Intron 2 der Acetylcholinesterase) und ITS2 (inner transcribed spacer) oder Allozymmarker eingesetzt (Smith und Fonseca 2004, Fedorova und Shaikevich 2007, Schaffner et al. 2009, Weitzel et al. 2011). Auch Endosymbionten können für die Identifizierung herangezogen werden. So konnten Infektionen mit Wolbachien bislang nur in *Cx. pipiens*, aber nicht in *Cx. torrentium* nachgewiesen werden (Fedorova und Shaikevich 2007, Shaikevich 2007). Am häufigsten wird jedoch das Genfragment der Cytochrom c Oxidase Untereinheit 1 (*cox1*) für die Artbestimmung genutzt (Kumar et al. 2007, Hesson et al. 2010, 2014, Kampen et al. 2012, 2013, Engdahl et al. 2014). Obwohl die molekularen Methoden stetig zunehmen, wird auch weiterhin nach morphologischen Merkmalen gesucht, um Arten voneinander unterscheiden zu können. So zeigten Börstler et al. (2014), dass eine Unterscheidung zwischen den Schwesternarten *Cx. pipiens* und *Cx. torrentium* durch die Flügeläderung möglich ist.

Auch die durch Stechmücken übertragenen Pathogene stellen die Wissenschaft immer wieder vor Herausforderungen. So gibt es für die Bakterien der Gattung *Borrelia* zahlreiche PCR Assays um eine Identifizierung durchführen zu können, dennoch ist es nur schwer möglich eindeutige Ergebnisse zu erzielen (Melaun et al. submitted). Für die Diagnose von Dirofilarien oder Plasmodien in Stechmücken wurden direct-PCRs etabliert, mit denen ein schneller und kostengünstiger Nachweis dieser Pathogene möglich ist (Fuehrer et al. 2011, Silbermayer et al. 2013).

1.8 Stechmückenforschung in Deutschland

Obwohl Stechmücken ein enormes medizinisches und ökologisches Problem darstellen können, ist die Stechmückenforschung in Deutschland erst innerhalb der letzten zehn Jahre wieder intensiviert worden. Nachdem in Deutschland und anderen Ländern Europas die Malaria in den 1970er Jahren als ausgerottet galt, nahm das (Forschungs-)Interesse an Stechmücken rapide ab (Krüger et al. 2014). Eine der letzten umfassenden Arbeiten zur Fauna deutscher Stechmücken geht zurück auf Mohrig (1969) (Maier et al. 2003). Eine Ausnahme hierbei bildet das Gebiet der Rheinauen zwischen Bingen im Norden und Sasbach/Kaiserstuhl im Süden auf insgesamt 300 Rhein-Kilometern. Seit Mitte der 1970er Jahre werden hier bei den

meist jährlich auftretenden Hochwassern Stechmückenbekämpfungsmaßnahmen durchgeführt und das Vorkommen der Arten dokumentiert (KABS 2014).

Mit voranschreitendem Klimawandel sowie dem stetig wachsenden Güter- und Reiseverkehr sind Stechmücken (Culicidae) in den letzten Jahren erneut in den Fokus der Wissenschaft gerückt (Becker et al. 2014a). Im Jahr 2011 wurden vier Projekte zur Untersuchung der Stechmückenfauna in Deutschland initiiert, welche im Jahr 2014 beendet wurden. Die Ziele dieser Projekte waren vor allem die Erfassung der in Deutschland zu findenden Stechmückenarten sowie die Aufklärung von deren Vektorpotential für verschiedene Krankheitserreger (Becker et al. 2014a). Wie effektiv eine solch umfassende Überwachung ist, zeigen die Erstnachweise von invasiven Arten wie *Culiseta longiaerolata* (Becker und Hoffmann 2011), *Aedes albopictus* sowie *Ochlerotatus japonicus japonicus* (Werner et al. 2012). Durch das stetige Monitoring konnte zudem gezeigt werden, dass sich *Oc. japonicus japonicus* an verschiedenen Stellen in Deutschland etablieren konnte (Kampen et al. 2012, Werner und Kampen 2013). Des Weiteren konnten Pathogene wie Dirofilarien, Borrelien, das Sindbis- sowie das Usutu- und Batai-Virus in deutschen Stechmücken nachgewiesen werden (Jöst et al. 2010, Jöst et al. 2011a, Jöst et al. 2011b, Czajka et al. 2014, Melaun et al. submitted).

1.9 Zielsetzung der Arbeit

In den letzten Jahren konnten durch die neu initiierten Monitoring- und Forschungsprogramme auf dem Gebiet der Stechmücken (Culicidae) in Deutschland zunehmend neue Erkenntnisse bezüglich der heimischen Stechmückenfauna erworben werden. Dennoch ist hinsichtlich der Biologie, Ökologie sowie Genetik vieler Arten noch immer wenig bekannt. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Analyse der genetischen Variabilität sowie der Zoogeographie der untersuchten Arten und der Etablierung einer schnellen und kostengünstigen Methode zur Artdiagnostik. Besonderes Augenmerk wurde bei den Analysen auf die beiden heimischen Arten *Culex pipiens* und *Culex torrentium* sowie die invasive Art *Ochlerotatus japonicus japonicus* gelegt. Die gewonnenen Erkenntnisse liefern einen Beitrag, Wissenslücken zu füllen und so bestehende Monitoring-Programme und Analysen zur Vektorkompetenz besser an die betreffenden Arten anpassen zu können.

2 Ergebnisse

2.1 Werblow A, Bolius S, Dorresteyn AWC, Melaun C, Klimpel S (2013) Diversity of *Culex torrentium* Martini, 1925 – a potential vector of arboviruses and filaria in Europe. Parasitology Research 112 (7): 2495-2501

2.1.1 Zusammenfassung

Die Gattung *Culex* (*Cx.*) umfasst weltweit rund 768 Stechmückenarten, welche in 26 Untergattungen unterteilt werden (Harbach 2011, Hesson 2014). In Europa ist die Gattung mit 14 Arten vertreten, von denen die Arten *Cx. theileri*, *Cx. univittatus*, *Cx. pipiens* Biotyp *pipiens*, *Cx. pipiens* Biotyp *molestus*, *Cx. modestus* sowie *Cx. torrentium* auch für Deutschland beschrieben sind (Becker et al. 2010, 2014a, 2014b). Die ornithophile Art *Cx. torrentium* wurde 1925 erstmals von Martini beschrieben, ihre ebenfalls ornithophile Schwesterart *Cx. pipiens* bereits im Jahr 1758 von Linnaeus (Becker et al. 2010). Vor allem in Mitteleuropa ist eine Unterscheidung zwischen *Cx. torrentium* und *Cx. pipiens* schwierig, da sich beide Arten durch eine ähnliche Habitatwahl auszeichnen. Auch die Morphologie der Weibchen und Larven ist nahezu identisch, wodurch die Möglichkeit der Artidentifizierung anhand reiner morphologischer Merkmale stark eingeschränkt ist (Scherpner 1960, Service 1968, Vinogradova et al. 2007, Weitzel et al. 2009, Becker et al. 2010, Börstler et al. 2014). Dies führte zu einer unzureichenden Unterscheidung beider Arten in früheren Studien, in denen sie entweder unter dem Pseudonym *Cx. pipiens/torrentium* zusammengefasst (Schäfer et al. 2004) oder *Cx. torrentium* fälschlicher Weise als *Cx. pipiens* identifiziert wurden (Weitzel et al. 2011, 2014). Für *Cx. torrentium* ergibt sich daraus ein europäisches Verbreitungsmuster, welches sich lediglich auf Daten weniger identifizierter Männchen stützt (Hesson et al. 2011). Als Vektoren für Arboviren wie das West-Nil-Virus (*Cx. pipiens*) oder das Sindbis-Virus (*Cx. torrentium*) besitzen beide Arten sowohl human- als auch veterinärmedizinische Bedeutung. Daher ist nicht nur eine eindeutige Artidentifizierung, sondern auch das Wissen über die Verbreitung einer jeden Art essentiell (Lundström et al. 1990a, 1990b, Jöst et al. 2010, Hesson et al. 2011). Des Weiteren kann eine eindeutige Differenzierung Auswirkungen auf die Abschätzung

weiterer Vektorkompetenzen sowie Überwachungs- und Kontrollprogramme haben (Weitzel et al. 2014).

Im Rahmen der Studie „Diversity of *Culex torrentium* Martini, 1925 – a potential vector of arboviruses and filaria in Europe.“ wurden sowohl die Abundanz als auch die Verteilung und die genetische Variabilität von *Cx. torrentium* im Vergleich zu *Cx. pipiens* im Rhein-Main-Gebiet untersucht. Die Proben (Larven und Adulte) wurden während der Monate Mai bis Oktober 2012 an neun Standorten in einem Umkreis von 50 km um die Stadt Frankfurt am Main gesammelt und im Labor molekularbiologisch aufgearbeitet. Sowohl die Identifizierung der Arten als auch die anschließenden Analysen zur Verbreitung und Populationsstruktur wurden anhand des 658 bp langen Genabschnittes der mitochondrial codierten Cytochrom c Oxidase Untereinheit 1 (cox1), ausgehend von der Primerkombination LCO 1490/HCO 2198 (Folmer et al. 1994), durchgeführt.

Insgesamt wurden 101 Individuen der Art *Cx. torrentium* und 252 Individuen der Art *Cx. pipiens* zugeordnet. Ein Vergleich der Vorkommen zeigte, dass beide Arten an fünf der neun untersuchten Standorte zusammen und an je zwei Fangpunkten allein gefunden werden konnten. Jedoch konnte kein bestimmtes Verteilungsmuster der Arten nachgewiesen werden. Des Weiteren ergab die Sequenzanalyse trotz der geringeren Individuenzahl in *Cx. torrentium*, 16 Haplotypen für diese Art und nur sieben für *Cx. pipiens*. Zudem konnte bei *Cx. torrentium* eine höhere Anzahl an Substitutionen (bis zu vier) innerhalb eines Haplotypen festgestellt werden. Somit wurde nicht nur eine interspezifische Variabilität in der mitochondrialen DNA der beiden Arten, sondern auch eine deutlich höhere intraspezifische Variabilität des Genabschnittes bei *Cx. torrentium* nachgewiesen. Die genetische Variabilität innerhalb von *Cx. torrentium* könnte ein Grund dafür sein, dass bislang keine morphologischen Charakteristika (außer die männlichen Genitalien) gefunden wurden, die allen Individuen von *Cx. torrentium* eigen sind und die Art eindeutig von *Cx. pipiens* differenzieren. Des Weiteren könnten sie ein Hinweis auf das Vorhandensein kryptischer Arten innerhalb von *Cx. torrentium* sein. Genetisch sehr variable Vertreter oder kryptische Arten könnten Hybride untereinander oder mit anderen Arten wie z.B. der anthropophilen Art *Cx. pipiens* biotyp *molestus* ausbilden, wodurch es zu veränderten Nahrungspräferenzen und Vektorkompetenzen sowie zu Brückenvektoren zwischen Tier und Mensch kommen kann. Ob es sich bei *Cx. torrentium* um eine genetisch variable Art handelt oder sich diese Art in kryptische

Arten aufspaltet, muss in weiteren Untersuchungen nicht nur anhand mitochondrieller, sondern auch unter der Nutzung nuklearer Markergene analysiert werden. Die Verwendung verschiedener Markergene sowie die geographische Ausweitung der Untersuchungen könnten weitere Informationen zur Ökologie sowie der Vektorbiologie der Arten liefern.

2.2 Werblow A, Klimpel S, Bolius S, Dorresteyn WC, Sauer J, Melaun C (2014) Population structure and distribution patterns of the sibling mosquito species *Culex pipiens* and *Culex torrentium* (Diptera: Culicidae) reveal different evolutionary paths. PLoS One 9: e102158

2.2.1 Zusammenfassung

Seit dem 19. Jh. sind Stechmücken als Überträger von Krankheiten wie Malaria, Dengue-Fieber, Gelbfieber oder dem Chikungunya-Fieber bekannt (Dreyer et al. 2000, Avšič-Zupanc 2013). Vor allem in Deutschland sind Untersuchungen zur heimischen Stechmückenfauna sowie deren Vektorkompetenz stark vernachlässigt und erst in den letzten Jahren wieder intensiviert worden (Krüger et al. 2014). Aufgrund des fortschreitenden Klimawandels sowie der Globalisierung stehen dabei immer häufiger sogenannte invasive Stechmückenarten wie die asiatische Buschmücke (*Ochlerotatus japonicus japonicus*) oder die asiatische Tigermücke (*Aedes albopictus*) im Fokus der Wissenschaft, da diese neue Krankheiten nach Europa und Deutschland bringen könnten (Becker et al. 2014a). Jedoch gibt es in Deutschland auch einheimische Stechmückenarten, die in der Lage sind, die Erreger von Krankheiten wie dem Sindbis-Virus, Ockelbo-Virus, Usutu-Virus, Batai-Virus sowie des West-Nil-Virus oder sogar Malaria zu übertragen (Hubálek 2008, Jöst et al. 2010, Jöst et al. 2011a, 2011b, Ventim et al. 2012, Avšič-Zupanc 2013). Ein besonderes human- und veterinärmedizinisches Interesse gilt dabei den Vertretern der Gattung *Culex* (Cx.). Die Art *Cx. pipiens* gilt als eine der häufigsten Stechmückenarten in Europa und Nordamerika und ist zudem einer der bedeutendsten Vektoren für das West-Nil-Virus (Fonseca et al. 2004, Diaz-Badillo et al. 2011, Hesson et al. 2014). Zusammen mit ihren Biotypen *Cx. pipiens pipiens* und *Cx. pipiens molestus* zählt sie zum sogenannten *Cx. pipiens*-Komplex, der zudem auch nicht europäische Arten wie *Cx. pipiens pallens*, *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. australicus* sowie *Cx. globocoxitus* einschließt (Farajollahi et al. 2011, Kothera et al.

2012). *Culex pipiens pipiens* gilt als anautogen, eurygam und ornitophil, wobei die Art in einigen Studien auch als anthropophil eingestuft wird (Vinogradova 2000, Fonseca et al. 2004, Weitzel et al. 2009, 2011). Die Larven der Art kommen in nahezu allen stehenden natürlichen und künstlichen Wasseransammlungen unterschiedlichster Eutrophierungsgrade vor (Weitzel et al. 2009). Eine weitere häufig auftretende Art ist *Culex torrentium*, welche als Schwesterart von *Cx. pipiens* gilt und unter anderem das Sindbis- und Ockelbo-Virus übertragen kann (Avšič-Zupanc 2013, Hesson et al. 2011, 2014). Da sich beide Arten hinsichtlich ihrer Ökologie sowie Morphologie stark ähneln, ist eine Identifizierung ohne molekularbiologische Methoden kaum durchzuführen (Smith und Fonseca 2004, Weitzel et al. 2011). Eine Identifikation auf Grundlage der Flügeläderung sowie der Struktur der männlichen Genitalapparate ist zwar möglich, erfordert jedoch Erfahrung in der Präparation (Weitzel et al. 2011, Börstler et al. 2014). Daten bezüglich der Verbreitung und der Populationsgenetik der beiden Arten stammen vorwiegend aus Schweden und Russland, während das Verteilungsmuster innerhalb Deutschlands noch weitestgehend unklar ist (Lundström et al. 1990a, 1990b, Vinogradova 2000, Vinogradova et al. 2007, Hesson et al. 2011). Das Wissen der Verbreitung und auch der Populationsstrukturen ist jedoch durchaus von Bedeutung, da beide Arten als Vektoren für Krankheitserreger bekannt sind. Dies und der Fakt, dass sie häufig in der Nähe menschlicher Siedlungen zu finden sind, lässt ihnen eine hohe medizinische Bedeutung zukommen (Hubálek 2008, Becker et al. 2010).

In der Studie „Population structure and distribution patterns of the sibling mosquito species *Culex pipiens* and *Culex torrentium* (Diptera: Culicidae) reveal different evolutionary paths.“ wurden die Verbreitungsmuster sowie erstmals die Populationsstrukturen der beiden Arten deutschlandweit untersucht. Die analysierten Tiere wurden zwischen März und Oktober 2012 an 25 Standorten in 22 Städten gefangen. Grundlage der molekularen Artidentifizierung sowie der phylogenetischen und phylogeographischen Untersuchungen war die Cytochrom c Oxidase Untereinheit 1 (cox1). Insgesamt konnten für *Cx. pipiens* 399 Individuen (250 Imagines, 120 Larven und 29 Puppen) sowie 198 Tiere (88 Imagines, 83 Larven und 27 Puppen) für *Cx. torrentium* eindeutig identifiziert werden. Durch eine etwas langsamere Entwicklung von *Cx. torrentium* weist diese Art etwa eine Generation weniger im Jahr auf (Becker et al. 2010), was die geringere Anzahl analysierter Tiere

erklären könnte. Die Verteilung der beiden Arten zeigte das Vorkommen von *Cx. pipiens* an 21 und von *Cx. torrentium* an 15 von 25 untersuchten Standorten.

Bereits die Anzahl der Haplotypen (*Cx. torrentium* = 27, *Cx. pipiens* = 24) wies auf eine stärkere genetische Differenzierung innerhalb der Art *Cx. torrentium* hin. Diese Vermutung wurde durch den Aufbau der Haplotypen-Netzwerke beider Arten bestätigt. So zeigte das Netzwerk von *Cx. pipiens* einen stark dominanten Haplotypen (H1), welcher nicht nur an allen Standorten, sondern auch bei über 90% der untersuchten Individuen nachweisbar war. Ein Grund für die Dominanz eines bestimmten Sequenztypes könnten die in *Cx. pipiens* nachweislich bekannten Infektionen mit Bakterien der Gattung *Wolbachia* sein, wodurch es zu innerartlichen Reproduktionsbarrieren und so zu einer reduzierten Mitochondrien-Diversität kommen kann (Sinkins et al. 2005, Khrabrova et al. 2009). Des Weiteren könnte die geringere genetische Variabilität in *Cx. pipiens* auf Faktoren wie genetischen Drift (z.B. Gründereffekt) oder aber einen Selektionsschub (z.B. positive Selektion) zurückzuführen sein. Dafür spricht auch der in einigen Populationen stark negative Tajimas'D-Wert (Tajima 1989, Jensen et al. 2005a). Die Unterschiede in der Zusammensetzung von Haplotypen zwischen einzelnen Standorten der jeweiligen Art wurden durch die Berechnung der paarweisen F_{ST} -Werte wiedergegeben. Auch hier zeigte sich eine wesentlich höhere Differenzierung in *Cx. torrentium*, deren Unterschiede zwischen geographisch nah beieinanderliegenden Populationen am höchsten waren. Die Analyse der molekularen Varianz (AMOVA) zeigte, dass ein Großteil der genetischen Variabilität innerhalb der Populationen von *Cx. pipiens* (88,4%) und *Cx. torrentium* (66,5%) zu suchen ist. Nur ein geringer Anteil war der Variation innerhalb der für die Analysen gewählten Gruppen (Tabelle 2, II) zuzuordnen. Die genetische Varianz, basierend auf der Distanz, die Populationen zueinander haben, konnte bei *Cx. pipiens* nur mit ca. 2% bei *Cx. torrentium* mit 5% erklärt werden. Die durch das Tamura-3-Parameter Modell berechneten genetischen Distanzen betragen für *Cx. pipiens* 0,01% und für *Cx. torrentium* 0,33%. Die genetische Distanz zwischen den beiden Arten betrug 3%.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass beide Arten deutliche Unterschiede in ihren Populationsstrukturen aufweisen und diese auf unterschiedliche evolutive Prozesse zurückzuführen sind. Während die Ergebnisse der Studie bei *Cx. pipiens* wahrscheinlich auf Faktoren wie Gendrift oder Selektion durch z.B. Insektizidresistenz oder Infektionen mit Wolbachien zurückzuführen sind, deuten die Ergebnisse für *Cx.*

torrentium darauf hin, dass durch eine geringe Ausbreitung der Art weniger genetischer Austausch stattfindet und die Populationen daher so stark voneinander differenziert waren (z.B. Populationen innerhalb Frankfurts). Welche Faktoren jedoch genau für die jeweiligen Strukturen verantwortlich sind, konnte nicht eindeutig geklärt werden.

2.3 Melaun C, Werblow A, Cunze S, Zotzmann S, Koch LK, Mehlhorn H, Dörge DD, Huber K, Tackenberg O, Klimpel S (2015) Modelling of the putative distribution of the arbovirus vector *Ochlerotatus japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae) in Germany. Parasitology Research 114: 1051-1061

2.3.1 Zusammenfassung

Invasive Stechmückenarten sind in der Lage, neue Regionen zu besiedeln und Einfluss auf die dortige Umwelt sowie die Gesundheit von Mensch und Tier zu nehmen. Seit in den späten 1990er Jahren die Art *Aedes albopictus* in Europa nachgewiesen wurde, kommt es immer wieder zur Einschleppung neuer Arten. Derzeit gelten fünf Arten aus den Gattungen *Aedes* und *Ochlerotatus* in Europa als etabliert. Neben *Aedes albopictus*, *Aedes aegypti*, *Aedes atropalpus* sowie *Aedes koreicus* ist auch die Art *Ochlerotatus japonicus japonicus* (*Oc.j. japonicus*, Asiatische Buschmücke) zunehmend nachgewiesen worden und gilt derzeit als drittinvasivste Art in Europa (Schaffner et al. 2013, ECDC 2014e). Ursprünglich stammt *Oc. j. japonicus* aus Japan, Korea sowie Teilen von Russland (Tanaka et al. 1979). Dort gehört sie zu einem Artkomplex, welcher sich aus vier Unterarten sowie einer nahverwandten Schwesternart zusammensetzt (Kaufmann und Fonseca 2014). Obwohl die Art in den Ursprungsländern nicht als Vektor für Krankheitserreger bekannt ist, zeigten Laborstudien, dass sie durchaus ein kompetenter Vektor für Erreger wie das Dengue-Virus, Chikungunya-Virus oder das West-Nil-Virus sein kann (Turell et al. 2001, Schaffner et al. 2011, ECDC 2014e). Letzteres konnte zudem aus wildgefangenen *Oc. j. japonicus* isoliert werden (Kampen und Werner 2014). Zusammen mit der Tatsache, dass die Art in Deutschland besonders im menschlichen Siedlungsraum anzutreffen ist und die Weibchen mammalophil sind, macht sie das hierzulande zu einem gesundheitlichen Risiko für Mensch und Tier (Melaun et al. 2015).

Die geographische Expansion dieser Art basiert vor allem auf dem Handel mit

gebrauchten Reifen sowie „Glücksbambus“, welcher aus Asien nach Europa exportiert wird. Als ein sogenannter „Containerbrüter“ mit der Fähigkeit kälte- und austrocknungsresistente Eier zu produzieren, ist *Oc. j. japonicus* in der Lage, sich über weite Strecken transportieren zu lassen. Zudem ist die Art wenig anspruchsvoll bezüglich ihrer Bruthabitate, wodurch sie sowohl ländliche als auch urbane Regionen besiedelt (Andreadis und Wolfe 2010, ECDC 2014e). Das erste Auftreten dieser Art außerhalb ihres ursprünglichen Verbreitungsgebietes wurde 1993 in Neuseeland registriert. Durch gezielte Bekämpfungsmaßnahmen konnte eine Etablierung jedoch verhindert werden (Laird et al. 1994). Ab 1998 etablierte sich *Oc. j. japonicus* in Nordamerika und ab 2002 auch in Europa (Peyton et al. 1999, Versteirt et al. 2009, Kampen und Werner 2014, Kaufman und Fonseca 2014). In Deutschland wird *Oc. j. japonicus* seit 2008 regelmäßig in Baden-Württemberg gefangen (Huber et al. 2014). Im Großraum Bonn wurde die Art im Jahr 2012, in Niedersachsen im Jahr 2013 nachgewiesen (Kampen et al. 2012, Werner und Kampen 2013). Aufgrund der bisherigen Funde kann davon ausgegangen werden, dass sich *Oc. j. japonicus* auch weiterhin in Deutschland und Europa ausbreiten wird, jedoch sind die Verbreitungsmechanismen dieser Art noch nicht vollständig geklärt (ECDC 2014e). Dies ist problematisch, da ein erfolgreiches Management invasiver Arten nur erfolgen kann, wenn die potentiellen Verbreitungsgebiete sowie Ausbreitungsmechanismen der betreffenden Art bekannt sind (Václavík und Meentemeyer 2012).

Basierend auf den bereits erhobenen Fangdaten von *Oc. j. japonicus* in Deutschland sowie verschiedenen Umweltvariablen wurde in der Studie „Modelling of the putative distribution of the arbovirus vector *Ochlerotatus japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae) in Germany.“ ein potentielles Verbreitungsmuster dieser Art mittels ökologischer Nischenmodellierung erstellt. Dabei wurden Orte, an denen die Art bislang nicht gefunden wurde, mit den klimatischen Bedingungen bereits bekannter Fundorte verglichen. Je höher die Ähnlichkeit der verglichenen Orte, desto höher ist auch die Wahrscheinlichkeit einer Ansiedlung der Art. Die daraus resultierenden Ergebnisse sollten mögliche neue Verbreitungsgebiete in Deutschland offenlegen, um existierende Monitoring-Programme darauf abzustimmen. Insgesamt sind 160 Fangpunkte aus den drei Bundesländern Baden-Württemberg (n=107), Nordrhein-Westfalen (n=30) sowie Niedersachsen (n=23) in die Berechnung des Modells eingeflossen. Zu einem Großteil stammten diese Daten aus der Literatur (Kampen et al. 2012, Werner und Kampen 2013, Huber et al. 2014) sowie aus eigenen

Monitoring-Untersuchungen. Die Berechnung des Modells von *Oc. j. japonicus* erfolgte mit der Software Maxent (Phillips et al. 2004, Phillips und Dudick 2008), mit der die mögliche Verbreitung der Art unter aktuellen klimatischen Bedingungen errechnet wurde. Die verwendeten Umweltvariablen basierten auf Daten des Deutschen Wetterdienstes (DWD), welche die Temperaturen sowie Regenmenge eines jeden Monats der Fangjahre 2011-2013 wiedergaben.

Anhand der in der Studie durchgeführten Berechnungen lassen sich neben den bereits bekannten Gebieten in Baden-Württemberg, Rheinland-Pfalz, Nordrhein-Westfalen sowie Niedersachsen auch Südhessen, das Saarland sowie nördliche Teile von Nordrhein-Westfalen als klimatisch günstige Gebiete für *Oc. j. japonicus* erkennen (Abbildung 1b und c, Anhang 3). Da die Verbreitung einer Art nicht nur von klimatischen Bedingungen, sondern auch anderen Faktoren wie beispielsweise der Geographie der Landschaft sowie vorhandenen Transportwegen abhängt, bietet die Nischenmodellierung nur einen Hinweis auf mögliche neue Verbreitungsgebiete.

In Nordrhein-Westfalen sowie Rheinland-Pfalz beispielsweise zeigte sich, dass die Fundorte für *Oc. j. japonicus* vor allem entlang des Rheins liegen. In Niedersachsen ist ein Großteil der Fundpunkte mit den Flüssen Weser sowie Mittellandkanal assoziiert. Dass Flüsse ein möglicher Verbreitungsfaktor sein können, wurde bereits von Bevins (2007) in den USA vermutet. Dort wurde die Art fast ausschließlich in Wasseransammlungen in Gesteinsmulden entlang der Hauptflüsse in den Appalachen nachgewiesen. Auch ist zu klären, inwieweit geographische Barrieren wie z.B. Gebirge einen Einfluss auf die Verbreitung von *Oc. j. japonicus* haben. Vor allem für Südhessen könnte dies interessant sein, da diese Region von Odenwald, Spessart und Taunus umgeben ist. Wie die Modellierung zeigt, wäre das Gebiet klimatisch passend. Dennoch konnte *Oc. j. japonicus* bislang nicht nachgewiesen werden. Welchen Einfluss Fließgewässer sowie Gebirge auf die weitere Etablierung von *Oc. j. japonicus* tatsächlich besitzen, könnten zukünftige Monitoring-Programme zeigen, welche anhand der hier durchgeführten Modellierung systematischer durchgeführt werden können.

2.4 Werblow A, Flechl E, Klimpel S, Zित्रा C, Lebl K, Kieser K, Laciny A, Silbermayr K, Melaun C, Führer H-P (2015) Direct PCR of indigenous and invasive mosquito species: a time and cost effective technique of mosquito barcoding.

2.4.1 Zusammenfassung

Jedes Jahr infizieren sich über 1 Mrd. Menschen weltweit mit vektor-assoziierten Krankheiten, zu denen auch die durch Stechmücken (Culicidae) übertragenen Erreger der Malaria, des Dengue-Fiebers, Gelbfiebers oder des West-Nil-Fiebers zählen. An den Folgen dieser Erkrankungen sterben jährlich rund 1,3 Mio. Menschen. Die meisten Infektionen sowie Todesfälle sind nach wie vor in den tropischen Regionen der Erde sowie in Entwicklungsländern zu verzeichnen (WHO 2014b). Dennoch stellen Stechmücken auch in unseren Breiten ein Gesundheitsrisiko dar (RKI 2014). Von den mehr als 3500 weltweit vorkommenden Stechmückenarten sind 51 Arten für Deutschland und 44 Arten für Österreich nachgewiesen (Becker et al. 2014b, Zित्रा und Waringer 2014). In den letzten Jahren wurden diese Zahlen immer wieder nach oben korrigiert, da durch den enormen Transport- und Reiseverkehr neue Arten wie z.B. *Ochlerotatus japonicus japonicus*, *Aedes albopictus* oder *Culiseta longiareolata* eingeschleppt wurden (Becker et al. 2014a, Keller et al. 2011, Zित्रा et al. 2014). Stechmücken haben nicht nur einen großen Einfluss auf die Gesundheit, sondern auch ökologische und sozioökonomische Effekte (RKI 2014, WHO 2014b). Somit ist das Wissen über ihre Verbreitung und das Potential, Krankheitserreger zu übertragen, besonders wichtig. Grundlage ist hierbei eine eindeutige Identifizierung der Arten, welche jedoch auch für Experten nicht immer einfach ist. So basieren Bestimmungsschlüssel ausschließlich auf bestimmten Entwicklungsstadien der Culicidae sowie Charakteristika, welche während des Fangens oder Transports leicht beschädigt werden oder verloren gehen können. Ein weiteres Problem stellen Artkomplexe dar, deren Vertreter morphologisch meist nicht zu unterscheiden sind (Mohrig 1969, Kumar et al. 2007, Becker et al. 2010). Auch Hybride sowie neu eingeschleppte Arten machen es den Experten teilweise sehr schwer eine eindeutige Identifizierung vorzunehmen (Rudolf et al. 2013). Viele der bisher etablierten molekularbiologischen Methoden zur Artidentifizierung basieren auf zuvor durchgeführten DNA-Extraktionen, um die für die Amplifizierung nötige Template DNA zu erhalten.

In der Studie „Direct PCR of indigenous and invasive mosquito species: a time and cost effective technique of mosquito barcoding“ wird eine Methode vorgestellt, die eine Amplifizierung des gewünschten Zielgens ohne vorherige DNA-Extraktion ermöglicht und so eine schnellere Artidentifizierung zulässt. Das zu untersuchende Gewebe wird „direkt“ in einen PCR-Reaktionsmix eingebracht und das Zielgen amplifiziert. Untersucht wurden 62 Culicidae (Stechmücken) von 28 unterschiedlichen Arten und zehn Gattungen. Zudem wurden unterschiedliche Aufbewahrungsmethoden (getrocknet, Raumtemperatur, Ethanol, -20°C, -80°C), Aufbewahrungszeiten (zwischen einem Monat und 3 Jahren) sowie Gewebemengen (Bein, Kopf, Larve, Imago) analysiert. Bei den untersuchten Tieren handelte es sich sowohl um Arten, die in Deutschland und Österreich heimisch sind, als auch um nicht heimische Arten.

Die durchgeführten Analysen basierten auf der Amplifikation eines ca. 658 bp langen Abschnitts der Cytochrom c Oxidase Untereinheit 1 (cox1). Insgesamt konnte dieser Genabschnitt bei 55 Individuen aus 27 Arten erfolgreich mit der direct-PCR amplifiziert werden. Bei fast allen Proben (n=44) genügte ein Bein des Tieres als Template für die PCR, aber auch die anderen Gewebemengen wiesen positive Ergebnisse auf. Zudem zeigten die Untersuchungen, dass die Aufbewahrung bei -20°C, -80°C und Ethanol sowie die Aufbewahrungszeit keinen Einfluss auf das Erzielen positiver Ergebnisse hatten. Negative Resultate waren bei den Arten *Anopheles algeriensis* (n=4) sowie *Aedes cinereus* (n=3) zu verzeichnen, deren Proben bei Raumtemperatur 18 Monate gelagert waren. Ein Grund für die hier negative direct-PCR könnte in der Methode der Lagerung zu suchen sein. Um einem Schädlingsbefall in Sammlungen vorzubeugen, werden diese oft mit dem Insektizid Dichlorvos behandelt, welches nachweislich einen negativen Effekt auf die DNA von Insekten hat (Espeland et al. 2010). Weitere Parameter, welche die direct-PCR beeinflussen können, stellen unter anderem die genutzten Primer sowie Polymerasen dar. In dieser Studie wurden die Primer von Kumar et al. (2007) genutzt, welche wie die Primer aus Folmer et al. (1994) ein Teilstück der Cytochrom c Oxidase Untereinheit 1 (cox1) flankieren. Datenbankanalysen ergaben, dass die Primer von Kumar et al. (2007) eine deutlich höhere Spezifität für Stechmücken aufwiesen. Die genutzte Phusion Polymerase weist eine sehr hohe Resistenz gegenüber möglichen Inhibitoren auf, wodurch eine Amplifizierung direkt aus Gewebe möglich ist (Thermo Fischer Scientific 2015).

Neben der Zeit- und Kostenersparnis durch eine nicht benötigte DNA-Extraktion ist die direct-PCR nicht von morphologischen Charakteristika abhängig, die wie bereits erwähnt schnell beschädigt werden können. Der Einsatz kleiner Gewebemengen ermöglicht zudem eine weitere Nutzung des Tieres, beispielsweise für Referenzsammlungen oder die Isolierung von RNA für die Virendiagnostik. Allerdings können mit dem in der direct-PCR erzeugten Amplifikat keine weiteren Untersuchungen (z.B. Amplifikation anderer Markergene wie *ace2* oder ITS) mehr durchgeführt werden. Des Weiteren ist kein DNA-Extrakt vorhanden, welches nachfolgende Untersuchungen erlaubt. Durch das verbliebene Material kann diese jedoch nachfolgend durchgeführt werden.

Dennoch ist die direct-PCR, basierend auf der schnellen Amplifikation der jeweiligen Zielgene, eine ideale Methode für eine schnelle Identifizierung von heimischen und invasiven Stechmücken sowie möglicher Krankheitserreger wie *Dirofilarien* (Silbermayer et al. 2013) oder Plasmodien (Fuehrer et al. 2011). Im Falle positiver Ergebnisse können so nötige Maßnahmen wie weitere Kontrollen und Überwachung der Arten oder die Behandlung von Patienten schneller ergriffen werden.

3 Diskussion

Im vorangegangenen Abschnitt dieser Dissertation wurden drei Einzelpublikationen vorgestellt, in denen die Zoogeographie und die genetische Variabilität in Deutschland heimischer und invasiver Stechmückenarten beschrieben wurden. Zudem wurde eine Methode erörtert, welche eine schnelle und kostensparende Artidentifizierung verschiedener Stechmückenarten erlaubt. Nachfolgend werden hier die wichtigsten Ergebnisse und Schlussfolgerungen dieser Publikationen nochmals aufgegriffen und zusammenfassend dargestellt. Abschließend werden weiterführende Fragestellungen, Probleme und Lösungsansätze diskutiert.

3.1 Artidentifizierung

Unerlässlich für alle Laboranalysen ist zunächst die eindeutige Artidentifizierung der zu untersuchenden Individuen. Insbesondere bei Stechmücken ist die Artidentifizierung ein wichtiger Teil der Forschung, da nur so Aussagen über die bestehende Fauna, eingeschleppte Arten, Verbreitungsgebiete sowie die Vektorkompetenzen gemacht werden können. Die klassische Methode der Artidentifizierung beruht auf der Auswertung morphologischer Charakteristika, welche mit verschiedenen Bestimmungsschlüsseln abgeglichen werden können und damit die Zuordnung des Individuums zu einer Art ermöglichen (Mohrig 1969, Tanaka et al. 1979, Becker et al. 2010). Ergänzt wird diese Methode heutzutage durch molekularbiologische Methoden. Diese sind vor allem dann von Bedeutung, wenn Individuen aufgrund fehlender oder beschädigter morphologischer Merkmale keiner Art eindeutig zugeordnet werden können. Auch bei Individuen, welche nur sehr schwer morphologisch unterscheidbar sind, wie z.B. bei Vertretern des *Anopheles maculipennis*- oder *Culex pipiens*- Komplex oder auch bei Hybriden zweier Arten, kommen molekularbiologische Methoden für die Artbestimmung zum Einsatz.

Derzeit ist eine Vielzahl von Methoden vorhanden, mit denen eine molekulare Artdiagnostik durchgeführt werden kann (Farajollahi et al. 2011, Weitzel et al. 2011, Melaun et al. 2015). Neben der Analyse von Mikrosatelliten, der AFLP - Analyse oder der Multiplex-PCR findet auch die klassische Sequenz-Analyse Anwendung (Storch et al. 2013, Rudolf et al. 2014). Hierfür werden meist sogenannte „Markergene“ durch PCR vervielfältigt und anschließend sequenziert. Die sich daraus ergebenden Sequenzen einer jeden Art gleichen einem „Produktbarcode“, welcher durch einen

Datenbankabgleich zur Identifizierung der Art genutzt werden kann (Ivanova et al. 2005, Steinke und Brede 2006, Boenigk und Wodniok 2014, IBOL 2015).

Bei allen in dieser Studie vorgestellten Analysen zur Artidentifizierung wurde ein Genabschnitt der Cytochrom c Oxidase Untereinheit 1 (*cox1*) untersucht. Dabei handelt es sich um ein Enzym der Atmungskette, welches im mitochondrialen Genom codiert ist und daher maternal vererbt wird. Bereits Projekte wie „The Barcode of Life“ nutzen diesen Genabschnitt, um genetische Referenzsammlungen verschiedener Lebewesen anzulegen (IBOL 2015). Für die Stechmückenart *Aedes aegypti* weist das komplette Gen dieses Enzyms eine Länge von ca. 1536 bp auf (Morlais und Severson 2002) und es gibt eine Vielzahl von Primerkombinationen, die je einen Teil dieses Gens flankieren (z.B. Folmer et al. 1994, Kumar et al. 2007, Kampen et al. 2013). Für die Artidentifizierung in den Publikationen (I und II) zu *Culex (Cx.) pipiens* und *Cx. torrentium* wurde die Primerkombination aus Folmer et al. (1994) genutzt. Der Vorteil dieser Kombination lag insbesondere darin, dass sie bereits für viele Metazoen angewendet wurde und so eine enorme Datenmenge in den Sequenzdatenbanken zum Abgleich verfügbar war (Folmer et al. 1994, Hebert et al. 2003a, b, Boenigk und Wodniok 2014). Insgesamt konnten so für den Großraum Frankfurt am Main 399 Individuen den Arten *Cx. modestus*=2, *Cx. torrentium*=101 und *Cx. pipiens*=252 zugeordnet werden. Auf Bundesebene wurden 597 Stechmücken analysiert, von denen 399 Tiere als *Cx. pipiens* und 198 Individuen als *Cx. torrentium* identifiziert wurden. In beiden Untersuchungen (I und II) wurde nicht zwischen den Arten *Cx. pipiens* Biotypen *Cx. pipiens pipiens* und *Cx. pipiens molestus* unterschieden. Die zwei Tiere der Art *Cx. modestus* wurden in weitere Analysen nicht einbezogen. Basierend auf der Artidentifizierung sowie den vorhandenen Sequenzdaten wurden anschließend die Zoogeographie (3.2) und die genetische Variabilität (3.3) beider Arten analysiert.

Auch für die in der Studie durchgeführte direct-PCR (IV) wurden zunächst die Primer aus Folmer et al. (1994) verwendet. Allerdings konnten nur für wenige Proben positive Amplifikationsergebnisse erzielt bzw. diese Ergebnisse oftmals nicht repliziert werden. Ein Datenbankabgleich der Primersequenzen mit unterschiedlichen Stechmückenarten ergab, dass diese Primer für einen Großteil der Arten zu unspezifisch waren, wodurch es bei der PCR zu fehlerhaften Ergebnissen kam. Ein weiterer Datenbankabgleich zeigte, dass die Primerkombination aus der Studie von Kumar et al. (2007) deutlich bessere Bindekapazitäten in den Sequenzen der

Stechmücken aufwies, woraufhin die Primer von Folmer et al. (1994) für die weiteren Analysen ersetzt wurden. Aufgrund der geringeren Datenmenge in den Datenbanken bezüglich der Primerkombination aus Kumar et al. (2007) kann eine eindeutige Artidentifizierung jedoch schwierig sein, da die erzeugte Sequenz nur mit der cox1-Komplettsequenz abgeglichen werden kann. Bei einem Abgleich der Sequenz generiert mit den Primern aus Folmer et al. (1994), überlappen sich die Genfragmente beider Primerkombinationen um nur ca. 400 bp.

3.2 Zoogeographie heimischer und invasiver Stechmückenarten

Durch die aktuellen Stechmücken-Monitoring-Programme in Deutschland ist es gelungen, das bereits vorhandene Wissen über das Vorkommen vieler Arten zu erweitern. Für Arten, die sich sowohl in ihrer Ökologie als auch Morphologie sehr ähnlich sind, ist eine Aussage über die genaue Verbreitung jedoch schwierig. In Deutschland trifft dies unter anderem auf die Schwesternarten *Culex (Cx.) pipiens* und *Cx. torrentium* zu, welche mit dem Nachweis verschiedener Pathogene stetig an medizinischer Bedeutung gewinnen (Hesson et al. 2011, 2014, Jöst et al. 2010, Jöst et al. 2011a, 2011b). Während die Verbreitung von *Cx. pipiens* weitgehend gut dokumentiert ist, stützen sich die Verbreitungsmuster von *Cx. torrentium* auf die Identifikation weniger Männchen, anhand derer eine eindeutige Unterscheidung der beiden Arten mit morphologischen Merkmalen vorgenommen werden kann (Weitzel et al. 2011). Die untersuchte Zoogeographie zeigte, dass sowohl *Cx. pipiens* als auch *Cx. torrentium* über weite Teile Deutschlands (keine Daten aus Baden-Württemberg und Bayern vorhanden) verbreitet sind. Die Studie von Weitzel et al. (2011) konnte beide Arten auch in Süddeutschland nachweisen, jedoch wurde vermutet, dass *Cx. torrentium* südlich des 48. Breitengrades nicht vorkommt. Studien von Alahmed (2012) belegen *Cx. torrentium* aber im östlichen Saudi-Arabien, welches deutlich unter dem 48. Breitengrad liegt.

Eine Studie von Hesson et al. (2011) aus Schweden zeigte, dass bei *Cx. torrentium* eine signifikante Korrelation zwischen der Zunahme des Breitengrades sowie der gefangenen Individuen zu verzeichnen war, diese Verteilung konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Ähnlich der Studie von Rudolf et al. (2013) konnte *Cx. torrentium* in den neuen Bundesländern weniger häufig nachgewiesen werden als im Westteil der Republik (Abbildung 1, II).

Die Zoogeographie der invasiven Art *Ochlerotatus japonicus japonicus* (*Oc. j. japonicus*) zeigt diese Art bislang in vier Bundesländern. Dabei weist sie das größte Vorkommen in Baden-Württemberg auf, wo sie im Jahr 2008 erstmals in Deutschland nachgewiesen wurde (Becker et al. 2011, Schaffner et al. 2009). Aufgrund der in dieser Studie durchgeführten ökologischen Nischenmodellierung konnte nicht nur gezeigt werden, dass die bisher besiedelten Gebiete für *Oc. j. japonicus* klimatisch günstig sind, sondern auch dass weitere Gebiete in Deutschland für die Ansiedlung dieser Art klimatisch vorteilhaft erscheinen. Besonders hervorzuheben sind hier Gebiete im westlichen Saarland, Südhessen sowie der nördliche Teil Nordrhein-Westfalens (Abbildung 1b, III). Diese Gebiete sollten in zukünftigen Monitoring-Programmen besonders berücksichtigt und intensiver beprobt werden, um bei positiven Befunden frühzeitige Maßnahmen zur Eindämmung der Ausbreitung dieser Art sowie zur Bevölkerungsaufklärung vornehmen zu können. Des Weiteren muss bei zukünftigen Beprobungen darauf geachtet werden, welchen Einfluss Fließgewässer sowie geographische Besonderheiten der Landschaft auf die Ausbreitung von *Oc. j. japonicus* haben können. In den USA ist die Art bereits in Wasseransammlungen im Uferbereich größerer Flüsse nachgewiesen worden, was die Vermutung nahelegt, dass die Tiere diese Flüsse als Transportweg nutzen könnten (Bevis 2007). Auch in der hier vorliegenden Studie konnte beobachtet werden, dass sich z.B. die Fangpunkte in Nordrhein-Westfalen hauptsächlich entlang des Rheins befanden (Abbildung 1a, III). Geographische Besonderheiten wie z.B. Gebirge, könnten ebenfalls einen Einfluss auf die weitere Verbreitung von *Oc. j. japonicus* haben, indem sie natürliche Barrieren darstellen, die von den Tieren nicht oder nur schwer überwunden werden können. Dies ist vor allem für die weitere Ausbreitung der Art von Baden-Württemberg in Richtung Südhessen interessant, da dieses Gebiet sowohl vom Odenwald, Spessart und Taunus umgeben ist.

Während die einheimischen Arten *Cx. pipiens* und *Cx. torrentium* neben urbanen Regionen auch im ländlichen Raum (z.B. Gründau-Rothenbergen) zu finden sind, ist die invasive Art *Oc. j. japonicus* in Deutschland wesentlich stärker mit dem menschlichen Siedlungsraum assoziiert, was die eigenen Funde dieser Art ausschließlich auf Friedhöfen bestätigen. Als sogenannter „Containerbrüter“ findet *Oc. j. japonicus* auf Friedhöfen ideale Fortpflanzungsbedingungen. Frische Schnittblumen sowie die Bepflanzung dienen als Kohlenhydratquelle, Vasen und Brunnen als Bruthabitate sowie Friedhofsbesucher, aber auch Vögel und andere

Tiere als Blutwirte (Vezzani et al. 2007). Auch *Cx. pipiens* und *Cx. torrentium* können häufig auf Friedhöfen nachgewiesen werden (Schaffner et al. 2009). Während der Fangperioden zu dieser Arbeit fiel auf, dass das Vorkommen von *Cx. pipiens* und *Cx. torrentium* in Anwesenheit von *Oc. j. japonicus* verringert schien. Bislang konnten jedoch keine statistischen Belege für eine Konkurrenz aufgezeigt werden. Auch Schaffner et al. (2009) konnten keine Anhaltspunkte dafür finden, dass *Cx. pipiens* oder *Cx. torrentium* auf Friedhöfen mit *Oc. j. japonicus* tatsächlich signifikant weniger vorkamen. Ob diese invasive Art zu einer Verringerung der heimischen Stechmücken-Fauna beiträgt, müssen weitere Monitoring-Programme zeigen, in denen nicht nur die invasiven Arten, sondern auch weiterhin gezielt die einheimischen Stechmückenarten untersucht werden.

Zusätzlich zur Zoogeographie ergaben die Untersuchungen der Arten *Cx. pipiens* und *Cx. torrentium* auf Bundesebene und im Großraum Frankfurt am Main, dass *Cx. pipiens* (n=651) im Vergleich zu *Cx. torrentium* (n=299) wesentlich häufiger nachgewiesen werden konnte. Einen Grund dafür könnte die Entwicklungsgeschwindigkeit beider Arten liefern, da die Intervalle zwischen den einzelnen Eiablagen bei *Cx. torrentium* länger sind als bei *Cx. pipiens* (Dahl 1988, Becker et al. 2010). Dadurch produziert diese Art eine Generation weniger im Jahr, was bei unregelmäßiger Beprobung der Standorte zu einer geringeren Abundanz von *Cx. torrentium* gegenüber *Cx. pipiens* führen kann. Zudem hat Dahl (1988) gezeigt, dass es bei einem gemeinsamen Auftreten der Arten zu einem Auskonkurrieren von *Cx. torrentium* durch *Cx. pipiens* kommt. Um hier jedoch genauere Aussagen treffen zu können, sollten Probenintervalle genauer gewählt und dokumentiert werden. Zudem müssen auch andere Faktoren, wie die Wahl der Fangmethode oder die zum Fangzeitpunkt herrschende Temperatur, als Einflussfaktoren auf das geringere Vorkommen von *Cx. torrentium* in Betracht gezogen werden. So lag der Anteil gefangener *Cx. torrentium* an Fangpunkten, an denen Fallen mit CO₂ betrieben wurden, meist deutlich unter dem von *Cx. pipiens* (z.B. Heldenbergen, Eberswalde, Dresden oder Lebus). Die strikt ornithophile Lebensweise von *Cx. torrentium* könnte dazu führen, dass CO₂ als Köder für diese Art nicht attraktiv genug ist und sie daher weniger in diesen Fallen zu finden war (Becker et al. 2010). Allan et al. (2006) zeigten, dass z.B. Federn die Anziehung von wirtssuchenden ornithophilen *Culex*-Arten verstärken können. Vor allem in BG-Sentinel-Fallen ist es möglich, zusätzliche Duftköder für bestimmte Stechmückenarten zu platzieren, jedoch hat hier der

Aktionsradius des Fallentyps einen erheblichen Nachteil. Aufgrund der notwendigen Stromversorgung der Falle mit einer kleinen Autobatterie oder Steckdosen sowie dem Anschluss einer CO₂-Flasche ist diese Falle für den Gebrauch in größeren Höhen nur bedingt geeignet (Biogents 2011). Das Wirtsspektrum von *Cx. torrentium* lässt diese Art jedoch eher in den höheren Lagen der Bäumen vermuten, in denen auch die potentiellen Wirte zu finden sind. Bereits Weitzel et al. (2011) vermuteten, dass eine Fallenhöhe zwischen 1-1,5 Metern für das Fangen von *Cx. torrentium* nicht ausreichend ist. Mit der Verwendung einer EVS-Falle kann dem Höhenproblem zwar entgegengewirkt werden, jedoch ist dieser Fallentyp nicht geeignet, um unterschiedliche Duftköder zu nutzen (Quarles 2003).

Auch *Cx. pipiens* ist als ornithophile Art bekannt, konnte jedoch in den Fallen teilweise häufig nachgewiesen werden (z.B. in Eichen, Frankfurt-Bockenheim oder Heldenbergen). Dies könnte unter anderem an einem anderen Wirtsspektrum im Vergleich zu *Cx. torrentium* liegen. Für beide Arten ist das genaue Wirtsspektrum nicht bekannt, jedoch konnte in einer diese Studie begleitenden Arbeit zur Wirtspräferenz verschiedener heimischer Stechmückenarten gezeigt werden, dass *Cx. pipiens* Feldsperlinge (*Passer montanus*) als Wirte nutzt (Kuwaja 2014). Diese Art bevorzugt Sämereien sowie Getreidekörner als Nahrung, welche in Bodennähe gesammelt werden, wodurch sich die Tiere in Fallenhöhe aufhalten (NABU 2014). Des Weiteren wurde in der Studie von Balenghien et al. (2006) *Cx. pipiens* häufig an Vögeln gefunden und abgesammelt, die sich unterhalb von einem Meter aufgehalten haben. Auch Flemings (1959) konnte zeigen, dass *Cx. pipiens* hauptsächlich Vögel als Wirte nutzt, die nahe des Bodens auftreten. Zudem zeigten Balenghien et al. (2006) und Fyodorova et al. (2006), dass *Cx. pipiens* Pferde und Menschen als Wirte nutzt, was eine erhöhte Attraktivität gegenüber CO₂ erklären könnte. Dass auch die Temperatur einen Einfluss auf den Fangerfolg einer jeweiligen Art haben kann, zeigte die schwedische Studie von Hesson et al. (2011), bei der *Cx. pipiens* bis zu einer Durchschnittstemperatur von bis zu 11,9°C, *Cx. torrentium* aber bis 10,5°C nachgewiesen wurde. Bereits Mohrig (1969) hat *Cx. torrentium* als eine kälteresistente Art beschrieben, was die Daten in Schweden bestätigt. Zudem konnten Küpper et al. (2006) *Cx. torrentium* im Großraum Bonn, aber auch in Brutgewässern mit Temperaturen bis zu 33,7°C nachweisen. Auch in der vorliegenden Studie wurden Larven von *Cx. torrentium* aus Regentonnen (Mönchengladbach) gesammelt, welche einer Umgebungstemperatur von bis zu

38°C ausgesetzt waren. Der Konkurrenzdruck zu *Cx. pipiens* könnte eventuell dazu geführt haben, dass sich *Cx. torrentium* an ein breiteres Spektrum abiotischer Faktoren angepasst hat. Aufgrund der für diese Studie fehlenden Temperaturmessungen der Brutgewässer kann jedoch keine abschließende Aussage über den Einfluss der Temperatur auf die gefundenen Verteilungsmuster der beiden Arten getroffen werden.

3.3 Genetische Variabilität und Populationsstruktur der Arten *Cx. pipiens* und *Cx. torrentium*

Signifikante Sequenzunterschiede stellen ein wichtiges Kriterium für die Artidentifizierung dar, sind jedoch auch ein wichtiges Merkmal von Lebewesen innerhalb von Populationen (ETH 2008, Storch et al. 2013). Dieses Maß an Variation ist wichtig, da eine Population nur dann evolvieren kann, wenn die Individuen erbliche genetische Variabilität besitzen auf die die unterschiedlichen Evolutionsfaktoren einwirken können (Purves et al. 2006).

Neben Faktoren wie Genfluss, genetische Drift, nicht-zufälligen Paarungen oder natürlicher Selektion bilden Mutationen die Hauptquelle für genetische Variabilität. Dabei handelt es sich im Wesentlichen um biochemische Prozesse, welche Veränderungen in der Erbsubstanz von Lebewesen bewirken (Storch et al. 2013, Kutschera 2008). Ausgelöst werden Mutationen z.B. durch Fehler bei der DNA-Replikation oder aber durch die Wirkung von Mutagenen wie radioaktiver Strahlung, wodurch die Struktur der DNA verändert werden kann.

Viele Mutationen sind sogenannte Punktmutationen, bei denen es zu einem Austausch eines Nucleotids durch ein anderes kommt (Brown 2007). Diese Punktmutationen lassen sich in zwei große Klassen einteilen: Die erste Klasse stellen sogenannte Transitionen dar. Dabei handelt es sich um Substitutionen, bei der eine Pyrimidin- gegen eine andere Pyrimidinbase oder ein Purin- gegen eine andere Purin-Base ausgetauscht wird (Knoop und Müller 2009). Sie stellen mit Abstand die häufigsten Substitutionen dar und können bei homologen Genen verwandter Arten bis zu 90% der Substitutionen ausmachen. Die zweite Klasse wird durch die wesentlich seltener auftretenden Transversionen repräsentiert. Dabei findet ein Austausch einer Purin-Base gegen einen Pyrimidin-Base oder umgekehrt statt. Aufgrund des redundanten genetischen Codes führt jedoch nicht jede Punktmutation im Gen auch zu einer Veränderung in der Aminosäure-Sequenz. Genau hier liegt der

große Vorteil in der Analyse von Nukleotid- gegenüber Aminosäuresequenzen. Sie sind nicht nur leichter zugänglich, sondern erfassen auch einen großen Bereich (ca. 25%) synonymen Substitutionen, welche später auf Proteinebene nicht sichtbar wären (Storch et al. 2013).

Auch das in dieser Arbeit untersuchte *cox1* Genfragment wies bei einem Vergleich der Sequenzen innerhalb der Arten verschiedenen Substitutionen auf. In der Studie des Rhein-Main-Gebietes (I) befanden sich diese Punktmutationen vor allem zwischen den Basen 1 und 300 sowie 567 und 659 des analysierten 659 bp langen Genfragmentes. Zwischen den Nukleotiden 300 und 566 (*Cx. pipiens*) sowie 364 und 541 (*Cx. torrentium*) konnten keine Substitutionen nachgewiesen werden, was für eine genetisch stabile Region innerhalb dieses Sequenzabschnittes sprechen könnte. Dies konnte in der bundesweiten Studie (II) jedoch nicht bestätigt werden, da hier auch in diesen zuvor substitutionsfreien Regionen Basenaustausche festgestellt wurden. In beiden Studien (I und II) wiesen *Cx. pipiens* und *Cx. torrentium* sowohl Transitionen als auch Transversionen auf.

Auf Basis der gefundenen Substitutionen wurden die generierten Sequenzen in genetische Varianten (Haplotypen) unterteilt. Dazu wurden die Sequenzen in einem Alignment so angeordnet, dass homologe Positionen untereinander zu stehen kommen (Knoop und Müller 2009). Die jeweils häufigste Sequenzanordnung (Haplotyp 1 = H1) wurde bei beiden Arten als Referenzsequenz angenommen und alle anderen Sequenzen daran ausgerichtet. Jede Sequenz, die im Vergleich zur Referenz Basenunterschiede aufwies, wurde einem Haplotypen zugeordnet, wobei Sequenzen mit gleichen Substitutionen dem gleichen Haplotyp entsprachen. Mit sieben und 23 Haplotypen für *Cx. pipiens* sowie 14 und 27 Haplotypen für *Cx. torrentium* zeigten die aus den Alignments ablesbaren Sequenzunterschiede eine deutliche genetische Variabilität zwischen *Cx. pipiens* und *Cx. torrentium*, aber auch eine intraspezifische Variabilität innerhalb der beiden Arten (I und II). Die höhere genetische Differenzierung von *Cx. torrentium* gegenüber *Cx. pipiens* wurde auch von Fedorova und Shaikevich (2007) in einer Studie aus Russland gezeigt.

Um darstellen zu können in welcher phylogenetischen Beziehung die einzelnen Haplotypen zueinander stehen, wurden mit dem von Clement et al. (2000) entwickelten Programm TCS 1.21 und der darin implementierten Methode der statistischen Parsimonie (Templeton et al. 1992) Haplotypen-Netzwerke rekonstruiert (II). Dabei wurden konkrete sequenzbezogene Verwandtschaftsbeziehungen

zwischen den einzelnen Haplotypen in die Berechnung einbezogen, wodurch veranschaulicht werden konnte, welcher Haplotyp von welchem abgeleitet ist. So erlauben Haplotypen-Netzwerke erste populationsgenetische Aussagen, die aus einem Stammbaum nicht zu entnehmen sind. Ein weiterer Vorteil gegenüber Stammbäumen ist, dass die Netzwerke auch hypothetische, ausgestorbene oder bisher nicht im Datensatz vorhandene Sequenzvarianten enthalten (Töpfer 2008). Im Netzwerk von *Cx. pipiens* zeigten sich neben den 24 nachgewiesenen auch 15 fehlende Haplotypen. Das Netzwerk von *Cx. torrentium* war wesentlich homogener und wies nur vier fehlende Sequenzvarianten auf (Abb. 2, II). Des Weiteren zeichneten sich die Netzwerke durch einen „Grundtypen“ aus, von dem fast alle anderen Haplotypen abgeleitet waren. Insbesondere bei *Cx. pipiens* konnte ein dominanter Haplotyp festgestellt werden, welcher in über 90% der analysierten Individuen und an allen Standorten vertreten war. Diese Dominanz eines bestimmten Sequenztypes könnte auch ein Grund für die geringere genetische Differenzierung in *Cx. pipiens* sein und ihren Ursprung in der in dieser Art nachgewiesenen Infektion mit Bakterien der Gattung *Wolbachia* haben. Dabei handelt es sich um Bakterien aus der Klasse α -Proteobacteria, welche vor allem bei Arthropoden und Nematoden parasitisch im Cytoplasma zu finden sind (Madigan et al. 2009, Zrzavý et al. 2013). Erstmals nachgewiesen im reproduktiven Gewebe von *Cx. pipiens* durch Hertig und Wolbach (1924), gehen heutige Schätzungen davon aus, dass bis zu 75% der Arthropoden mit Wolbachien infiziert sind (Werren 1997, Zrzavý et al. 2013). Eine Infektion mit diesen Bakterien hat vor allem Auswirkungen auf die Reproduktivität der Wirte. So kann es zu Inkompatibilität (O'Neill und Karr 1990, Clancy und Hoffmann 1996), Parthenogenese (Stouthamer et al. 1993) oder aber Feminisierung (Rousset et al. 1992) kommen. Tests von Yen und Baar (1973) zeigten, dass nicht infizierte Stechmücken-Weibchen zu mit Wolbachien infizierten Männchen inkompatibel sind, eine Kreuzung andersherum jedoch Nachkommen erzeugen kann. Zudem gibt es Studien, die belegen, dass sich bei *Culex* die Inkompatibilität bei der Kreuzung geographisch entfernter Individuen, die mit Wolbachien infiziert sind, bemerkbar macht (Guillemaud et al. 1997, Atyame et al. 2011). Durch diese Inkompatibilitäten kann es zu einer reduzierten Mitochondriendiversität kommen, wodurch der stark dominante Haplotyp erklärt werden könnte (Ballard et al. 1996, Sinkins et al. 2005). Bei *Cx. torrentium* konnte eine Infektion mit diesen Bakterien bislang nicht nachgewiesen werden (Vinogradova et al. 2007).

Sowohl für die Erstellung eines Stammbaumes als auch von Haplotypen-Netzwerken ist die Wahl des Markergens von entscheidender Bedeutung. Dabei kommt es darauf an, dass es mit der richtigen Geschwindigkeit evolviert, die die jeweilige Fragestellung berücksichtigt. So sollte für die Analyse phylogenetisch alter Gruppen kein Gen verwendet werden, das schnell evolviert, da es durch multiple Substitutionen zu einem Verlust der ursprünglichen phylogenetischen Informationen kommen kann. Bei der Untersuchung von jungen Gruppen kann es passieren, dass keine Unterschiede zu finden sind, falls das Gen zu langsam evolviert. Zudem sollte berücksichtigt werden, dass die aufgezeigte Phylogenie nicht immer mit der tatsächlichen übereinstimmen muss. Insbesondere bei der Analyse von Mitochondriengenomen, wie dem hier verwendeten *cox1*-Genfragment, welches maternal vererbt wird, kann es durch die Anwesenheit von Hybriden zu Unstimmigkeiten kommen (Storch et al. 2013). Sollten sich demnach Hybride von *Cx. pipiens* biotyp *pipiens* und *Cx. pipiens* biotyp *molestus* in der Stichprobe befunden haben, deren weibliches Elternteil zu *Cx. pipiens* biotyp *pipiens* zählt, ist dies aus dem Datensatz nicht zu entnehmen. Da eine Hybridform zwischen *Cx. pipiens* und *Cx. torrentium* in Deutschland bislang nicht nachgewiesen wurde, kann das Vorhandensein von Hybriden der beiden Arten in den jeweiligen Gruppen weitestgehend ausgeschlossen werden (Rudolf et al. 2013).

Neben der Darstellung der Haplotypen-Netzwerke wurden die genetischen Unterschiede der bundesweiten Untersuchungen beider Arten populationsgenetisch aufgearbeitet. Mit Hilfe von MODELTEST (Posada und Crandall 1998), welches in MEGA 5 (Tamura et al. 2011) implementiert ist, wurde zunächst nach einem Modell gesucht, das den „Prozess“ der Evolution zwischen den Sequenzen am besten modelliert. Das gewählte Tamura-3-Parameter Modell (Tamura 1992) basierte auf den Annahmen, dass Transitionen eine höhere Wahrscheinlichkeit haben als Transversionen und dass die Nukleotide Guanin (G) und Cytosin (C) häufiger im Datensatz vorhanden sind als Adenin (A) und Thymin (T). Beschrieben wurden diese Annahmen durch die drei Parameter: Wahrscheinlichkeit von Transitionen, Wahrscheinlichkeit von Transversionen sowie dem G/C Gehalt der Sequenzen (La Rosa et al. 2013). Die sich daraus ergebenden genetischen Unterschiede zwischen den Populationen werden durch Genfluss immer wieder ausgeglichen, solange diese innerhalb der Art einen gemeinsamen Genpool besitzen. Findet dieser Ausgleich nicht mehr statt, kommt es zur Bildung einer „Barcoding Lücke“. Diese „evolutive

Entfernung“ wird als Distanzwert wiedergegeben, welcher innerartlich sehr viel kleiner sein müsste als zwischen den Arten (Boenigk und Wodniok 2014). In der vorliegenden Arbeit lag der Wert innerhalb von *Cx. pipiens* bei 0,01% und in *Cx. torrentium* bei 0,03%. Die Distanz zwischen den beiden Arten betrug 3%. In Studien von Hebert et al. (2003a,b) wurden verschiedene Schwellenwerte für die Trennung von Arten auf Basis des *cox1* Genfragmentes analysiert. Insgesamt zeigten mehr als 98% der analysierten Arten mehr als 2% Varianz zueinander, womit der hier errechnete Wert für *Cx. pipiens* und *Cx. torrentium* eine deutliche Arttrennung zeigt.

Ein weiteres Maß, um die Differenzierung von Populationen beurteilen zu können, sind die paarweisen F_{ST} -Werte (Tabellen 4 und 5, II), welche die Unterschiede der Zusammensetzung von Haplotypen zwischen einzelnen Standorten der jeweiligen Art wiedergeben. Berechnet wurden diese in Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier und Lischer 2010), basierend auf der Distanzmethode von Tamura und Nei (1994). Diesem Substitutionsmodell liegt wie bereits dem Tamura-3-Parameter-Modell die Annahme zugrunde, dass Transitionen häufiger vorkommen als Transversionen. Es berücksichtigt jedoch nicht den GC-Gehalt der einzelnen Haplotypen. Populationen, welche sich in ihrer Haplotypen-Zusammensetzung signifikant voneinander unterschieden, wurden nach Balloux und Lugon-Moulin (2002) zusätzlich in vier Kategorien der Populationsdifferenzierung unterteilt und zusammen mit den jeweiligen Haplotypen-Zusammensetzungen in Karten dargestellt (Abbildungen 3 und 4, II). Obwohl für beide Arten je 14 signifikant unterschiedliche Populationen festgestellt werden konnten, wies *Cx. torrentium* auch bei dieser Analyse eine deutlich stärkere Differenzierung auf als *Cx. pipiens*. Während bei *Cx. pipiens* nur fünf Populationen in die Kategorie „very great population differentiation“ eingeteilt werden konnten, waren es bei *Cx. torrentium* elf Populationen. Jedoch zeigte sich durch die Berechnung der Werte und die Einteilung in unterschiedliche Differenzierungsgrade, dass sich die Populationen von *Cx. pipiens* deutlich in einer Ost-West Ausprägung voneinander unterschieden. Bei *Cx. torrentium* unterschieden sich vor allem nah beieinanderliegende Populationen wie z.B. innerhalb von Frankfurt am Main. Hier könnten sowohl der Main als auch die Hochhäuser der Innenstadt als geographische Barrieren dienen und somit den genetischen Austausch zwischen den Populationen verringern.

Aus den Ergebnissen der paarweisen F_{ST} -Werte ergaben sich für *Cx. pipiens* und *Cx. torrentium* unterschiedliche Gruppenstrukturen, welche die Grundlage für die

Analyse der molekularen Varianz (AMOVA, Excoffier et al 1992) waren (Tabelle 2, II). Für diese Berechnungen wurde zunächst die Gesamtvarianz innerhalb von *Cx. pipiens* und *Cx. torrentium* in Einzelkomponenten unterteilt, wodurch eine Analyse der Varianz auf unterschiedlichen hierarchischen Ebenen möglich war. Diese Ebenen, bei der die Analyse der Varianz zwischen den Gruppen, innerhalb der Gruppen sowie innerhalb der Populationen stattfand, bezogen sich auf die im Vorfeld der Analyse definierten Gruppen (Tabelle 2, II).

Ein Großteil der genetischen Variabilität von *Cx. pipiens* (88,4%) und *Cx. torrentium* (66,5%) ließ sich demnach mit der Varianz innerhalb der analysierten Populationen, also der Variabilität zwischen den einzelnen Individuen, erklären. Dies spiegelt auch die Analyse der vorhandenen Substitutionen innerhalb der Arten sowie der Haplotypen-Netzwerke wider. Ein weiterer Teil (8,39%) der Varianz in *Cx. pipiens* konnte mit der Einteilung in die Gruppen Ost und West erklärt werden, während die Einteilung der Gruppen bei *Cx. torrentium* 32,42% der festgestellten Varianz erklärte. Dieses Ergebnis wurde zusätzlich durch die Berechnung der Gesamtheit der Populationsdifferenzierung bestätigt, bei der *Cx. torrentium* mit einem F_{ST} -Wert von 0,33 deutlich höher lag als *Cx. pipiens* ($F_{ST} = 0,11$). Bei beiden Arten konnte die Variabilität nur mit einem sehr geringen Teil durch die Varianz innerhalb der Gruppen erklärt werden (Tabelle 6, II).

Zusätzlich wurde untersucht, inwieweit die geographische Distanz der Population zueinander, die bestehende genetische Varianz erklären könnte. Isolierung durch Distanz kann zu einem reduzierten Austausch genetischer Informationen führen, wodurch isolierte Populationen eine geringere Variabilität aufweisen (Jensen et al. 2005b). Allerdings machte dieser Faktor nur einen geringen Anteil der Varianz bei *Cx. pipiens* (ca. 2%) und *Cx. torrentium* (ca. 5%) aus. Vor allem bei *Cx. pipiens* ist der geringe Wert nachvollziehbar, da der dominante Haplotyp 90% der getesteten Individuen ausmachte und zudem an allen Standorten gefunden werden konnte.

Mit Hilfe des McDonald & Kreitman Tests (1991) wurde untersucht, ob die Genunterschiede innerhalb der Arten auf neutrale oder auf positive Selektion zurückzuführen sind. Bei beiden Arten gab es keine Anzeichen dafür, dass positive Selektion für die Genunterschiede verantwortlich ist. Die Berechnung des Tajimas'D Werts (Tajima 1989) ergab für einige Populationen von *Cx. pipiens* stark negative Werte, welche auf Faktoren wie genetische Drift (z.B. Gründereffekt) oder aber doch einen Selektionsschub hinweisen könnten (Tajima 1989, Jensen et al. 2005a). Für

Cx. torrentium zeigte der Test entweder negative oder positive Werte, die jedoch alle nicht signifikant waren. Somit konnte die Theorie der neutralen Evolution weder bestätigt noch abgelehnt werden (Dörge et al. 2014).

Zusammen mit der Rekonstruktion der Haplotypen-Netzwerke konnte durch diese Analysen gezeigt werden, dass *Cx. pipiens* und *Cx. torrentium* deutliche Unterschiede in ihren Populationsstrukturen aufwiesen, die vermutlich auf unterschiedliche evolutive Prozesse zurückzuführen sind. Die analysierte Populationsstruktur von *Cx. torrentium* spricht für eine geringere Ausbreitung als bei *Cx. pipiens*, wodurch der genetische Austausch reduziert und so die untersuchten Populationen genetisch stärker voneinander abwichen.

Die stärkere genetische Differenzierung innerhalb der Populationen von *Cx. torrentium* könnte Gründe liefern, warum bislang nur sehr wenige morphologische Charakteristika gefunden wurden, die allen Individuen dieser Art eigen sind und sie eindeutig von *Cx. pipiens* differenzieren (Weitzel et al. 2011, Börstler et al. 2014). Zudem könnte ausgeprägte genetische Diversität dieser Art auf die Bildung kryptischer Arten innerhalb von *Cx. torrentium* hindeuten. Diese könnten einen Einfluss auf die Ausbildung von Hybriden sowie veränderten Wirtspräferenzen haben, wodurch es zu sogenannten Brückenvektoren kommen kann. Diese könnten in der Lage sein, Krankheitserreger vom Tier auf den Menschen zu übertragen und so zu einer verbesserten Ausbreitung des Erregers beitragen (Rudolf et al. 2013). Die geringere genetische Variabilität in *Cx. pipiens* hingegen lässt auf unterschiedliche Ereignisse wie positive Selektion durch z.B. Insektizidresistenz im Zuge durchgeführter Bekämpfungsmaßnahmen oder die Infektion mit Wolbachien schließen. Da diese Arbeit die erste umfassende zur Populationsstruktur der beiden Arten darstellt, ist es jedoch schwierig, genaue Rückschlüsse auf die tatsächlichen evolutiven Prozesse zu ziehen.

3.4 Schlussfolgerungen und Ausblick

Weltweit sind Stechmücken die wichtigsten Überträger vektor-assoziiertes Krankheitserreger. Durch den voranschreitenden Klimawandel sowie den weltweiten Güter- und Personentransport ist es einigen Arten gelungen, sich in neuen Gebieten zu etablieren und dort als Vektor zuvor nicht auftretender Krankheiten zu fungieren. Zunehmend werden jedoch auch einheimische Stechmückenarten als Vektoren für Krankheitserreger identifiziert. In einer studienbegleitenden Arbeit konnten Borrelien,

die Erreger der Lyme-Borreliose in elf heimischen Stechmückenarten nachgewiesen werden, darunter auch in Pools von *Culex pipiens/torrentium*. Zudem können diese beiden Arten die Erreger des West-Nil- oder des Sindbis-Virus übertragen. Zusammen mit der schwierigen morphologischen Unterscheidung der Arten wird deutlich, warum sie für genaue genetische Analysen so interessant sind. Da die beiden Arten selten unterschieden, sondern zumeist unter dem Pseudonym *Cx. pipiens/torrentium* zusammengefasst wurden, gibt es nur sehr wenige Studien, in denen auf die Zoogeographie getrennt eingegangen wird. Die vorliegende Studie enthält einen der größten Datensätze, der bislang für *Cx. pipiens* und *Cx. torrentium* in Deutschland einzeln ausgewertet wurde und Rückschlüsse auf die Verteilung sowie die genetischen Besonderheiten der Arten zulässt. Allerdings zeigt diese Arbeit auch, dass es verbesserter Fangmethoden bedarf, welche z.B. unterschiedliche Fanghöhen, Köder oder Temperaturspannen abdecken, um weitere Aussagen über das Wirtsspektrum und die damit einhergehenden Möglichkeiten der Vektorkompetenz treffen zu können. Zudem sollten die bisherigen populationsgenetischen Ergebnisse durch die Verwendung weiterer genetischer Marker erweitert werden, um so z.B. eine genauere Aufspaltung der *Cx. pipiens* Biotypen *pipiens* und *molestus* zu ermöglichen, aber auch um weitere Erkenntnisse über die Populationsstrukturen von *Cx. pipiens* und *Cx. torrentium* zu erhalten. Insbesondere die Ausbildung möglicher kryptischer Arten bei *Cx. torrentium* muss intensiver untersucht werden. Zum einen um eventuell veränderte Wirtspräferenzen und damit einhergehende Vektorkompetenzen frühzeitig identifizieren zu können, zum anderen um morphologische Unterscheidungsmerkmale zu identifizieren, die allen Vertretern dieser Art eigen sind und sie eindeutig von *Cx. pipiens* abgrenzen. Auch die Ausbreitungsmechanismen der invasiven Art *Ochlerotatus japonicus japonicus* sind - wie die der heimischen Arten *Cx. pipiens* und *Cx. torrentium* - wenig bekannt und untersucht, wodurch eine Einschätzung der weiteren Verbreitung schwierig ist. Zwar konnte mit Hilfe der in der Arbeit durchgeführten Nischenmodellierung ein Hinweis auf zukünftige Verbreitungsgebiete gewonnen werden, jedoch sollte eine genauere Untersuchung der Vorkommen im Bezug zur Geographie der Landschaft erfolgen, bei der unter anderem die Auswirkungen von Erhebungen und Flussläufen auf die weitere Verbreitung von *Oc. j. japonicus* analysiert werden müssen.

Die Anwendung der direct-PCR kann ebenfalls ein genaueres Bild der Artverteilung in Deutschland liefern, vor allem wenn eine schnelle und kostengünstige Identifizierung angestrebt wird. Auch diese Methode sollte mit weiteren genetischen Markern ausgebaut werden, um z.B. nicht nur die Identifizierung der Stechmückenart sondern auch möglicher enthaltener Erreger wie Borrelien vornehmen zu können. Dies kann helfen, im Fall positiver Ergebnisse eine schnelle Eliminierung oder Überwachung durchzuführen. Durch die weiterführenden Monitoring-Programme sowie die molekularbiologische Aufarbeitung der Proben wird es möglich sein, weitere Krankheitserreger sowie genetische Besonderheiten der Stechmückenfauna, aber auch neue Stechmückenarten nachzuweisen. Die Modellierung potentieller Verbreitungsgebiete neuer invasiver Arten wird helfen, diese besser detektieren und überwachen zu können. In jedem Fall sind weitere Untersuchungen nötig, um die noch bestehenden Wissenslücken zu füllen.

4 Zusammenfassung

Stechmücken (Dipteren: Culicidae) sind weltweit mit über 3500 Arten und mit Ausnahme der arktischen Regionen ubiquitär vertreten. Die medizinische Relevanz dieser Tiergruppe, begründet durch die hämatophage Lebensweise der Weibchen, erschloss sich bereits Ende des 19. Jh. und hat bis heute Bestand. Jedes Jahr sterben rund 600.000 Menschen an den Folgen der Malaria und fast 100 Mio. Menschen infizieren sich mit dem Denguefieber. Zwar beziehen sich diese Zahlen fast ausschließlich auf die Entwicklungsländer, aber im Zuge des Klimawandels und des immer stärkeren Welthandels kommt es auch in Europa und den USA immer wieder zu Ausbrüchen vorher nicht relevanter Krankheiten. So hat sich das West-Nil-Virus seit 1999 in Nordamerika rasant verbreitet. Im Jahr 2013 gab es dort rund 2500 Fälle, von denen 119 zum Tod führten. In Europa traten hingegen Krankheiten wie das Chikungunyafieber (Italien 2007) oder das Denguefieber (Frankreich 2010/2013) auf. Die Gründe für diese Ausbrüche sind vor allem in der Einschleppung neuer Vektorspezies und Krankheitserreger sowie in den veränderten Wirtspräferenzen einheimischer Stechmückenarten zu suchen. Das Wissen um das Vektorpotential der in Deutschland heimischen Stechmücken konnte vor allem durch die seit 2009 initiierten Monitoring-Programme stetig erweitert werden. Auch die Veränderung der heimischen Fauna durch invasive Arten wie *Ochlerotatus japonicus japonicus* oder *Aedes albopictus* wird intensiv erforscht. Dennoch ist hinsichtlich der Biologie, Ökologie sowie Genetik vieler Arten noch immer wenig bekannt.

Die vorliegende Dissertation, welche auf Basis von vier (ISI-) Einzelpublikationen kumulativ angefertigt wurde, beschäftigte sich mit der Analyse der genetischen Variabilität sowie der Zoogeographie der untersuchten Arten und der Etablierung einer schnellen und kostengünstigen Methode zur Artdiagnostik. Besonderes Augenmerk wurde bei den Analysen auf die beiden heimischen Arten *Culex pipiens* und *Culex torrentium* sowie die invasive Art *Ochlerotatus japonicus japonicus* gelegt. Ziel war es, die noch bestehenden Wissenslücken zu füllen, um zukünftige Monitoring-Programme besser koordinieren sowie Analysen zur Vektorkompetenz und Genetik dieser Arten gezielter durchführen zu können.

Es konnte gezeigt werden, dass *Cx. pipiens* und *Cx. torrentium* deutliche Unterschiede in ihren Populationsstrukturen aufwiesen welche auf verschiedene evolutive Prozesse hindeuten. Die geringere genetische Variabilität in *Cx. pipiens*

lässt auf positive Selektion durch z.B. Insektizidresistenz im Zuge durchgeführter Bekämpfungsmaßnahmen oder die Infektion mit Wolbachien schließen. Die analysierte Populationsstruktur von *Cx. torrentium* spricht hingegen für eine geringe Ausbreitung, wodurch der genetische Austausch reduziert wurde und so die untersuchten Populationen genetisch stärker voneinander abwichen. Des Weiteren ließen die Analysen des Cytochrom c Oxidase Untereinheit 1-Fragmentes (cox1) Rückschlüsse auf die Zoogeographie dieser Arten in Deutschland zu - wobei beide Arten über das Untersuchungsgebiet verteilt waren, *Cx. torrentium* jedoch in den neuen Bundesländern weniger häufig nachgewiesen wurde als in den alten und eine geringere gefangene Individuenzahl aufwies. Basierend auf der ökologischen Nischenmodellierung konnten potentiell neue Verbreitungsgebiete für die Art *Ochlerotatus japonicus japonicus* identifiziert werden. Als klimatisch besonders günstig zeigten sich dabei Südhessen, das Saarland sowie nördliche Teile Nordrhein-Westfalens. Mit Hilfe der etablierten Methode der direct-PCR wird in Zukunft eine schnellere und kostengünstigere Identifizierung von Stechmücken erfolgen können, welche aufgrund bestimmungsrelevanter Merkmale nicht mehr morphologisch zu identifizieren sind.

Um das Wissen über die Stechmücken in Deutschland fortlaufend zu intensivieren, ist sowohl das Weiterführen der Monitoring-Programme als auch die molekularbiologische Aufarbeitung der Proben nötig. Durch die Anwendung neuer Techniken und weiterer molekularer Marker wird es möglich sein, weitere Krankheitserreger sowie genetische Besonderheiten der heimischen Stechmückenfauna nachzuweisen. Aber auch die Überwachung invasiver Stechmückenarten durch die Modellierung potentieller Verbreitungsgebiete und die Anwendung molekularbiologischer Analysemethoden zum Detektieren der Arten und möglicher Krankheitserreger wird ein wichtiger Bestandteil der weiteren Forschung sein.

5 Literaturverzeichnis

Alahmed AM (2012) Mosquito fauna (Diptera: Culicidae) of the eastern region of Saudi Arabia and their seasonal abundance. J King Saud Univ Sci 24: 55-62.

Allan SA, Bernier UR, Kline DL (2006) Laboratory evaluation of avian odors for mosquito (Diptera: Culicidae) attraction. J Med Entomol 43: 225-31.

Adhami J, Reiter P (1998) Introduction and establishment of *Aedes (Stegomyia) albopictus* skuse (Diptera: Culicidae) in Albania. J Am Mosq Control Assoc 14: 340-343.

AMCA (2014) American Mosquito Control Association - Mosquito borne-diseases. Internet: <http://www.mosquito.org/mosquito-borne-diseases> (aufgerufen am 04. April 2015).

Andreadis TG, Wolfe RJ (2010) Evidence for reduction of native mosquitoes with increased expansion of invasive *Ochlerotatus japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae) in the Northeastern United States. J Med Entomol 47: 43-52.

Aspöck H (2008) Durch Arthropoden übertragene Erreger von Infektionen des menschen in Mitteleuropa – ein Update. Mitt Dtsch Ges All Angew Wnt 16: 371-392.

Atyame CM, Pasteur N, Dumas E, Tortosa P, Tantely ML, Pocquet N, Licciardi S, Bheecarry A, Zumbo B, Weill M, Duron O (2011) Cytoplasmatic incompatibility as a means of controlling *Culex pipiens quinquefasciatus* mosquito in the islands of the South-Western Indian Ocean. PloS Nedl Trop Dis 5: e1440.

Avšič-Županc T (2013) Mosquito-borne diseases – a new threat to Europe? Clin Microbiol Infect 19: 683-684.

Balenghien T, Fouque F, Sabatier P, Bicout DJ (2006) Horse-, bird-, and human-seeking behavior and seasonal abundance of mosquitoes in a West Nile virus focus of Southern France. J Med Entomol 43: 936-946.

Ballard JWO, Hatzidakis J, Karr TL, Kreitman M (1996) Reduced variation in *Drosophila simulans* mitochondrial DNA. Genetics 144: 1519-1528.

Balloux F, Lugon-Moulin N (2002) The estimation of population differentiation with microsatellite markes. Mol Ecol 11: 155-165.

Becker N, Petric D, Boase C, Lane J, Zgomba M, Dahl C, Kaiser A (2010) Mosquitoes and Their Control. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, 577pp.

Becker N, Hoffmann D (2011) First record of *Culiseta longiareolata* (Macquart) for Germany. *Europ Mosq B* 29:143-150.

Becker N, Huber K, Pluskota B, Kaiser A (2011) *Ochlerotatus japonicus japonicus* – a newly established neozoan in Germany and a revised list of the German mosquito fauna. *Eur Mosq Bull* 29: 88-102.

Becker N, Krüger A, Kuhn C, Plenge-Bönig A, Thomas SM, Schmidt-Chansit J, Tannich E (2014a) Stechmücken als Überträger exotischer Krankheitserreger in Deutschland. *Bundesgesundheitsblatt* 57: 531-540.

Becker N, Jöst A, Storch V (2014b) Die Invasion der Stechmücken. *Biol unserer Zeit* 44: 400-408.

Bevins SN (2007) Establishment and abundance of a recently introduced mosquito species *Ochlerotatus japonicus* (Diptera: Culicidae) in the Southern Appalachians, USA. *J Med Entomol* 44: 945-952.

Biogents (2011) Instruction manual for the Biogents Sentinel – an innovative trapping system for mosquitoes & other hematophagous insects. Internet: http://www.bg-sentinel.com/downloads/BG-Sentinel_Manual.pdf (aufgerufen am 28. März 2015).

Bocková E, Rudolf I, Kočišová A, Betášová L, Venclíková K, Mendel J, Hubálek Z (2013) *Dirofilaria repens* microfilariae in *Aedes vexans* mosquitoes in Slovakia. *Parasitol Res* 112: 3465-3470.

Boenigk J, Wodniok S (2014) Biodiversität und Erdgeschichte. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1. Auflage, 402pp.

Bonilauri P, Bellini R, Calzolaro M, Angelini R, Ventur L, Fallacar F, Cordioli P, Angelini P, Venturelli V, Merialdi G, Dottori M (2008) Chikungunya virus in *Aedes albopictus*, Italy. *Emerg Infect Dis* 15: 852-853.

Börstler J, Lühken R, Rudolf M, Steinke S, Melaun C, Becker S, Garms R, Krüger A (2014) The use of morphometric wing characters to discriminate female *Culex pipiens* and *Culex torrentium*. *J Vector Ecol* 39: 204-212.

- Bowman DD** (2014) Introduction. In: Bowman DD, Gregori's Parasitology for Veterinarians. Elsevier, 10. Auflage, pp 1-10.
- Brown TA** (2007) Genome und Gene – Lehrbuch der molekularen Genetik. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 3. Auflage, 775pp.
- Buhagiar JA** (2009) A second record of *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) in Malta. Eur Mosq B 27: 65-67.
- BUND** (2015) Globalisierung der Natur. Internet: http://www.bund.net/themen_und_projekte/naturschutz/biodiversitaet/invasive_arten/ (aufgerufen am 06. April 2015).
- Burkett-Cadena ND** (2013) Mosquitoes of the Southeastern United States. University Alabama Press, 208pp.
- Cancrini G, Scaramozzino P, Gabrielli S, Di Paolo M, Toma L, Romi R** (2007) *Aedes albopictus* and *Culex pipiens* implicated as natural vectors of *Dirofilaria repens* in central Italy. J Med Entomol 44: 1064-1066.
- CDC** (2014) West Nile virus – Final annual maps & data for 2013. Internet: <http://www.cdc.gov/westnile/resources/pdfs/data/2013wnvhumaninfectionsbystate.pdf> (aufgerufen am 20. März 2015).
- CDC** (2015) Lyme disease: data and statistics. Internet: <http://www.cdc.gov/lyme/stats/> (aufgerufen 20. März 2015).
- Clancy DJ, Hoffmann AA** (1996) Cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*: evolving complexity. Trends Ecol Syst 11: 145-146.
- Clement M, Posada D, Crandall KA** (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. Mol Ecol 9: 1657-1659.
- Crabtree MB, Savage HM, Miller BR** (1997) Development of a polymerase chain reaction assay for differentiation between *Culex pipiens pipiens* and *Cx. p. quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in north America based on genomic differences identified by subtractive hybridization. J Med Entomol 34: 532-537.
- Czajka C, Becker N, Poppert S, Jöst H, Schmidt-Chanasit J, Krüger A** (2012) Molecular identification of *Setaria tundra* (Nematoda: Filarioidea) and an unidentified filarial species in mosquitoes in Germany. Parasit Vectors 5: 14.

- Czajka C, Becker N, Jöst H, Poppert S, Schmidt-Chanasit J, Krüger A, Tannich E** (2014) Stable transmission of *Dirofilaria repens* nematodes, northern Germany. *Emerg Infect Dis* 20: 329-331.
- Dahl C** (1988) Taxonomic studies on *Culex pipiens* and *C. torrentium*. *Biosyst Haematophagous Insect* 34: 149-175.
- Debboun M, Frances SP, Strickman D** (2006) *Insect repellents: principles, methods, and uses*. CRC Press, 495pp.
- Delaunay P, Blanc V, Giudice PD, Levy-Bencheton A, Chosidow O, Marty P, Brouqui P** (2011) Bedbugs and Infectious Diseases. *Clin Infect Dis* 52: 200-210.
- Deplazes P, Eckert J, von Samson-Himmelstjerma G, Zahner H** (2012) *Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin*. Enke Verlag Stuttgart, 3. Auflage, 639pp.
- DGVN** (2014) Deutsche Gesellschaft für die Vereinten Nationen e.V. – kleine Stiche mit schlimmen Folgen. Internet: <http://www.dgvn.de/meldung/kleine-stiche-mit-schlimmen-folgen/> (aufgerufen 30. März 2015).
- Diaz-Badillo A, Bolling BG, Perez-Ramirez G, Moore CG, Martinez-Munoz JP, Padilla-Viveros AA, Camacho-Nuez M, Diaz-Perez A, Beaty BJ, de Lourdes Munoz M** (2011) The distribution of potential West Nile virus vectors, *Culex pipiens pipiens* and *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae), in Mexico City. *Parasit Vectors* 4: 70.
- Dörge DD, Zaenker S, Klusmann-Kolb A, Weigand AM** (2014) Traversing worlds – dispersal potential and ecological classification of *Speolepta lptogaster* (Winnertz, 1863) (Diptera, Mycetophilidae). *Subterranean Biol* 13: 1-16.
- Dreyer G, Noroes J, Figueredo-Silva J, Piessens W** (2000) Pathogenesis of lymphatic disease in bancroftian filariasis: A clinical perspective. *Parasitol Today* 16: 544–548.
- ECDC** (2014a) *Aedes aegypti*. Internet: <http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vectors/mosquitoes/Pages/aedes-aegypti.aspx> (aufgerufen am 06. April 2015).
- ECDC** (2014b) *Aedes albopictus*. Internet: <http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vectors/mosquitoes/Pages/aedes-albopictus.aspx>. (aufgerufen am 06. April 2015).
- ECDC** (2014c) *Aedes atropalpus*. Internet: <http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vectors/mosquitoes/Pages/aedes-atropalpus.aspx> (aufgerufen am 10. April 2015).

- ECDC** (2014d) *Aedes koreicus*. Internet: <http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vectors/mosquitoes/Pages/aedes-koreicus.aspx> (aufgerufen am 10. April 2015).
- ECDC** (2014e) *Aedes japonicus*. Internet: <http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vectors/mosquitoes/Pages/aedes-japonicus.aspx> (aufgerufen am 10. April 2015).
- ECDC** (2015) Mosquito maps. Internet: http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vectors/vector-maps/Pages/VBORNET_maps.aspx (aufgerufen am 10. April 2015).
- Eckert J, Friedhoff KT, Zahner H, Deplazes P** (2008) Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin. Enke Verlag Stuttgart, 632pp.
- Engdahl C, Larsson P, Näslund J, Bravo M, Evander M, Lundström JO, Ahlm C, Bucht G** (2014) Identification of Swedish mosquitoes based on molecular barcoding of the COI gene and SNP analysis. *Mol Ecol Resour* 14: 478-488.
- Eritja R, Escosa R, Lucientes J, Marquès E, Roiz D, Ruiz S** (2005) Worldwide invasion of vector mosquitoes: present European distribution and challenges for Spain. *Biol Invas* 7: 787-97.
- Espeland M, Irestedt M, Johanson KA, Åkerlund M, Bergh J-E, Källersjö M** (2010) Dichlorvos exposure impedes extraction and amplification of DNA from insects in museum collections. *Front Zool* 7: 2.
- ETH** (2008) Eidgenössische Technische Hochschule Zürich – Experimental Ecology: Populationsgenetik - Gene und ihre Frequenzen. Internet: http://www.eco.ethz.ch/education/lectures/701-0245-00/hs09/701-0245-00_03.pdf (aufgerufen am 20. März 2015).
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM** (1992) Analysis of the molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*: 131: 479-491.
- Excoffier L, Lischer HE** (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Res* 10: 564-567.
- Farajollahi A, Fonseca DM, Kramer LD, Kilpatrick AM** (2011) „Bird biting“ mosquitoes and human disease: A review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes in epidemiology. *Infect Genetics Evol* 11: 1577-1585.

- Fedorova MV, Shaikovich EV** (2007) Morphological and molecular-genetic distinctions between adult mosquitoes *Culex torrentium* Martini and *C. pipiens* Linnaeus (Diptera, Culicidae) from Moscow Province. *Entomol Rev* 87: 127-135.
- Flemings M** (1959) An altitude biting study of *Culex tritaeniorhynchus* (Giles) and other associated mosquitoes in Japan. *J Economic Entomol* 52: 490-492.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, R Lutz, 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.
- Fonseca DM, Keyghobadi N, Malcolm CA, Mehmet C, Schaffner F, Mogi M, Fleischer RC, Wilkerson RC** (2004) Emerging vectors in the *Culex pipiens* complex. *Science* 303: 1535-1538.
- Fontenille D, Traore-Lamizana M, Diallo M, Thonnon J, Digoutte JP, Zeller HG** (1998) New vectors of Rift Valley fever in West Africa. *Emerg Infect Dis* 4: 289-293.
- Frank C, Faber M, Hellenbrand W, Wilking H, Stark K** (2014) Wichtige, durch Vektoren übertragene Infektionskrankheiten beim Menschen in Deutschland – Epidemiologische Aspekte. *Bundesgesundheitsbl* 5: 1-11.
- Frimmel S, Hemmer CJ, Löbermann M, Reisinger EC** (2009) Klimawandel und globale Erwärmung: Wegbereiter für die globale Ausbreitung tropischer Infektionskrankheiten. *Pharm Unserer Zeit* 6: 492-499.
- Fuehrer H-P, Fally MA, Habler VE, Starzengruber P, Swoboda P, Noedi H** (2011) Novel nested direct PCR technique for Malaria diagnosis using filter paper samples. *J Clin Microbiol* 49: 1628-1630.
- Fyodorova MV, Savage HM, Lopatina JV, Bulgakova TA, Ivanitsky AV, Platonova OV, Platonov AE** (2006) Evaluation of potential West Nile virus vectors in Volgograd region, Russia, 2003 (Diptera: Culicidae): species composition, bloodmeal host utilization, and virus infection rates of mosquitoes. *J Med Entomol* 43: 552-563.
- Goater TM, Goater CP, Esch GW** (2013) Parasitism: The diversity and ecology of animal parasites. Cambridge University Press, 2. Auflage, 510pp.
- Goddard J** (2008) Infectious Diseases and Arthropods. Humana Press, 2. Auflage, 251pp.

Gould EA, Gallian P, de Lamballerie X, Charrel RN (2010) First case of autochthonous dengue fever and chikungunya fever in France: from bad dream to reality! *Clin Microbiol Infect* 16: 1702-1704.

Graham H (1902) Dengue: a study of its mode of propagation and pathology. *Medical Record* 61: 204-207.

Gratz NG (2004) The vector-borne human infections of Europe – their distribution and burden on public health. Internet: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0008/98765/e82481.pdf (aufgerufen am 05. Mai 2015).

Gubler DJ (1998) Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. *Emerg Infect Dis* 4: 442-450.

Gubler DJ (2013) Vector transmission of Diseases and Zoonoses. In: Magill AJ, Strickland T, Maguire JH, Ryan ET, Solomon T, Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases. Elsevier, 11. Auflage, pp 1012-1017.

Guillemaud T, Pasteur N, Rousset F (1997) Contrasting levels of variability between cytoplasmic genomes and incompatibility types in the mosquito *Culex pipiens*. *Proc R Soc Lond B* 264: 245-251.

Gullan PJ, Cranston PS (2010) The insects: an outline of entomology. Wiley-Blackwell, 4. Auflage, 584pp.

Gullan PJ, Cranston PS (2014) The insects: an outline of entomology. Wiley-Blackwell, 5. Auflage, 624pp.

Halouzka J, Postic D, Hubalek Z (1998) Isolation of the spirochaete *Borrelia afzelii* from the mosquito *Aedes vexans* in the Czech Republic. *Med Vet Entomol* 12: 103-105.

Hanson SM, Craig GB (1995) Relationship between cold hardiness and supercooling point in *Aedes albopictus* eggs. *J Am Mosq Control Assoc* 11: 35-38.

Harbach RE (2007) The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. *Zootaxa* 1668: 591-638.

Harbach RE (2011) Classification within the cosmopolitan genus *Culex* (Diptera: Culicidae): the foundation for molecular systematics and phylogenetic research. *Acta Trop* 120: 1-14.

Haas S (2005) Von Stechmücken übertragene Infektionskrankheiten: ein Überblick. Universität Regensburg, Arbeitsgemeinschaft Geier, Internet: <http://www.biologie.uni-regensburg.de/Zoologie/Geier/stechmuecken-krankheiten.html> (aufgerufen am 23. März 2015).

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003a) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Biol Sci* 270: 313-321.

Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR (2003b) Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc Biol Sci* 270: 96-99.

Hemmer CJ, Frimmel S, Kinzelbach R, Gürtler L, Reisinger EC (2007) Globale Erwärmung: Wegbereiter für tropische Infektionskrankheiten in Deutschland. *Dtsch Med Wochenschr* 132: 2583-2589.

Hendrix CM, Bemrick WJ, Schlotthauer JC (1980) Natural transmission of *Dirofilaria immitis* by *Aedes vexans*. *Am J Vet Res* 41: 1253-1255.

Hertig M, Wobach SB (1924) Studies on rickettsia-like microorganisms in insects. *J Med Res* 44: 329-374.

Hesson JC, Lundström JO, Halvarsson P, Erixon P, Collado A (2010) A sensitive and reliable restriction enzyme assay to distinguish between the mosquitoes *Culex torrentium* and *Culex pipiens*. *Med Vet Entomol* 24: 142-149.

Hesson JC, Ostman O, Schäfer M, Lundström JO (2011) Geographic distribution and relative abundance of the sibling vector species *Culex torrentium* and *Culex pipiens* in Sweden. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11: 1383-1389.

Hesson JC, Rettich F, Merdić E, Vignjević G, Östman Ö, Schäfer M, Schaffner F, Foussadier R, Besnard G, Medlock J, Scholte E-J, Lundström JO (2014) The arbovirus vector *Culex torrentium* is more prevalent than *Culex pipiens* in northern and central Europe. *Med Vet Entomol* 28: 179-186.

Hesson JC (2014) Clearing up *Culex* confusion: a basis for virus vector discrimination in Europe. Uppsala Dissertations, Internet: [urn:nbn:se:uu:diva-232726](http://nbn:se:uu:diva-232726). (aufgerufen am 02. April 2015).

Hickman CP, Roberts LS, Larson A, LAnson H, Eisenhour DJ (2008) Zoologie. Pearson Studium, 13. Auflage, 1347pp.

Hiepe T (2006) Parasitismus als Lebensform- eine Einführung. In: Hiepe T, Lucius R, Gottstein B, Allgemeine Parasitologie mit den Grundzügen der Immunologie, Diagnostik und Bekämpfung. Parey, Stuttgart, pp 1-23.

Hiepe T, Aspöck H (2006) Historischer Abriss. In: Hiepe T, Lucius R, Gottstein B, Allgemeine Parasitologie mit den Grundzügen der Immunologie, Diagnostik und Bekämpfung. Parey, Stuttgart, pp 49-52.

Hubálek Z (2008) Mosquito-borne viruses in Europe. Parasitol Res 103: 29-43.

Huber K, Pluskota B, Jöst A, Hoffmann K, Becker N (2012) Status of the invasive species *Aedes japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae) in southwest Germany in 2011. J Vector Ecol 37: 462-465.

Huber K, Schuldt K, Rudolf M, Marklewitz M, Fonseca DM, Kaufmann C, Tsuda Y, Junglen S, Krüger A, Becker N, Tannich E, Becker SC (2014) Distribution and genetic structure of *Aedes japonicus japonicus* populations (Diptera: Culicidae) in Germany. Parasitol Res 113: 3201-3210.

Huijben S, Schaftenaar W, Wijsman A, Paaijmans K, Takken W (2005) 4. Avian malaria in Europe: an emerging infectious disease? In: Emerging pests and vector-borne diseases in Europe. Takken W, Knols BGJ (ed) Internet: http://www.wageningenacademic.com/_clientFiles/download/ecvd-01-e.pdf (aufgerufen am 04. Mai 2015).

IBOL (2015) International Barcode of Life - What is DNA barcoding? Internet: <http://ibol.org/about-us/what-is-dna-barcoding/> (aufgerufen am 30. März 2015).

Ivanova NV, deWaard JR, Hajibabaei M, Hebert PND (2005) Protocols for high-volume DNA barcode analysis. Internet: http://barcoding.si.edu/PDF/Protocols_for_High_Volume_DNA_Barcode_Analysis.pdf (aufgerufen am 30. März 2015).

Jensen JD, Kim Y, Bauer Dumont V, Aquadro CF, Bustamante CD (2005a) Distinguishing between selective sweeps and demography using DNA polymorphism data. Genetics 170: 1401-1410.

Jensen JL, Bojonak AJ, Kelley ST (2005b) Isolation by distance, web service. BMC Genetics 6: 13.

Jöst H, Bialonski A, Storch V, Günther S, Becker N, Schmidt-Chanasit J (2010) Isolation and phylogenetic analysis of Sindbis viruses from mosquitoes in Germany. J Clin Microbiol 48: 1900-1903.

Jöst H, Bialonski A, Schmetz C, Günther S, Becker N, Schmidt-Chanasit J (2011a) Isolation and phylogenetic analysis of Batai virus, Germany. *Am J Trop Med Hyg* 84: 241-243.

Jöst H, Bialonski A, Maus D, Sambri V, Eiden M, Groschup MH, Günther S, Becker N, Schmidt-Chanasit J (2011b) Isolation of Usutu virus in Germany. *Am J Trop Med Hyg* 85: 551-3.

KABS (2014) Kommunale Aktionsgemeinschaft zur Bekämpfung der Schnakenplage Internet: http://www.kabsev.de/1/1_2/1_2_1/index.html (aufgerufen am 02. April 2015).

Kampen H, Zielke D, Werner D (2012) A new focus of *Aedes japonicus japonicus* (Theobald, 1901) (Diptera, Culicidae) distribution in Western Germany: rapid spread or a further introduction event? *Parasit Vectors* 5: 284.

Kampen H, Kronefeld M, Zielke D, Werner D (2013) Further specimens of the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) trapped in southwest Germany. *Parasitol Res* 112: 905-907.

Kampen H, Werner D (2014) Out of the bush: the Asian bush mosquito *Aedes japonicus japonicus* (Theobald, 1901) (Diptera, Culicidae) becomes invasive. *Parasit Vectors* 7: 59.

Kaufman MG, Fonseca DM (2014) Invasion biology of *Aedes japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae). *Annu Rev Entomol* 59: 31-49.

Keller RP, Geist J, Jeschke JM, Kühn I (2011) Invasive species in Europe: ecology, status, and policy. *Environmental Sci Eur* 23: 23.

Khrabrova NV, Bukhanskaya ED, Sibataev AK, Volkova TV (2009) The distribution of strains of endosymbiotic bacteria *Wolbachia pipientis* in natural populations of *Culex pipiens* mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Eur Mosq Bull* 27: 18-22.

Kilpatrick AM, Kramer LD, Jones MJ, Marra PP, Daszak P (2006) West Nile virus epidemics in North America are driven by shifts in mosquito feeding behavior. *PLoS Biol* 4: e82.

Knoop V, Müller K (2009) Gene und Stammbäume – Ein Handbuch zur molekularen Phylogenetik. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2. Auflage, 386pp.

Kong XQ, Wu CW (2010) Mosquito proboscis: an elegant biomicroelectromechanical system. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 82: e011910.

Kothera I, Godsey Jr. MS, Doyle MS, Savage HM (2012) Characterization of *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) populations in Colorado, USA using microsatellites. *PloS One* 7: e47602.

Krenn HW, Aspöck H (2012) Form, function and evolution of the mouthparts of blood-feeding Arthropoda. *Arthropod Struct Dev* 41: 101-118.

Krüger A, Börstler J, Badusche M, Lühken R, Garms R, Tannich E (2014) Mosquitoes (Diptera: Culicidae) of metropolitan Hamburg, Germany. *Parasitol Res* 113: 2907-2914.

Kumar NP, Rajavel AR, Natarajan R, Jambulingam P (2007) DNA barcodes can distinguish species of Indian mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 44: 1-7.

Kuno G, Chang G-JJ (2005) Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. *Clin Microbiol Rev* 18: 608-637.

Küpper S, Schulze S, Maier WA, Kampen H (2006) Beitrag zum Vorkommen und zur Verbreitung von Stechmücken (Diptera : Culicidae) in Nordrhein-Westfalen mit besonderer Berücksichtigung des Großraums Bonn. *Mitteil DgaaE* 15: 337-344.

Kutschera U (2008) *Evolutionsbiologie*. Eugen Ulmer KG, 3. Auflage, 312pp.

Kuwaja J (2014) Molekularbiologische Untersuchung der Nahrungspräferenzen von Culicidae in Deutschland. Universität Frankfurt, Bachelorarbeit, 68pp.

Laird M, Calder L, Thornton RC, Syme R, Holder PW, Mogi M (1994) Japanese *Aedes albopictus* among four mosquito species reaching New Zealand in used tires. *J Am Mosq Control Assoc* 10: 14-23.

La Rosa M, Fiannaca A, Rizzo R, Urso A (2013) Alignment-free analysis of barcode sequences by means of compression-based methods. *BMC Bioinformatics* 14: doi: 10.1186/1471-2105-14-S7-S4.

La Ruche G, Souarès Y, Armengaud A, Peloux-Petiot F, Delaunay P, Desprès P, Lenglet A, Jourdain F, Leparç-Goffart I, Charlet F, Ollier L, Mantey K, Mollet T, Fournier JP, Torrents R, Leitmeyer K, Hilairet P, Zeller H, van Bortel W, Dejour-Salamanca D, Grandadam M, Gastellu-Etchegorry M (2010) First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. *Euro Surveill* 15: 19676.

Lebl K, Zित्रा C, Silbermayr K, Obwaller A, Berer D, Brugger K, Walter M, Piniör B, Fuehrer H-P, Rubel F (2014) Mosquitoes (Diptera: Culicidae) and their relevance as disease vectors in the city of Vienna, Austria. *Parsitol Res* 114: 707-713.

Lehane MJ (2005) *The biology of blood-sucking insects*. Cambridge University Press, 2. Auflage, 336pp.

Liumbruno GM, Calteri D, Petropulacos K, Mattivi A, Po C, Macini P, Tomasini I, Zucchelli P, Silvestri AR, Sambri V, Pupella S, Catalano L, Piccinini V, Calizzani G, Grazzini G (2008). The Chikungunya epidemic in Italy and its repercussion on the blood system. *Blood Transfus* 6: 199-210.

Little SE (2014) Vector-borne diseases. In: Bowman DD, Gregori's Parasitology for Veterinarians. Elsevier, 10. Auflage, pp 241-263.

Lucius R, Loos-Frank B (2008) *Biologie von Parasiten*. Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2. Auflage, 552pp.

Lundström JO, Niklasson B, Francy DB (1990a) Swedish *Culex torrentium* and *Cx. pipiens* (Diptera: Culicidae) as experimental vectors of Ockelbo virus. *J Med Entomol* 27: 561-563.

Lundström JO, Turell MJ, Niklasson B (1990b) Effect of environmental temperature on the vector competence of *Culex pipiens* and *Culex torrentium* for Ockelbo virus. *Am J Trop Med Hyg* 43: 534-542.

Lundström JO, Andersson AC, Bäckman S, Schäfer ML, Forsman M, Thelaus J (2011) Transstadial transmission of *Francisella tularensis holartica* in mosquitoes, Sweden. *Emerg Infect Dis* 17: 794-799.

Lundström JO, Schäfer ML, Hesson JC, Blomgren E, Lindström A, Pernilla W, Halling A, Hagelin A, Ahlm C, Evander M, Broman T, Forsman M, Vinnersten TZP (2013) The geographic distribution of mosquito species in Sweden. *J Eur Mosq Control Assoc* 31: 21-35.

Mackean I (2015) Mosquito feeding. Internet: <http://www.biology-resources.com/contact.html> (aufgerufen am 02. April 2015).

Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP (2009) BROCK Biology of Microorganisms. Pearson Education, 12. Auflage, 1056pp.

Maier WA, Grunewald J, Habedank B, Hartelt K, Kampen H, Kimmig P, Naucke T, Oehme R, Vollmer A, Schöler A, Schmitt C (2003) Mögliche Auswirkungen von Klimaveränderungen auf die Ausbreitung von primär humanmedizinisch relevanten Krankheitserregern über tierische Vektoren sowie auf die wichtigen Humanparasiten in Deutschland. Umweltbundesamt Internet: <http://www.umweltbundesamt.de/publikationen/moegliche-auswirkungen-von-klimaveraenderungen-auf> (aufgerufen am 02. April 2015).

Marchand E, Prat C, Jeannin C, Lafont E, Bergmann T, Flusin O, Rizzi J, Roux N, Busso V, Deniau J, Noel H, Vaillant V, Leparc-Goffart I, Sic C, Paty MC (2013). Autochthonous case of dengue in France, October 2013. Euro Surveill 18: 20661.

McDonald JH, Kreitman M (1991) Adaptive protein evolution at the Adh locus in *Drosophila*. Nature 351: 652-654.

Medlock JM, Snow KR, Leach S (2005) Potential transmission of West Nile virus in the British Isles: an ecological review of candidate mosquito bridge vectors. Med Vet Entomol 19: 2-21.

Melaun C, Zotzmann S, Santaella GV, Werblow A, Xylander W, Kraiczy P, Klimpel S; Spirochaetes of the *Borrelia burgdorferi* complex in different genera of mosquitoes (Culicidae) in Central Europe. Ticks Tick Borne Dis (submitted).

Melaun C, Werblow A, Cunze S, Zotzmann S, Koch LK, Mehlhorn H, Dörge DD, Huber K, Tackenberg O, Klimpel S (2015) Modelling of the putative distribution of the arbovirus vector *Ochlerotatus japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae) in Germany. Parasitol Res 114: 1051-1061.

Mehlhorn H (2012) Die Parasiten der Tiere: Erkrankungen erkennen, bekämpfen und vorbeugen. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 7. Auflage, 560pp.

Mehlhorn H, Piekarski G (2002) Grundriß der Parasitenkunde: Parasiten des Menschen und der Nutztiere. Spektrum Akademischer Verlag, 6. Auflage, 516pp.

Mohrig W (1969) Die Culiciden Deutschlands. Untersuchungen zu Taxonomie, Biologie und Ökologie der einheimischen Stechmücken. Parasitologische Schriftenreihe (18). Gustav Fischer Verlag, Jena.

Molaei, G., J. Oliver, T. G. Andreadis, P. M. Armstrong, J. J. Howard. (2006) Molecular identification of bloodmeal sources in *Culiseta melanura* and *Culiseta morsitans* from a focus of Eastern equine encephalomyelitis (EEE) virus transmission in New York, USA. Am J Trop Med Hyg 75: 1140-1147.

Morlais I, Severson DW (2002) Complete mitochondrial DNA sequence and amino acid analysis of the cytochrome c oxidase subunit I (COI) from *Aedes aegypti*. DNA Seq 13: 123-127.

Moutailler S, Krida G, Schaffner F, Vazeille M, Failloux AB (2008) Potential vectors of Rift Valley fever virus in the mediterranean region. Vector Borne Zoonotic Dis 8: 749-753.

NABU (2014) Der neue Spatz – Der Feldsperling im Wintervogel-Portrait. Internet: <https://www.nabu.de/tiere-und-pflanzen/aktionen-und-projekte/stunde-der-wintervogel/vogelportraits/13013.html> (aufgerufen am 28. März 2015).

O'Neill SL, Karr TL (1990) Bidirectional incompatibility between conspecific populations of *Drosophila simulans*. Nature 348: 961-972.

Paupy C, Delatte H, Bagny L, Corbel V, Fontenille D (2009) *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: from the darkness to the light. Microbes Infect 11: 1177-1185.

Petrić D, Bellini R, Scholte E-J, Rakotoarivony LM, Schaffner F (2014) Monitoring population and environmental parameters of invasive mosquito species in Europe. Parasit Vectors 7: doi: 10.1186/1756-3305-7-187.

Peyton EL, Campbell SR, Candeletti TM, Romanowski M, Crans WJ (1999) *Aedes (Finlaya) japonicus japonicus* (Theobald), a new introduction into the United States. J Am Mosq Contr Assoc 15: 238-241.

Ponçon N, Toty C, L'Ambert G, Goff GL, Brengues C, Schaffner F, Fontenille D (2007) Biology and dynamics of potential malaria vectors in Southern France. Malaria J 6: 18.

Poulin R, Morand S (2000) The diversity of Parasites. The quarterly review of Biology 75: 277-293.

Posada D, Crandall KA (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.

Purves WK, Sadava D, Orians GH, Heller HC (2006) *Biologie*. Elsevier-Spektrum Akademischer Verlag, 7. Auflage, 1577pp.

Phillips SJ, Dudík M, Schapire RE (2004) A maximum entropy approach to species distribution modeling. *Proceed 21th International Conference Machine Learning*, 655-662.

Phillips SJ, Dudík M (2008) Modeling of species distributions with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation. *Ecography* 31: 161-175.

Quarles W (2003) Mosquito attractants and traps. *Common sense Pest Control* 19: 1-10.

Reed W, Carrollgramonte A, Lazear JW (1900) The etiology of yellow fever – a preliminary note. *Public Health Pap Rep* 26: 37-53.

Reusken C, De Vries A, Den Hartog W, Braks M, Scholte EJ (2010) A study of the circulation of West-Nile virus in mosquitoes in a potential high-risk area for arbovirus circulation in the Netherlands, “De Oostvaardersplassen” *Eur Mosq Bul* 28: 69-83.

Reusken C, De Vries A, Ceelen E, Beeuwkes J, Scholte EJ (2011) A study of the circulation of West Nile virus, Sindbis virus, Batai virus and Usutu virus in mosquitoes in a potential high-risk area for arbovirus circulation in the Netherlands, “De Oostvaardersplassen”. *Eur Mosq Bul* 29: 66-81.

Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, Romi R, Finarelli AC, Panning M, Cordioli P, Fortuna C, Boros S, Magurano F, Silvi G, Angelini P, Dottori M, Ciufolini MG, Majori GC, Cassone A, CHIKV study group (2007). Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet* 370: 1840-1846.

Ribeiro JM (2000) Blood-feeding in mosquitoes: probing time and salivary gland anti-haemostatic activities in representatives of three genera (*Aedes*, *Anopheles*, *Culex*). *Med Vet Entomol* 14: 142-148.

RKI (2014) Robert Koch Institut – Weltgesundheitstag 2014, Vektorübertragene Krankheiten. *Epidemiologisches Bull* 14: 10pp.

Roiz D, Neteler M, Castellani C, Arnoldi D, Rizzoli A (2011) Climatic factors driving invasion of the tiger mosquito (*Aedes albopictus*) into new areas of Trentino, Northern Italy. PLoS ONE 6: e14800.

Ross R (1897) On some peculiar pigmented cells found in two mosquitoes fed on malaria blood. Br Med J 2: 1786-1788.

Rousset F, Bouchon D, Pintureau B, Juchault P, Solignac M (1992) *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alternations of sexuality in arthropods. Proc R Soc London Ser B 250: 91-98.

Rudolf M, Czajka C, Börstler J, Melaun C, Jöst H, von Thien H, Badusche M, Becker N, Schmidt-Chanasit J, Krüger A, Tannich E, Becker S (2013) First nationwide surveillance of *Culex pipiens* complex and *Culex torrentium* mosquitoes demonstrated the presence of *Culex pipiens* biotype *pipiens/molestus* hybrids in Germany. PLoS ONE 8: e71832.

Rueda LM (2008) Global diversity of mosquitoes (Insecta: Diptera: Culicidae) in freshwater. Hydrobiologia 595: 477-487.

Rutledge CR (2008) Mosquitoes (Diptera: Culicidae). In: Encyclopedia of Entomology, Ed. Capinera JL, 4th Edition, Springer Netherland, pp. 2476-2483.

Saccone C, De Giorgi C, Gissi C, Pesole G, Reyes A (1999) Evolutionary genomics in metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. Gene 238: 195-209.

Sardelis MR, Turell MJ (2001) *Ochlerotatus j. japonicus* in Frederick County, Maryland: discovery, distribution, and vector competence for West Nile virus. J Am Mosq Control Assoc 17: 137-141.

Sardelis MR, Dohm DJ, Pagac B, Andre RC, Turell MJ (2002a) Experimental transmission of eastern equine encephalitis virus by *Ochlerotatus j. japonicus* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol 39: 480-484.

Sardelis MR, Turell MJ, Andre RG (2002b) Laboratory transmission of LaCrosse virus by *Ochlerotatus j. japonicus* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol 39: 635-639.

Schäfer ML, Lundström JO, Pfeffer M, Lundkvist E, Ladin J (2004) Biological diversity versus risk for mosquito nuisance and disease transmission in constructed wetlands in southern Sweden. Med Vet Entomol 18: 256-267.

- Schaffner F, Chouin S, Guilloteau J** (2003) First record of *Ochlerotatus (Finlaya) japonicus japonicus* (Theobald, 1901) in metropolitan France. *J Am Mosq Control Assoc* 19: 1-5.
- Schaffner F, Kaufmann C, Hegglin D, Mathis A** (2009) The invasive mosquito *Aedes japonicus* in Central Europe. *Med Vet Entomol* 23: 448-451.
- Schaffner F, Vazeille M, Kaufmann C, Failloux A-B, Mathis A** (2011) Vector competence of *Aedes japonicus* for chikungunya and dengue viruses. *Eur Mosq Bull* 29: 141-142.
- Schaffner F, Medlock JM, van Bortel W** (2013) Public health significance of invasive mosquitoes in Europe. *Clin Microbiol Infect* 19: 685-692.
- Scherpner C** (1960) Zur Ökologie und Biologie der Stechmücken des Gebietes von Frankfurt am Main (Diptera: Culicidae). *Mitt Zool Mus Berlin* 36: 49-99.
- Schnieder T** (2006) Veterinärmedizinische Parasitologie. Enke Verlag Stuttgart, 6. Auflage, 808pp.
- Scholte EJ, Dijkstra E, Blok H, De Vries A, Takken W, Hofhuis A, Koopmans M, De Boer A, Reusken CBEM** (2008a) Accidental importation of the mosquito *Aedes albopictus* into the Netherlands: a survey of mosquito distribution and the presence of dengue virus. *Med Vet Entomol* 22: 352-358.
- Scholte EJ, Reusken CBEM, Takken W, Jongejan F, van der Giessen JWB** (2008b) Het toenemend belang van infectieziekten die worden overbracht door vectoren. *Infectieziekten Bul* 10: 311-316.
- Service M** (2012) Medical entomology for students. Cambridge University Press. 5. Auflage, 317pp.
- Service MW** (1968) The taxonomy and biology of two sympatric sibling species of *Culex*, *C. pipiens*, and *C. torrentium* (Diptera, Culicidae). *J Zool Lond* 156: 313-323.
- Shaikovich EV** (2007) PCR-RFLP of the COI gene reliably differentiates *Cx. pipiens*, *Cx. pipiens f. molestus* and *Cx. torrentium* of the pipiens complex. *Eur Mosq Bull* 23: 25-30.
- Silberbush A, Menon M, Olson M, Resetarits Jr. WJ** (2014) *Culex pipiens-quinquefasciatus* hybrids identified in West Texas. *J Vector Ecol* 39: 222-223.

- Silbermayr K, Eigner B, Duscher GG, Joachim A, Fuehrer H-P** (2013) The detection of different *Dirofilaria* species using direct PCR technique. Parasitol Res 113: 513-517.
- Sinkins SP, Walker T, Lynd AR, Steven AR, Makepeace BL, Charles H, Godfray CJ, Parkhill J** (2005) *Wolbachia* variability and host effects on crossing type in *Culex* mosquitoes. Nature 436: 257-260.
- Smith JL, Fonseca DM** (2004) Rapid assays for identification of members of the *Culex* (*Culex*) *pipiens* complex, their hybrids, and other sibling species (Diptera: Culicidae). Am J Trop Med Hyg 70: 339-345.
- Steinke D, Brede N** (2006) Taxonomie im 21. Jahrhundert – DNA-Barcoding. Biol unsere Zeit 36:40-46.
- Storch V, Welsch U, Wink M** (2013) Evolutionsbiologie. Springer Spektrum, 3. Auflage, 570pp.
- Stouthamer R, Breeuwer JAJ, Luck RF, Werren JH** (1993) Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis. Nature 361: 66-68.
- Sutcliffe JF** (1987) Distance orientation of biting flies to their hosts. Int J Trop Insect Sci 8: 611-616.
- Syed Z, Leal WS** (2009) Acute olfactory response of *Culex* mosquitoes to a human- and bird-derived attractant. PNAS 106: 18803-18808.
- Tabachnik WJ** (2009) Challenges in predicting climate and environmental effects on vector-borne disease epistystems in a changing world. J Exp Biol 213: 946-954.
- Tajima F** (1989) Statistical-method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics 123: 585-595.
- Tamura K** (1992) Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C content biases. Mol Biol Evol 9: 678-687.
- Tamura K, Nei M** (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Mol Biol Evol 10: 512-526.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S** (2011) MEGA 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol 10: 2731-2739.

- Tanaka K, Mizusawa K, Saugstad ES** (1979) A revision of the adult and larval mosquitoes of Japan (including the Ryukyu Archipelago and the Ogasawara Islands) and Korea (Diptera: Culicidae). *Contr Am Entomol Inst* 16: 1-987.
- Templeton AR, Crandall KA, Sing CF** (1992) A cladistics analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonucleases mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* 132: 619-633.
- Thermo Fischer Scientific** (2015) Phusion DNA Polymerases. Internet: <https://www.lifetechnologies.com/de/de/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-molecular-biology-products/phusion.html> (aufgerufen am 13. März 2015).
- Thorp JH, Rogers DC** (2014) Thorp and Covich's freshwater invertebrates: ecology and general biology. Elsevier Academic Press, 4. Auflage, 1148pp.
- Töpfer T** (2008) Vergleichende Phylogenie der Gimpel (Aves: Fringillidae: *Pyrrhula* BRISSON, 1760). Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Internet: <http://ubm.opus.hbz-nrw.de/volltexte/2009/1869/pdf/diss.pdf> (aufgerufen am 20. März 2015)
- Turell MJ, Lundström JO, Niklasson B** (1990) Transmission of Ockelbo virus by *Aedes cinereus*, *Ae. communis* and *Ae. excrucians* (Diptera: Culicidae) collected in an enzootic area in central Sweden. *J Med Entomol* 27: 266-268.
- Turell MJ, O'Guinn ML, Dohm DJ, Jones JW** (2001) Vector competence of North American mosquitoes (Diptera: Culicidae) for West Nile virus. *J Med Entomol* 38: 130-134.
- Turell MJ, Dohm DJ, Sardelis MR, O'Guinn M, Andreardis TG, Blow JA** (2005) An update on the potential of North American mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit West Nile virus. *J Med Entomol* 42: 57-62.
- Turell MJ, Byrd BD, Harrison BA** (2013) Potential for populations of *Aedes j. japonicus* to transmit Rift Valley fever virus in the USA. *J Am Mosq Control Assoc* 29: 133-137.
- Václavík T, Meentemeyer RK** (2012) Equilibrium or not? Modelling potential distribution of invasive species in different stages of invasion. *Diversity Distrib* 18: 73-83.

- Ventim R, Ramos JA, Osório H, Lopes RJ, Pérez-Tris J, Mendes L** (2012) Avian malaria infections in western European mosquitoes. *Parasitol Res* 111: 637-645.
- Versteirt V, Schaffner F, Garros C, Dekoninck W, Coosemans M, Van Bortel W** (2009) Introduction and establishment of the exotic mosquito species *Aedes japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae) in Belgium. *J Med Entomol* 46: 1464-1467.
- Vezzani D** (2007) Review: Artificial container-breeding mosquitoes and cemeteries: a perfect match. *Trop Med Int Health* 12: 299-313.
- Villarreal MR** (2010) Life cycle of a mosquito of the genus *Culex*. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Culex_mosquito_life_cycle_en.svg (aufgerufen am 12. Februar 2015).
- Vinogradova EB** (2000) *Culex pipiens pipiens* mosquitoes: Taxonomy, distribution, ecology, physiology, genetics, applied importance and control. Pensoft Publishers Bulgaria, 250pp.
- Vinogradova EB, Shaikevich EV, Ivanitsky AV** (2007) A study of the distribution of the *Culex pipiens* complex (Insecta: Diptera: Culicidae) mosquitoes in the European part of Russia by molecular methods of identification. *Comp Cytogenet* 1: 129-138.
- Wahid I, Sunahara T, Mogi M** (2003) Maxillae and mandibles of male mosquitoes and female autogenous mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 40: 150-158.
- Wehner R, Gehring WJ** (2013) *Zoologie*. Thieme, 25. Auflage, 792pp.
- Weitzel T, Collado A, Jöst A, Pietsch K, Storch V, Becker N** (2009) Genetic differentiation of populations within the *Culex pipiens* complex and phylogeny of related species. *J Am Mosq Control Assoc* 25: 6-17.
- Weitzel T, Braun K, Collado A, Jöst A, Becker N** (2011) Distribution and frequency of *Culex pipiens* and *Culex torrentium* (Culicidae) in Europe and diagnostic allozyme markers. *Eur Mosq Bull* 29: 22-37.
- Weitzel T, Jawień P, Rydzanicz K, Lonc E, Becker N** (2014) *Culex pipiens* s.l. and *Culex torrentium* (Culicidae) in Wrocław area (Poland): occurrence and breeding site preferences of mosquito vectors. *Parasitol Res*: doi: 10.1007/s00436-014-4193-1.
- Werner D, Kronefeld M, Schaffner F, Kampen H** (2012) Two invasive mosquito species, *Aedes albopictus* and *Aedes japonicus japonicus*, trapped in south-west Germany, July to August 2011. *Euro Surveill* 17: 20067.

- Werner D, Kampen H** (2013) The further spread of *Aedes japonicus japonicus* (Diptera, Culicidae) towards northern Germany. *Parasitol Res* 112: 3665-3668.
- Werner D, Kampen H** (2014) *Aedes albopictus* breeding in southern Germany, 2014. *Parasitol Res*: doi: 10.1007/s00436-014-4244-7.
- Werren JH** (1997) Biology of *Wolbachia*. *Annu Rev Entomol* 42: 587-609.
- WHO** (2014a) Media centre: Vector-borne diseases. Fact Sheet N°387. Internet: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs387/en/> (aufgerufen am 30. März 2015)
- WHO** (2014b) A global brief on vector-borne diseases. Internet: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/111008/1/WHO_DCO_WHD_2014.1_eng.pdf (aufgerufen 30. März 2015)
- Wichard W, Arens W, Eisenbeis G** (1999) Atlas zur Biologie der Wasserinsekten. Springer Berlin Heidelberg, unveränd. Nachdruck 2013, 338pp.
- Wilking H, Stark K** (2014) Trends in surveillance data of human Lyme borreliosis from six federal states in eastern Germany, 2009-2012. *Ticks Tick Borne Dis* 5: 219-224.
- WWF** (2014) "Aliens" im Tier- und Pflanzenreich. Internet: http://www.wwf.de/fileadmin/fm-wwf/Publikationen-PDF/HG_Invasive_Arten.pdf (aufgerufen am 06. April 2015)
- Yen JH, Barr AR** (1973) The aetiological agent of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens*. *J In Pathol* 22: 242-250.
- Zgomba M, Petric D** (2008) Risk assessment and management of mosquito-borne diseases in the European region. Proc 6th Intern Conf Urban Pest. Internet: <http://icup.org.uk/reports%5CICUP872.pdf> (aufgerufen am 30. April 2015).
- Zittra C, Waringer J** (2014) Species inventory, ecology and seasonal distribution patterns of Culicidae (Insecta: Diptera) in the national park Donau-Auen (Lower Austria). *Aquatic Insects* doi: 10.1080/01650424.2014.1003946.
- Zittra C, Waringer J, Werblow A, Melaun C, Fuehrer H-P** (2014) Reconfirmation of *Culiseta (Allotheobaldia) longiareolata* (Marquardt 1838) (Diptera: Culicidae) in Austria. The first sequence-confirmed findings in northeastern Austria. *Acta ZooBot Austria* 150/151: 17-24.

Zrzavý J, Burda H, Storch D, Begall S, Mihulka S (2013) Evolution: Ein Lese-Lehrbuch, Springer Verlag Heidelberg-Berlin, 2. Auflage, 511pp.

Anhang 1

Tabelle 1 In Deutschland bekannte Stechmückenarten bei denen Erreger wie Viren, Bakterien (B), Filarien (F) und Protozoen (P) nachgewiesen wurden. Bei diesen Nachweisen wurde nicht unterschieden, ob die Tiere in der Wildnis oder im Labor infiziert wurden (Art und Wirtspräferenz nach Becker et al. 2014a).

Art	Wirtspräferenz	potentieller Überträger von	Referenz
<i>Aedes cinereus</i>	anthropophil mammalophil	<i>Borrelia afzelii</i> (B) <i>Borrelia garinii</i> (B) <i>Francisella tularensis</i> (B) Ockelbo-Virus Sindbis-Virus Tahyna-Virus West-Nil-Virus	Melaun et al. submitted Melaun et al. submitted Lundström et al. 2013 Turell et al. 1990 Lundström et al. 2013 Zgomba und Petric 2008 Zgomba und Petric 2008
<i>Aedes vexans</i>	anthropophil mammalophil	Batai-Virus <i>Borrelia afzelii</i> (B) <i>Borrelia garinii</i> (B) <i>Borrelia bavariensis</i> (B) California Encephalitis-Virus <i>Dirofilaria immitis</i> (F) <i>Dirofilaria repens</i> (F) Eastern Equine Encephalitis-Virus <i>Francisella tularensis</i> (B) Rift-Valley-Fever-Virus <i>Setaria tundra</i> (F) Tahyna-Virus Usutu-Virus Western Equine Encephalitis-Virus West-Nil-Virus	Scholte et al. 2008b Halouzka et al. 1998 Melaun et al. submitted Melaun et al. submitted Becker et al. 2010 Hendrix et al. 1980 Bocková et al. 2013 Becker et al. 2010 Lundström et al. 2011 Fontenille et al. 1998 Czajka et al. 2012, Becker et al. 2014a Reusken et al. 2011 Becker et al. 2010 Hemmer et al. 2007
<i>Anopheles algeriensis</i>	mammalophil	<i>Plasmodium falciparum</i> (P) <i>Plasmodium vivax</i> (P)	Becker et al. 2010 Hemmer et al. 2007
<i>Anopheles atroparvus</i>	anthropophil mammalophil	Myxoma-Virus <i>Plasmodium falciparum</i> (P) <i>Plasmodium malariae</i> (P) <i>Plasmodium vivax</i> (P) West-Nil-Virus	Reusken et al. 2011 Hemmer et al. 2007 Hemmer et al. 2007 Lundström et al. 2013 Reusken et al. 2010
<i>Anopheles claviger</i>	zoophil	Batai-Virus <i>Plasmodium vivax</i> (P) <i>Setaria tundra</i> (F)	Zgomba und Petric 2008 Hemmer et al. 2007 Czajka et al. 2012
<i>Anopheles maculipennis</i>	zoophil	Batai-Virus <i>Dirofilaria repens</i> (F) <i>Plasmodium vivax</i> (P) Sindbis-Virus Tahyna-Virus Usutu-Virus West-Nil-Virus	Jöst et al. 2011a Becker et al. 2014a Hemmer et al. 2007 Jöst et al. 2010 Scholte et al. 2008b Becker et al. 2014a Reusken et al. 2011
<i>Anopheles messeae</i>	zoophil	<i>Plasmodium vivax</i> (P) West Nil-Virus	Lundström et al. 2013 Hemmer et al. 2007
<i>Anopheles plumbeus</i>	anthropophil mammalophil	<i>Plasmodium falciparum</i> (P) <i>Plasmodium vivax</i> (P) West-Nil-Virus	Hemmer et al. 2007 Ponçon et al. 2007 Reusken et al. 2011
<i>Coquillettidia richiardii</i>	anthropophil mammalophil	Batai-Virus Omsk hämorrhagisches Fieber-Virus Sindbis-Virus Tahyna-Virus West-Nil-Virus	Reusken et al. 2011 Becker et al. 2010 Lebl et al. 2014 Lebl et al. 2014 Zgomba und Petric 2008

Anhang

Art	Wirtspräferenz	potentieller Überträger von	Referenz
<i>Culex hortensis</i>	zoophil	Usutu-Virus	Reusken et al. 2011
<i>Culex modestus</i>	anthropophil mammalophil	<i>Dirofilaria immitis</i> (F) <i>Francisella tularensis</i> (B) Lednice-Virus Myxoma -Virus Sindbis-Virus Tahyna-Virus West-Nil-Virus	Reusken et al. 2011 Becker et al. 2010 Becker et al. 2010 Reusken et al. 2011 Reusken et al. 2011 Reusken et al. 2011 Scholte et al. 2008b
<i>Culex pipiens</i> s.l.	anthropophil mammalophil ornithophil	Batai-Virus <i>Dirofilaria immitis</i> (F) <i>Dirofilaria repens</i> (F) Rift-Valley-Fever-Virus Sindbis-Virus St. Louis Encephalitis-Virus Tahyna-Virus Usutu-Virus West-Nil-Virus <i>Wuchereria bancrofti</i> (B)	Becker et al. 2014a Hemmer et al. 2007 Lundström et al. 2013 Scholte et al. 2008b Jöst et al. 2010 Hemmer et al. 2007 Scholte et al. 2008b Jöst et al. 2011b Lundström et al. 2013 Hemmer et al. 2007
<i>Culex territans</i>	zoophil	Usutu-Virus	Reusken et al. 2011
<i>Culex torrentium</i>	ornithophil	Batai-Virus Ockelbo-Virus Sindbis-Virus Usutu-Virus	Becker et al. 2014a Hemmer et al. 2007 Jöst et al. 2010 Becker et al. 2014
<i>Culiseta annulata</i>	anthropophil mammalophil	<i>Dirofilaria repens</i> (F) Myxoma-Virus <i>Plasmodium relictum</i> (P) Tahyna-Virus Usutu-Virus	Becker et al. 2014a Reusken et al. 2011 Huijben et al. 2005 Becker et al. 2010 Reusken et al. 2011
<i>Culiseta morsitans</i>	ornithophil	Eastern Equine Encephalitis-Virus Sindbis-Virus Ockelbo-Virus	Molaei et al. 2006 Reusken et al. 2011 Gratz 2004
<i>Culiseta subochrea</i>	mammalophil	<i>Borrelia garinii</i> (B)	Melaun et al. submitted
<i>Ochlerotatus annulipes</i>	anthropophil mammalophil	Tahyna-Virus	Becker et al. 2010
<i>Ochlerotatus cantans</i>	anthropophil mammalophil	Myxoma-Virus Ockelbo-Virus <i>Setaria tundra</i> (F) Tahyna-Virus West-Nil-Virus	Reusken et al. 2011 Zgomba und Petric 2008 Czajka et al. 2012 Becker et al. 2010 Reusken et al. 2010
<i>Ochlerotatus caspius</i>	anthropophil mammalophil	<i>Borrelia garinii</i> (B) Chikungunya-Virus <i>Francisella tularensis</i> (B) <i>Dirofilaria immitis</i> (F) Rift-Valley-Fieber-Virus Tahyna-Virus West-Nil-Virus	Melaun et al. submitted Scholte et al. 2008b Becker et al. 2010 Moutailler et al. 2008 Becker et al. 2010 Becker et al. 2010 Medlock et al. 2005
<i>Ochlerotatus cataphylla</i>	anthropophil mammalophil	<i>Borrelia bavariensis</i> (B)	Melaun et al. submitted
<i>Ochlerotatus communis</i>	anthropophil mammalophil	Batai-Virus <i>Borrelia afzelii</i> (B) <i>Borrelia garinii</i> (B) <i>Borrelia bavariensis</i> (B) <i>Francisella tularensis</i> (B) Inkoo-Virus Ockelbo-Virus	Zgomba und Petric 2008 Melaun et al. submitted Melaun et al. submitted Melaun et al. submitted Lundström et al. 2013 Lundström et al. 2013 Hemmer et al. 2007

Art	Wirtspräferenz	potentieller Überträger von	Referenz
<i>Ochlerotatus detritus</i>	anthropophil	Chikungunya-Virus	Scholte et al. 2008b
<i>Ochlerotatus dorsalis</i>	anthropophil	<i>Borrelia bavariensis</i> (B) California Encephalitis-Virus <i>Francisella tularensis</i> (B) Japanese Encephalitis-Virus Western Equine Encephalitis-Virus St. Louis Encephalitis-Virus Tahyna-Virus	Melaun et al. submitted Becker et al. 2010 Becker et al. 2010 Becker et al. 2010 Becker et al. 2010 Becker et al. 2010 Scholte et al. 2008
<i>Ochlerotatus excrucians</i>	anthropophil mammalophil	Ockelbo-Virus Tahyna-Virus West-Nil-Virus	Turell et al. 1990 Zgomba und Petric 2008 Zgomba und Petric 2008
<i>Ochlerotatus flavescens</i>	anthropophil mammalophil	Tahyna-Virus	Scholte et al. 2008b
<i>Ochlerotatus geniculatus</i>	anthropophil mammalophil	<i>Borrelia bavariensis</i> (B) <i>Dirofilaria immitis</i> (F) Gelbfieber-Virus Tahyna-Virus West-Nil-Virus	Melaun et al. submitted Hemmer et al. 2007 Reusken et al. 2011 Reusken et al. 2011 Reusken et al. 2011
<i>Ochlerotatus intrudens</i>	anthropophil mammalophil	Ockelbo-Virus	Zgomba und Petric 2008
<i>Ochlerotatus punctor</i>	anthropophil mammalophil	Batai-Virus <i>Francisella tularensis</i> (B) Inkoo-Virus	Reusken et al. 2011 Lundström et al. 2011 Lundström et al. 2013
<i>Ochlerotatus sticticus</i>	anthropophil	<i>Borrelia afzelii</i> (B) <i>Borrelia garinii</i> (B) California Encephalitis-Virus <i>Dirofilaria immitis</i> (F) <i>Francisella tularensis</i> (B) Inkoo-Virus <i>Setaria tundra</i> (F) Tahyna-Virus West-Nil-Virus	Melaun et al. submitted Melaun et al. submitted Hemmer et al. 2007 Hemmer et al. 2007 Lundström et al. 2013 Scholte et al. 2008b Czajka et al. 2012 Zgomba und Petric 2008 Lebl et al. 2014
in Deutschland invasive Stechmückenarten			
<i>Aedes albopictus</i>	anthropophil mammalophil	Cache-Valley-Virus Chikungunya-Virus Degue-Virus <i>Dirofilaria immitis</i> (F) <i>Dirofilaria repens</i> (F) Eastern Equine Encephalitis-Virus Gelbfieber-Virus Jamestown Canyon-Virus Japanese Encephalitis-Virus La Crosse-Virus Mayaro-Virus Potosi-Virus Oropouche-Virus Rift-Valley-Fieber-Virus Ross-River-Virus San Angelo-Virus Sindbis-Virus Tahyna-Virus Trivittatus-Virus Usutu-Virus Venezuelan Equine Encephalitis-Virus Western Equine Encephalitis-Virus	ECDC 2014b Scholte et al. 2008b Scholte et al. 2008b Becker et al. 2010 Cancrini et al. 2007 Schaffner et al. 2013 ECDC 2014b Schaffner et al. 2013 Schaffner et al. 2013 ECDC 2014b ECDC 2014b ECDC 2014b ECDC 2014b Scholte et al. 2008b ECDC 2014b ECDC 2014b ECDC 2014b Scholte et al. 2008b ECDC 2014b ECDC 2014b ECDC 2014b Scholte et al. 2008b ECDC 2014b ECDC 2014b ECDC 2014b Schaffner et al. 2013 ECDC 2014b

Anhang

Art	Wirtspräferenz	potentieller Überträger von	Referenz
		West-Nil-Virus Zika-Virus	Scholte et al. 2008b Schaffner et al. 2013
<i>Ochlerotatus japonicus japonicus</i>	anthropophil mammalophil	Chinkungunya-Virus Dengue-Virus Eastern Equine Encephalitis-Virus Japanese Encephalitis-Virus La Crosse-Virus Rift-Valley-Fieber-Virus St. Louis Encephalitis-Virus West-Nil-Virus Zika-Virus	Schaffner et al. 2011 Schaffner et al. 2011 Sardelis et al. 2002a Schaffner et al. 2013 Sardelis et al. 2002b Turell et al. 2013 Schaffner et al. 2013 Sardelis und Turell 2001 Schaffner et al. 2013

Anhang 2

Diversity of *Culex torrentium* Martini, 1925 — a potential vector of arboviruses and filaria in Europe

Antje Werblow · Sarah Bolius ·
Adriaan W. C. Dorresteijn · Christian Melaun ·
Sven Klimpel

Received: 20 March 2013 / Accepted: 27 March 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract *Culex torrentium* is one of the most common mosquito species in Germany. Due to its sympatric occurrence as well as its similar morphological and ecological characteristics, it has often been confused with another common species, *Culex pipiens*. Both species are known to be potential vectors for different arboviruses (not only in Germany) with *C. torrentium* being a possible vector for Sindbis or Ockelbo virus. In our study, we analyzed the genetic variability in a 658 bp fragment of the cytochrome c oxidase subunit I gene (coxI) of *C. torrentium*, from nine localities in the Frankfurt/Rhine-Main Metropolitan Region. The results of our genetic survey indicate a higher genetic diversity in this gene region for *C. torrentium* than for the morphologically similar *C. pipiens*. Our findings may explain the difficulties in the past to find morphological characteristics that apply to all populations of *C. torrentium*, when attempting to separate them clearly from *C. pipiens*, by any other criteria than male genitalia. Being ornithophilic, possible hybrids between *C. torrentium* and the humanophilic *C. pipiens* biotype *molestus*, could potentially serve as important vectors for zoonotic diseases. Therefore,

we recommend that greater emphasis is placed on the ecological characteristics, population structure, and the taxonomy of this often neglected species, in the future.

Introduction

Mosquito species of the genus *Culex* are important vectors of many viruses and some zoonotic nematodes. However, species determination is often difficult due to their morphological similarity (e.g., Lundström 1999; Hesson et al. 2011). Especially in Central Europe, the differentiation of *Culex torrentium* and *Culex pipiens* is difficult, because both species are morphologically almost identical (Service 1968; Onyeka 1982), often occur sympatrically (Scherpner 1960; Gillies and Gubbins 1982; Ishii and Sohn 1987; von Struppe 1989; Raymond 1995), and share comparable ecological characteristics regarding the habitat of the adult mosquitoes as well as breeding sites. The morphological characteristics of the male genitalia of *C. torrentium* and *C. pipiens* (Becker et al. 2010) differ from each other, while females of both species cannot be distinguished. This problematic identification is the reason why both were mistaken with each other in previous studies (e.g., Vinogradova et al. 2007). It also leads to an incomplete knowledge of the quantitative, spatial, and temporal distribution of both species (Weitzel et al. 2011). Weitzel et al. (2011) mentioned that many studies have not separated these species and handled them as bundles of “*C. pipiens/torrentium*” (e.g., Schäfer et al. 2004). It also seems as if the presumptive existence of *C. torrentium* has been neglected or ignored (Weitzel et al. 2011).

Both species are known as vectors for different arboviruses. While *C. pipiens* is the most likely vector for the West Nile virus in Europe, the Ockelbo virus has been isolated from both *C. pipiens* and *C. torrentium* (Becker et al. 2010).

A. Werblow · S. Bolius · C. Melaun · S. Klimpel
Biodiversity and Climate Research Centre (BiK-F), Medical
Biodiversity and Parasitology; Goethe-University (GO), Institute
for Ecology, Evolution and Diversity; Senckenberg Gesellschaft
für Naturforschung (SGN), Senckenberganlage 25
Frankfurt am Main 60325 Germany

A. Werblow · C. Melaun (✉)
Senckenberg German Entomological Institute (SDEI),
Eberswalder Str. 90
Müncheberg 15374 Germany
e-mail: Christian.Melaun@senckenberg.de

S. Bolius · A. W. C. Dorresteijn
Institute for General Zoology and Developmental Biology, Justus
Liebig University (JLU), Stephanstrasse 24
Giessen 35390 Germany

In Sweden, the highest field infection rate of the Sindbis virus has been recorded from unseparated *C. pipiens*/*C. torrentium* pools. In 2009, the Sindbis virus was isolated in Germany from *C. torrentium* (Jöst et al. 2010). Being very susceptible to oral infection and a highly competent transmitter, *C. torrentium* must be considered as a very efficient vector (Lundström et al. 1990a, b). This, in combination with the species' ornithophilic habit and the potential pathogen load, Hesson et al. (2011) consider this species as the main enzootic vector for Sindbis in Sweden. In addition, according to Becker et al. (2010), it shows a higher vector competence for Ockelbo than *C. pipiens* in the laboratory. The European abundance and distribution of both *C. pipiens* and *C. torrentium* is solely based on identified males, and is therefore largely unknown (Hesson et al. 2011). This is surprising, given the fact that control programs, as well as vector surveys, require accurate and safe identification.

In the present investigation, we studied different populations of *C. pipiens* and *C. torrentium* from the Frankfurt/Rhine-Main Metropolitan Region. This area, located in the central western part of Germany, is the second largest municipal area with a total population of more than 5.8 million. Additionally, Germany's biggest airport, one of the main hubs of global air traffic, is located there. As an international traffic platform, the region should draw attention given its potential role as a port for incoming as well as outgoing, vector species. It is therefore essential to commence surveys, regarding potential vector species in this large metropolitan area. Of particular interest are the abundance, distribution, clear species identification, and population structure of *C. pipiens* and *C. torrentium*.

Material and methods

Collection of larvae and imagines

The analyzed specimens were collected in the period between May–October 2012. Larvae and imagines were caught within a 50 km radius of the Frankfurt urban center in a total of nine localities (Bad Vilbel, Eichen, Frankfurt-Bockenheim, Frankfurt-Bornheim, Frankfurt-Ostend, Gründau, Heldenbergen, Höchst an der Nidder, Klein Linden). Natural (e.g. puddles, ponds, tree and rock holes, slow-flowing waters) as well as artificial (e.g. vases, rain barrels, buckets) water pools were used as sampling sites for larvae. Larvae were obtained using proper hand nets or ovitraps, killed and preserved in 70 % ethanol or kept alive to raise them to imagines. For morphological identification (based on Becker et al. 2010) of larvae as well as imagines, a stereomicroscope was used. Imagines were collected using

BG-Sentinel™ traps (Biogents AG, Regensburg, Germany) with CO₂ and/or BG-Lure™ as an attractant as well as EVS-traps with dry ice. Caught specimens were stored at –20 °C in order to kill them before being stored in 50 ml tubes.

Molecular species identification

DNA from larvae, as well as imagines, was obtained using a glass fiber plate (Pall GmbH, Dreieich) DNA extraction following the protocol of Ivanova et al. (2006). Quality and yield of DNA was analyzed by SYBR Green (Life Technologies GmbH) staining and agarose gel-electrophoresis. PCR amplification of a cytochrome c oxidase subunit I (coxI) gene fragment was performed using LCO 1490 and HCO 2198 primers (Folmer et al. 1994). PCR reaction mixture contained 10 pmol of each primer, 0.2 nM of each dNTP, PCR buffer, BSA, MgCl₂, 1 U *Taq* polymerase (TrueStart™ Hot Start Fermentas), and varying concentrations of DNA and Millipore water, in a total volume of 30 µl. Cycle parameters were the following: 1 cycle of 94 °C, 2 min; 40 cycles of 94 °C, 60 s; 45 °C, 60 s; 72 °C, 60 s; 1 cycle 72 °C, 5 min; with a final ramping to 4 °C. PCR products were sequenced on an ABI 3730 DNA Analyzer. Each sequence was double-checked by hand, using BioEdit (Hall 1999) and MEGA 4 (Tamura et al. 2007). Sequences with uncertain nucleotide positions were excluded from the analysis. The edited sequences were compared with sequences deposited in GenBank using the BLAST algorithm (Altschul et al. 1997). After cutting the primer sequences, the resulting fragments were 658 bp in length. The obtained sequences were deposited in GenBank under accession numbers HF562483–HF562837.

Results

In total, 355 sequences from *Culex* spp. were obtained, edited, and compared with those deposited in the GenBank. With the exception of two *Culex modestus* specimens, all were identified as either *C. pipiens* ($n=252$) or *C. torrentium* ($n=101$). No distinction was made between *C. pipiens pipiens* and *Culex pipiens molestus*. It is therefore probable that the data set contains specimens from both of these groups. Specimens were collected at nine locations in the studied Frankfurt/Rhine-Main Metropolitan Region (Fig. 1). *Culex torrentium* was found together with *C. pipiens* at five localities and alone at two (Table 1) as well as *C. pipiens*. Comparison of the sequences revealed seven haplotypes of *C. pipiens* with only one substitution each (Fig. 2). The sequences of *C. torrentium* showed 16 different haplotypes, with up to four nucleotide substitutions in each of them (Fig. 3). For both species, the most frequent haplotype was used as the reference sequence.



Fig. 1 Distribution of *Culex pipiens* and *C. torrentium* in the Frankfurt/Rhine-Main Metropolitan Region. Map **a** shows the position of Hesse and the main sampling site Frankfurt within Germany. Map **b** and **c** show the different single sites where just *C. pipiens* (circles), *C.*

torrentium (triangles) or both species (squares) were detected. Localities: 1 Frankfurt-Bockenheim, 2 Frankfurt-Bornheim, 3 Frankfurt-Ostend, 4 Bad Vilbel, 5 Heldenbergen, 6 Eichen, 7 Höchst an der Nidder, 8 Gründau, 9 Klein Linden

In *C. pipiens*, only five G→A and one T→C transitions were detected, while in *C. torrentium*, six different substitutions were proved. The substitution T→C was the most

common, in total, the analyzed sequences showed this six times, while C→T and G→A could be found three times each, and A→G as well as A→T twice. The least frequent

Table 1 Distribution of *Culex pipiens* and *C. torrentium* at the different sampling localities (numbers corresponding to localities in Fig. 1)

Locality	<i>n Culex pipiens</i>	<i>n haplotypes</i>	<i>n Culex torrentium</i>	<i>n haplotypes</i>
1 Frankfurt-Bockenheim	53	2	11	1
2 Frankfurt-Bornheim	–	–	5	2
3 Frankfurt-Ostend	–	–	2	2
4 Bad Vilbel	45	1	17	2
5 Heldenbergen	66	6	1	1
6 Eichen	33	1	–	–
7 Höchst an der Nidder	9	1	–	–
8 Gründau	3	1	7	3
9 Klein Linden	43	2	58	11

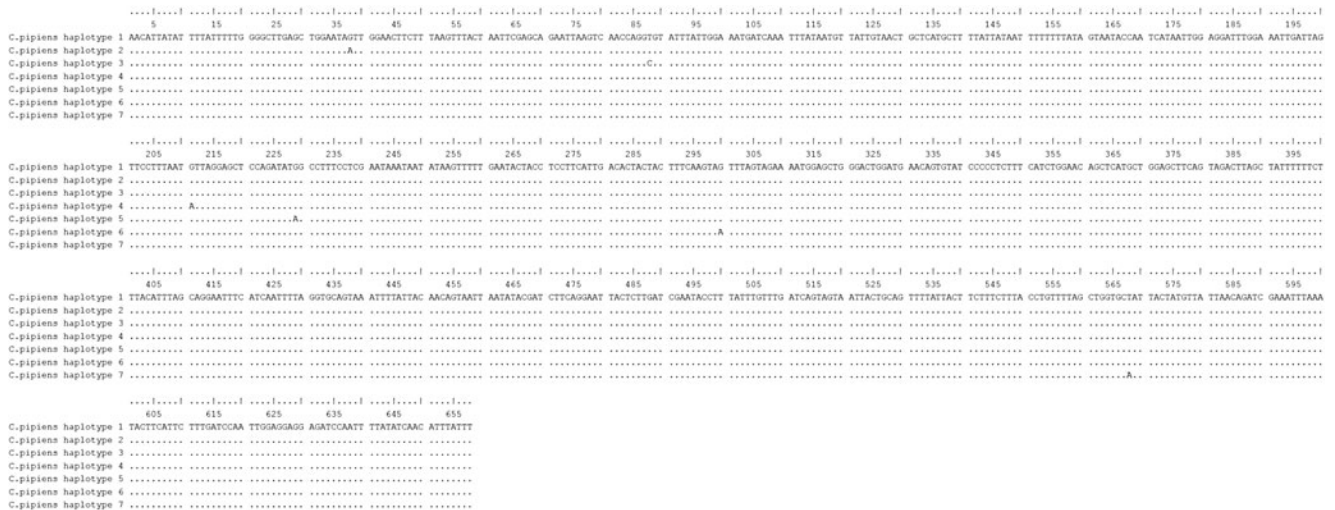


Fig. 2 Haplotypes of the *coxI* fragment of *Culex pipiens* detected in the Frankfurt/Rhine-Main Metropolitan Region. It shows the individual substitutions (only one for each haplotype) within the nucleotide sequences. The most frequent sequence ($n=234$) was used as reference (haplotype 1)

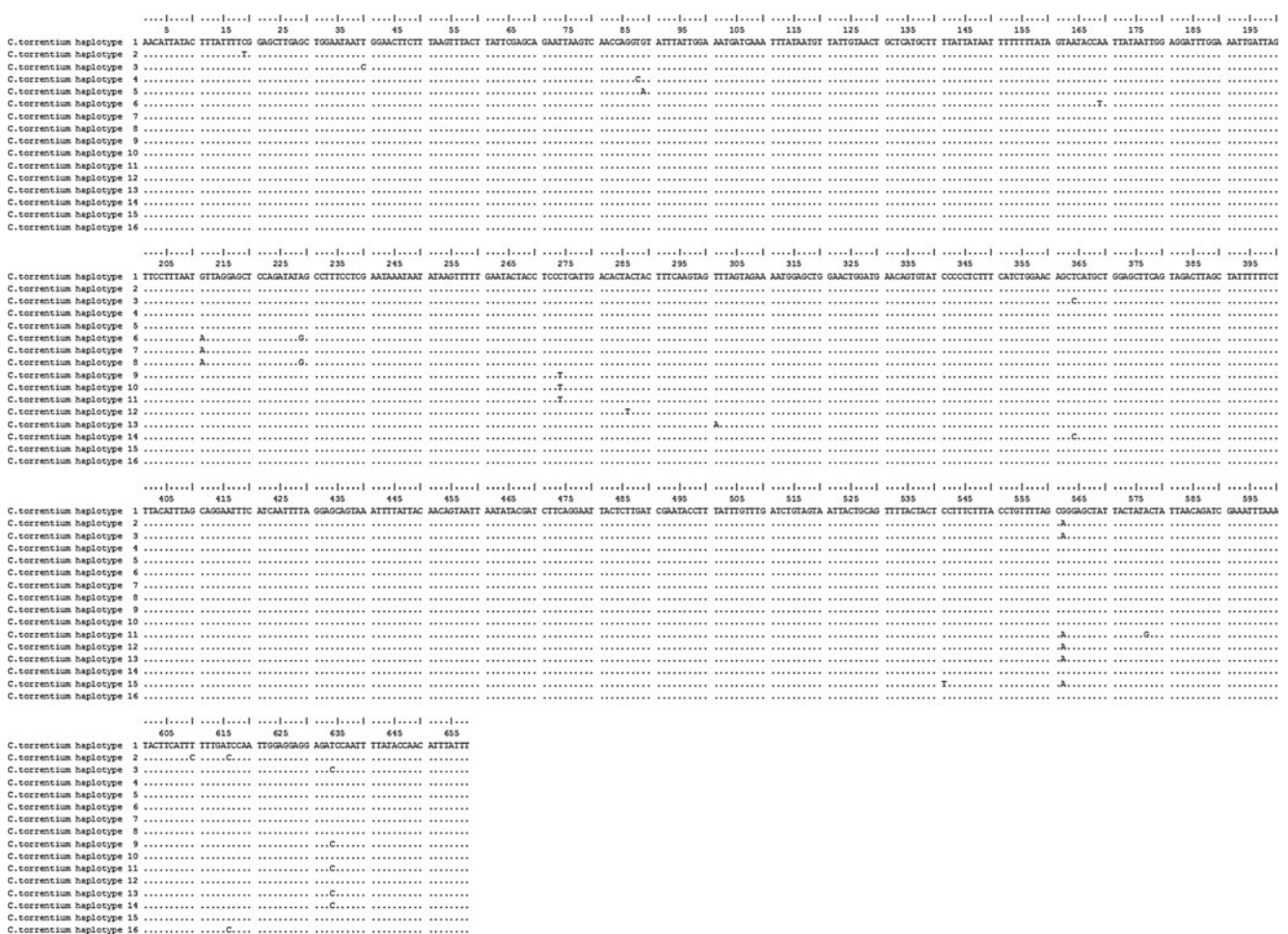


Fig. 3 Different haplotypes of the *coxI* fragment proved in *Culex torrentium* from the Frankfurt/Rhine-Main Metropolitan Region. Within this study, 16 haplotypes with up to four nucleotide substitutions could be

detected. Haplotype 1 was the most frequent sequence ($n=66$) and was therefore used as reference

substitution was T → A, which was proven only once (Fig. 4). Furthermore, no other visible substitutions occurred within the analyzed fragment. A comparison of the areas with different haplotypes showed no visible accumulation or trend, since the difference seems to display a scattered distribution.

Discussion

In Germany, about 50 different species of mosquitoes are currently known (Becker et al. 2010; Becker and Hoffmann 2011). The morphological differentiation of these species is a major challenge for scientists. Some species can be differentiated based on morphological characteristics (Mohrig 1969; Becker et al. 2010). For other species, such as *C. pipiens* and *C. torrentium*, the identification is not as easy, and at times, even impossible. The fact that *C. torrentium* was not described until 1925, even though the research on mosquitoes was rather well established at that time, underlines the difficulties to distinguish *C. torrentium* from *C. pipiens* (Smith and Fonseca 2004; Weitzel et al. 2011). The morphological distinction of females of *C. pipiens* and *C. torrentium* is almost impossible (Weitzel et al. 2009). Therefore, females of *C. torrentium* were not treated separately from *C. pipiens* until their potential vector ability for Sindbis was described (Lundström 1994; Jöst et al. 2010). Recently, in a study from Germany, sequences of unspecified filaria could be detected within pools of *Culex* spp., showing members of this genus can also act as vector for filaria (Czajka et al. 2012).

In addition, nearly all morphological characteristics of males are variable and overlapping (Dahl 1988; Weitzel et al. 2009). Taking this into consideration, the only reliable method of morphological differentiation of these two species is the microscopical examination of the male genitalia (Shaikevich 2007). Given the fact that these two species are both vectors of human and animal diseases, a reliable identification of the species is indispensable. Therefore, different molecular genetic markers [e.g., ace-2, a PCR-based assay that uses polymorphisms in the second intron of the

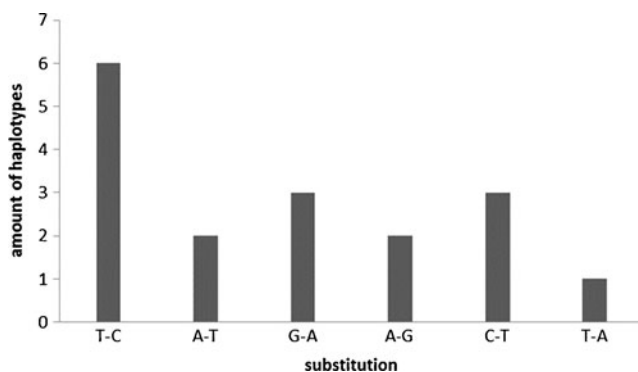


Fig. 4 Amount of different substitution types of the coxI fragment of *Culex torrentium*

acetylcholinesterase-2 (Smith and Fonseca 2004)], internal transcribed spacer (ITS)-sequences (Miller et al. 1996), or enzyme electrophoretic methods have been used for identification in the past. In our study, we used the mitochondrial coxI.

We could demonstrate that there is interspecific variability in mitochondrial DNA between *C. pipiens* and *C. torrentium* in the Frankfurt/Rhine-Main Metropolitan Region, which was indicated by Berger (2011), who found a similar but smaller number of haplotypes for more habitat localities in a similar area. Interestingly, *C. torrentium* shows a particular high intraspecific variability in this area which is very surprising, due to the fact that the current obtained *C. pipiens* specimens are more frequent but less diverse. The low intraspecific variability of *C. pipiens* is similar to the findings of Fedorova and Shaikevich (2007) from the Moscow area in Russia, and to the ones from Guillemaud et al. (1997) involving laboratory strains. It also corresponds to the results involving other mosquito taxa, even though these analyses were made on introduced species like *Aedes aegypti* and *A. albopictus* in Brazil (e.g., Scarpassa et al. 2008; Maia et al. 2009). Nevertheless, laboratory experiments with the aim of crossing different *C. pipiens* strains showed multiple incompatibilities (Laven 1951; Magnin et al. 1987). This can be due to the fact that diverse behavioral patterns of different forms e.g. stenogamic and eurygamic characteristics have not been taken into account. On the other hand, the low genetic variability in this species also indicates that the use of other markers has to be considered, especially when trying to differentiate *C. pipiens pipiens* and *C. pipiens pipiens molestus* from each other.

So far, no hybridization experiments between different populations of *C. torrentium* have been performed. No further analyses, which focus on the genetic intraspecific variability of *C. torrentium*, have been carried out. That is not comprehensible, especially considering the difficulties to characterize *C. torrentium* with constant morphologies throughout the populations and separating the species clearly from *C. pipiens*. Federova and Shaikevich (2007) described the R_2/R_{2+3} ratio as more than 4 for two of the surveyed populations of *C. torrentium* and less than 4 for another one. This character does not show uniformity and therefore failed in their analysis as a diagnostic character. In the same paper, the ITS-2 sequence of the ribosomal DNA of the latter population was presented. It shows differences in the 3'-region when compared to the sequence of an individual from the two other populations. Unfortunately, neither the ITS-2 region of the third population nor the analyzed coxII fragment was sequenced.

Previous analyses also indicate a morphological variability within *C. torrentium*. These comprise morphological characteristics like the R_2/R_{2+3} ratio (Federova and Shaikevich 2007). When Martini (1925) described *C. torrentium*, he mentioned pigmentation details to distinguish

it from *C. pipiens*, but this method turned out to be not reliable. This may be a reason why *C. torrentium* has been overlooked for such a long time. According to former studies, the characteristics seem to be consistent within certain populations, but failed when compared with others, making clear that determination is only possible in the distinction of male individuals. For females, no constant characteristics to differentiate them from *C. pipiens* have been found so far. This makes it difficult to check the vector abilities of *C. torrentium* in the wild, as only an additional molecular species characterization gives results. In our preliminary survey, morphological differences corresponding to the various haplotypes of *C. torrentium* were not examined. If the genetic and morphological variability coincide with each other, it could be a sign for substructure or even cryptic speciation within *C. torrentium*, especially considering that this species has been overlooked for a long time. Possible cryptic species could be of interest, especially if they are able to vary with regards to their vector abilities. Different species may also hybridize with each other and/or with *C. pipiens*, which could result in varying nutrition behavior concerning the host preference. This is a possible way that neglected and/or cryptic species and possible hybrids can act as vectors of zoonotic diseases. Further studies could possibly reveal the reasons for the process of speciation. Because of their high copy number, mitochondrial markers are often used for phylogenetic studies. Generally, mitochondrial markers show a higher mutation rate than nuclear markers in insects (Lin and Danforth 2004). This means using mitochondrial marker lineages will resolve lineages more quickly than using nuclear ones (Ballard and Whitlock 2004). Therefore, to effectively study lineage splitting, future studies should comprise a combination of mitochondrial and nuclear markers. Nevertheless, our results with the *coxI* marker indicate a splitting within *C. torrentium*. Whether this means that cryptic species are involved, or *C. torrentium* is a variable species, should be regarded as worthy of investigation in future, in combination with nuclear markers like *ace-2*, which gave an insight into a similar situation in the genus *Culex* (Hemmerter et al. 2009). Regardless of possible secondary taxonomic consequences, a big-scale survey on this issue could reveal new information about disease and vector biology.

Acknowledgments The present study was financially supported by the research funding program “LOEWE — Landes-Offensive zur Entwicklung Wissenschaftlich-ökonomischer Exzellenz” of Hesse’s Ministry of Higher Education, Research, and the Arts and by the SAW (Senate Competition Committee) grant (SAW-2011-BNI-3) of the Leibniz Association. We also thank Melissa Anderton, Portsmouth for editing the text.

References

- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389–3402
- Ballard JW, Whitlock MC (2004) The incomplete natural history of mitochondria. *Mol Ecol* 13:729–744
- Becker N, Hoffmann D (2011) First record of *Culiseta longiareolata* (Marcquart) for Germany. *Eur Mosq Bull* 29:143–150
- Becker N, Petrić D, Zgomba M, Boase C, Dahl C, Lane J, Kaiser A (2010) Mosquitoes and their control, 2nd edn. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York
- Berger R (2011) Stechmücken (Culicidae) des Rhein-Main-Gebietes — Ökologie, Biologie, und medizinische Bedeutung. Diploma thesis of the Goethe University Frankfurt, Germany
- Czajka C, Becker N, Poppert S, Jöst H, Schmidt-Chanasit J, Krüger A (2012) Molecular detection of *Setaria tundra* (Nematoda: Filarioidea) and an unidentified filarial species in mosquitoes in Germany. *Parasit Vectors* 5:14. doi:10.1186/1756-3305-5-14
- Dahl C (1988) Taxonomic studies on *Culex pipiens* and *Culex torrentium*. In: Service MW (ed) Biosystematics of haematophagous insects, vol 37, Systematics association special volume. Clarendon Press, Oxford, pp 149–175
- Federova MV, Shaikevich EV (2007) Morphological and molecular-genetic distinctions between adult mosquitoes *Culex torrentium* Martini and *C. pipiens* Linnaeus (Diptera, Culicidae) from Moscow province. *Entomol Rev* 87:127–135
- 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* 3:294–297
- Gillies MT, Gubbins SJ (1982) *Culex (Culex) torrentium* Martini and *Cx. (Cx.) pipiens* L. in a southern English county, 1974–1975. *Mosq Syst* 14:127–130
- Guillemant T, Pasteus N, Rousset F (1997) Contrasting levels of variability between cytoplasmic genomes and incompatibility types in the mosquito *Culex pipiens*. *Proc R Soc Lond B* 264:245–251
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41:95–98
- Hemmerter S, Šlapeta J, Beebe NW (2009) Resolving genetic diversity in Australasian *Culex* mosquitoes: incongruence between the mitochondrial cytochrome c oxidase I and nuclear acetylcholine esterase 2. *Mol Phylogenet Evol* 50:317–325
- Hesson JC, Östman Ö, Schäfer M, Lundström JÖ (2011) Geographic distribution and relative abundance of the sibling vector species *Culex torrentium* and *Culex pipiens* in Sweden. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11:1383–1389
- Ishii T, Sohn SR (1987) Highly polluted larval habitats of the Swedish *Culex pipiens* complex in Sweden. *J Am Mosq Contr* 3:276–281
- Ivanova NV, deWaard J, Hebert PDN (2006) An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Mol Ecol Notes* 6:998–1002
- Jöst H, Bialonski A, Storch V, Günther S, Becker N, Schmidt-Chanasit J (2010) Isolation and phylogenetic analysis of Sindbis viruses from mosquitoes in Germany. *J Clin Microbiol* 48:1900–1903
- Laven H (1951) Crossing experiments with *Culex* strains. *Evolution* 5:370–375
- Lin CP, Danforth BN (2004) How do insect nuclear and mitochondrial gene substitution patterns differ? Insights from Bayesian analyses of combined datasets. *Mol Phylogenet Evol* 30:686–702
- Lundström JO (1994) Vector competence of Western European mosquitoes for arboviruses: a review of field and experimental studies. *Bull Soc Vector Ecol* 19:23–26
- Lundström JO (1999) Mosquito-borne viruses in Western Europe: a review. *J Vector Ecol* 24:1–39

- Lundström JO, Niklasson B, Francy DB (1990a) Swedish *Culex torrentium* and *Cx. pipiens* (Diptera: Culicidae) as experimental vectors of Ockelbo virus. *J Med Entomol* 27:561–563
- Lundström JO, Turell MJ, Niklasson B (1990b) Effect of environmental temperature on the vector competence of *Culex pipiens* and *C. torrentium* for Ockelbo virus. *Am J Trop Med Hyg* 43:534–542
- Magnin M, Pasteur N, Raymond M (1987) Multiple incompatibilities within populations of *Culex pipiens* L. in southern France. *Genetica* 74:125–130
- Maia RT, Scarpassa VM, Maciel-Litaiff LH, Tadei WP (2009) Reduced levels of genetic variation in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) from Manaus, Amazonas State, Brazil, based on analysis of the mitochondrial DNA ND5 gene. *Genet Mol Res* 8:998–1007
- Martini E (1925) Zwei bemerkenswerte Culiciden von einem eigenartigen Biotop. *Internat Rev Hydrobiol* 12:333–337
- Miller BR, Crabtree MB, Savage HM (1996) Phylogeny of fourteen *Culex* mosquito species, including the *Culex pipiens* complex, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Insect Mol Biol* 5:93–107
- Mohrig W (1969) Die Culiciden Deutschlands. Parasitologische Schriftenreihe 18. Gustav Fischer Verlag, Jena
- Onyeka JOA (1982) The taxonomic value of pre-alar scales in the identification of *Culex (Culex) pipiens* L. and *Culex (Cx.) torrentium*. *Mosq Syst* 14:41–52
- Raymond M (1995) On the breeding period of *Culex pipiens* and *C. torrentium* (Diptera, Culicidae) in Uppsala, Sweden. *Entomol Tidskr* 116:65–66
- Scarpassa VM, Cardoza TB, Cardoso Junior RP (2008) Population genetics and phylogeography of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 78:895–903
- Schäfer ML, Lundström JO, Pfeffer M, Lundkvist E, Ladin J (2004) Biological diversity versus risk for mosquito nuisance and disease transmission in constructed wetlands in southern Sweden. *Med Vet Entomol* 18:256–267
- Scherpner C (1960) Zur Ökologie und Biologie der Stechmücken des Gebietes von Frankfurt am Main (Diptera, Culicidae). *Mitt Zool Mus Berlin* 36:49–99
- Service MW (1968) The taxonomy and biology of two sympatric sibling species of *Culex*, *C. pipiens*, and *C. torrentium* (Diptera, Culicidae). *J Zool Lond* 156:313–323
- Shaikevich EV (2007) PCR-RFLP of the COI gene reliably differentiates *C. pipiens*, *C. pipiens* f. *molestus*, and *C. torrentium* of the *pipiens* complex. *Eur Mosq Bull* 23:25–30
- Smith JL, Fonseca DM (2004) Rapid assay for identification of members of the *Culex (Culex) pipiens* complex, their hybrids, and other sibling species (Diptera: Culicidae). *Am J Trop Med Hyg* 70:339–345
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596–1599
- Vinogradova EB, Shaikevich EV, Ivanitsky AV (2007) A study of the distribution of the *Culex pipiens* complex (Insecta: Diptera: Culicidae) mosquitoes in the European part of Russia by molecular methods of identification. *Comp Cytogenet* 1:129–138
- von Struppe T (1989) Biologie und Ökologie von *Culex torrentium* Martini unter besonderer Berücksichtigung seiner Beziehungen im menschlichen Siedlungsbereich. *Angew Zool* 3:257–286
- Weitzel T, Collado A, Jöst A, Pietsch K, Storch V, Becker N (2009) Genetic differentiation of populations within the *Culex pipiens* complex and phylogeny of related species. *J Am Mosq Control Assoc* 25:6–17
- Weitzel T, Braun K, Collado A, Jöst A, Becker N (2011) Distribution and frequency of *Culex pipiens* and *Culex torrentium* (Culicidae) in Europe and diagnostic allozyme markers. *Eur Mosq Bull* 29:22–37



Population Structure and Distribution Patterns of the Sibling Mosquito Species *Culex pipiens* and *Culex torrentium* (Diptera: Culicidae) Reveal Different Evolutionary Paths

Antje Werblow¹, Sven Klimpel¹, Sarah Bolius², Adriaan W. C. Dorresteijn², Jan Sauer³, Christian Melaun^{1*}

1 Goethe-University (GU), Institute for Ecology, Evolution and Diversity; Biodiversity and Climate Research Centre (BiK-F), Senckenberg Gesellschaft für Naturforschung (SGN), Frankfurt am Main, Germany, **2** Institute for General Zoology and Developmental Biology, Justus Liebig University (JLU), Giessen, Germany, **3** Department of Chemical Ecology, Bielefeld University, Bielefeld, Germany

Abstract

Nowadays a number of endemic mosquito species are known to possess vector abilities for various diseases, as e.g. the sibling species *Culex pipiens* and *Culex torrentium*. Due to their morphological similarity, ecology, distribution and vector abilities, knowledge about these species' population structure is essential. Culicidae from 25 different sampling sites were collected from March till October 2012. All analyses were performed with aligned *cox1* sequences with a total length of 658 bp. Population structure as well as distribution patterns of both species were analysed using molecular methods and different statistical tests like distance based redundancy analysis (dbDRA), analysis of molecular variances (AMOVA) or McDonald & Kreitman test and Tajima's D. Within both species, we could show a genetic variability among the *cox1* fragment. The construction of haplotype networks revealed one dominating haplotype for *Cx. pipiens*, widely distributed within Germany and a more homogeneous pattern for *Cx. torrentium*. The low genetic differences within *Cx. pipiens* could be a result of an infection with *Wolbachia* which can induce a sweep through populations by passively taking the also maternally inherited mtDNA through the population, thereby reducing the mitochondrial diversity as an outcome of reproductive incompatibility. Pairwise population genetic differentiation (F_{ST}) ranged significantly from moderate to very great between populations of *Cx. pipiens* and *Cx. torrentium*. Analyses of molecular variances revealed for both species that the main genetic variability exists within the populations (*Cx. pipiens* [88.38%]; *Cx. torrentium* [66.54%]). Based on a distance based redundancy analysis geographical origin explained a small but significant part of the species' genetic variation. Overall, the results confirm that *Cx. pipiens* and *Cx. torrentium* underlie different factors regarding their mitochondrial differentiation, which could be a result of endosymbiosis, dispersal between nearby located populations or human introduction.

Citation: Werblow A, Klimpel S, Bolius S, Dorresteijn AWC, Sauer J, et al. (2014) Population Structure and Distribution Patterns of the Sibling Mosquito Species *Culex pipiens* and *Culex torrentium* (Diptera: Culicidae) Reveal Different Evolutionary Paths. PLoS ONE 9(7): e102158. doi:10.1371/journal.pone.0102158

Editor: Rick Edward Paul, Institut Pasteur, France

Received: March 17, 2014; **Accepted:** June 16, 2014; **Published:** July 21, 2014

Copyright: © 2014 Werblow et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper and its Supporting Information files; accession numbers of used sequence data are listed in the paper.

Funding: The present study was financially supported by the research funding program "LOEWE – Landes-Offensive zur Entwicklung Wissenschaftlich-ökonomischer Exzellenz" of Hesse's Ministry of Higher Education, Research, and the Arts, by the SAW (Senate Competition Committee) grant (SAW-2011-BNI-3; SAW-2014-SGN-3) of the Leibniz Association as well as the German Research Council (grant no. DFG BiodivERSA KL 2087/6-1). Jan Sauer is funded by a research grant of the German Research Council (DFG) (SA2228/1-1). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: christian.melaun@senckenberg.de

Introduction

Since the late 19th century, mosquitoes are known as vectors for various diseases as malaria, dengue, yellow or Chikungunya fever [1,2]. However the neglect of research on mosquitoes has resulted in little knowledge about mosquito fauna and its vector competence, especially in Germany. Only during recent years, research in this field has been continued and intensified. Many mosquito species are extremely adaptable to changing climate conditions or the consequences of urbanization [3], which has already led to the expansion of species' distribution, at least for some species. In addition, the spread is encouraged by the increasing international travel and global freight transportation

which have direct influence on the introduction and establishment of mosquito-associated viruses from other countries to Europe [4–6]. Many studies deal with invasive species such as *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* or *Ochlerotatus japonicus*, which have been introduced and established in different countries. However, numerous indigenous mosquito species are known to be potential carriers of diseases such as Sindbis virus, Ockelbo virus, Usutu virus, Batai virus, West-Nile virus or even malaria [2,7–11].

In this context the genus *Culex* with more than 750 described species worldwide [3] is of high medical and veterinary interest. Its members are vectors for various diseases, and occur in the proximity of human dwellings [7]. Within the genus *Culex*, the

subgenus *Culex* includes seven species in Europe [12], with *Cx. pipiens* being one of the most common and widespread holarctic species. Together with its palaeartic biotypes *Cx. pipiens pipiens* and *Cx. pipiens molestus*, *Cx. pipiens* belongs to the *Culex pipiens* complex which also includes the non-European species *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. australicus* as well as *Cx. globocoxitus* [13]. Females of *Cx. pipiens pipiens* are known to be ornithophilic, but several studies also mention a potential anthropophilic diet (e.g. [14]). Furthermore they are anautogenous, eurygamous and diapausing during wintertime. After diapause, females lay egg batches of 150–240 eggs on the water surface where the larvae hatch within one or two days. Depending on climate conditions larval development takes one week up to several weeks with several generations per year [3]. The larvae of *Cx. pipiens* can be found in nearly every natural, artificial, permanent or semi-permanent water body as well as in rural or urban areas [15,16].

Culex torrentium another common species is considered to be the sister-taxon of *Cx. pipiens* [17]. The differentiation of larvae and females of both species is extremely difficult resulting in wrong determination or neglect [18,19]. They share comparable ecological characteristics regarding the habitat of the adults as well as breeding sites and an almost identical morphology [18]. The only reliable distinguishable morphological characteristic is the structure of the male hypopygium [16]. Thus, it is not always certain that *Cx. torrentium* and *Cx. pipiens* were correctly differentiated in publications of past decades, where they were also often only collectively evaluated as bundles of “*Cx. pipiens/torrentium*” [20,21]. As a consequence, European abundance and distribution of *Cx. pipiens* and *Cx. torrentium* was solely based on few identified males, and the distribution of both species is largely unknown [16,22] with most existing data being limited to Scandinavia and Russia [14,17,21,22]. A detailed knowledge of the distribution of both species is essential as both are able to transmit a variety of diseases [13]. Notably *Cx. pipiens* is a vector for the West Nile virus which has become the most important mosquito-borne virus during the last 20 years in the warmer regions of Europe [2]. Usually, the virus is transmitted in an avian cycle, but it is also responsible for an increasing number of human infections [2,23]. The symptoms vary from fever to coma and paralysis [24,25]. *Culex pipiens* is also a vector of different encephalitis diseases and Rift valley fever [17]. Experimental studies detected *Cx. pipiens* and *Cx. torrentium* as potential vectors of Sindbis and Ockelbo virus, with *Cx. torrentium* showing a significantly higher vector competence in the laboratory and seeming to be the main enzootic vector for Sindbis virus in Sweden [12,22]. Because of the medical importance and the unsatisfactory morphological differentiation of both species, clear identification methods are of great interest. To enable an unequivocal classification several PCR-based assays have been developed using different molecular genetic markers e.g., ace-2 or ITS2 [13,17,26]. Vinogradova and Shaikevich [27] make use of the *Wolbachia* infection in *Cx. pipiens* (inherited maternally) in order to distinguish this type from *Cx. torrentium*. Recently a multiplex real-time PCR for simultaneous detection and differentiation of *Cx. pipiens* biotypes and *Cx. torrentium* was established [28]. Data retrieved from DNA sequences are largely used in molecular taxonomy e.g. for defining the genetic structure of vector species populations, for resolving phylogenetic relationships among and within groups of Culicidae [29–32], but also for the identification of species [33–35]. For molecular species identification, a fragment of the cytochrome c oxidase subunit I (cox1) mitochondrial gene has been used commonly for taxon barcoding and for assessing genetic divergence among closely related species [36,37]. This fragment was also used to analyse species complexes as well as to

compare phylogeographic patterns within closely related species (e.g. [38,39]). One problem regarding the cox1 DNA barcode is the ambiguous identification or the absence of clusters in trees of recently diverged species [40,41]. Therefore new algorithms have been developed for improvement of these subjects (e.g. [42,43]).

A former study about *Cx. pipiens* and *Cx. torrentium* within the Frankfurt/Rhine-Main Metropolitan Region showed a genetic variability within both species [44]. Based on these results, a nationwide survey was started to analyse the distribution of both species, as well as their sympatric occurrence. The aim of the current study was to analyse the population structure of *Cx. pipiens* and *Cx. torrentium* and to investigate whether there are differences in their genetic composition and patterns of distribution. Here, we present first-time population comparisons for both species in Germany.

Methods

Sampling

Culicidae from 25 different sampling sites in 22 German cities (see Table 1 and Figure 1) were collected from March until October 2012. Collection sites were in rural as well as in urban areas near human dwellings (specific information about the sampling sites are in Table 1). Adults were collected using BG-Sentinel traps (Biogents AG, Regensburg, Germany) with CO₂ and/or BG Lure as an attractant as well as EVS-traps with dry ice. Caught specimens were stored at –20°C. Larvae were collected from natural as well as artificial water pools using hand nets or ovitraps, fixed and preserved in 70% ethanol or kept alive to raise them to adults. For morphological identification (based on [3,45,46]) of larvae and adults (to genus level), a stereomicroscope was used. Names and addresses of persons who conducted the trapping as well as permission numbers (where permission was necessary) can be provided on request (see also Table S1). No endangered or protected species were involved in this study.

Molecular species identification

The DNA extraction was carried out with glass fiber plates (Pall GmbH, Dreieich) following a former described protocol [47]. The cytochrome c oxidase subunit I gene fragment (cox1) was amplified using the standard barcoding primers LCO 1490 (5' GGTCAACAATCATAAAGATATTGG 3') and HCO 2198 (5' TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA 3') [48]. PCR reaction mixture contained 10 pmol of each primer, 0.2 nM of each dNTP, PCR buffer, BSA, MgCl₂, 1U *Taq* polymerase (TrueStart Hot Start, Fermentas) as well as varying concentrations of DNA and Millipore water, in a total volume of 30 µl. The cycle parameters were the following: 1 cycle of initial denaturation at 94°C, 60 s; 6 cycles of 94°C, 40 s; 45°C, 40 s; 72°C, 60 s; 36 cycles of 94°C, 40 s; 51°C, 40 s; 72°C, 60 s and for terminal extension 1 cycle 72°C, 5 min; with a final ramping to 8°C. The yield and quality of DNA was analysed with SYBR-Green (Life Technologies GmbH) staining and agarose gel-electrophoresis. Sequencing and sequence analysis were carried out as previously described [44]. The obtained sequences were deposited in GenBank under accession numbers HF562483-HF562835 and HG793395-HG793655.

Phylogenetic and Phylogeographic analyses

To infer the population structure of *Cx. pipiens* and *Cx. torrentium* and to analyse the processes that might have shaped the present day distribution, we used the cox1 barcoding fragment, which can distinguish between both species. The McDonald & Kreitman Test was calculated to show neutral evolution or

Table 1. Coordinates and abbreviations of the 25 analysed sampling localities.

Locality	Coordinates (decimal degrees)				Coordinates (decimal degrees)				
	habitat	latitude	longitude	Locality	habitat	latitude	longitude	GR	
Bad Lippspringe	BL	house and garden	51.790131	8.829283	Gründau-Rothenbergen	forest near to the stream Kinzig	50.185181	9.092017	
Bad Vilbel	BV	water butt	50.182336	8.739481	Heldenbergen	trees near to open grassland	50.245517	8.883197	AS 3
Berlin-Marienfelde	MF	open space near to trees and ponds	52.398391	13.3658	Höchst a.d. Nidder	trees near to open grassland	50.266197	8.935378	AS 1
Bielefeld	BI	Open space near to ponds	52.043738	8.479485	Husum	golf court	54.487004	9.095349	HU
Dresden	DK	Forest, heathland	51.128926	13.792856	Klein Linden	backyard	50.556379	8.637328	KL
Duisburg	DB	backyard	51.472747	6.773101	Langenlehsten	backyard	53.5	10.733333	LL
Eberswalde	EW	backyard	53.893335	11.45868	Lebus	trees near to parking spot	52.403069	14.529469	LE
Eichen	AS 2	trees near to the stream Nidder	50.254558	8.906103	Mönchengladbach	water butt	51.148595	6.450997	MG
Frankfurt-Bockenheim	KS	tub with hay water in backyard	50.116232	8.64006	Müncheberg	forest, wetland	52.516691	14.104214	MÜ
Frankfurt-Bornheim	FB	cemetery with coniferous trees	50.138216	8.704802	Rietschen	backyard	51.396427	14.786003	RI
Frankfurt-Ostend	FZ	within trees near to a pond	50.116254	8.701958	Stralsund	water butt backyard	54.325172	13.081279	ST
Frankfurt-Sachsenhausen	FS	city forest	50.072015	8.680401	Wismar	backyard	53.893335	11.45868	WI
Fuldatal	FT	backyard	51.383333	9.55					

doi:10.1371/journal.pone.0102158.t001

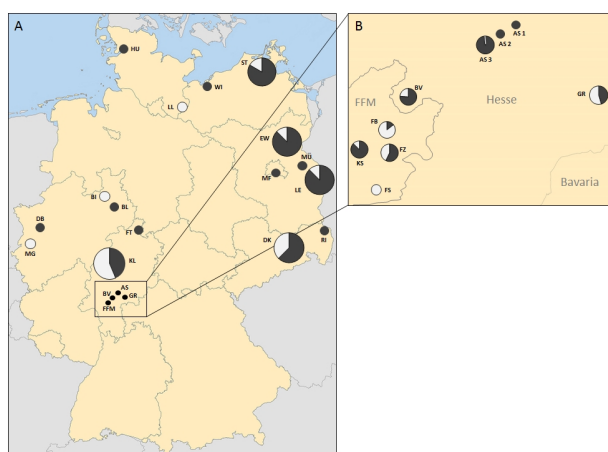


Figure 1. Distribution of *Culex torrentium* (white) and *Culex pipiens* (grey) in Germany (A) and the Hessian Rhine-Main area (B). Small circles in Figure 1A (excluding the circles for FFM, BV, AS and GR) indicate that only one of the two species was detected at this specific locality. Pie charts indicate the ratio of the two detected species at this locality. The sizes of the pie chart and the circles do not relate to the number of investigated individuals (see Table 1). A: Overview of the sampling localities across Germany. Abbreviations: AS = Altenstadt, BV = Bad Vilbel, MF = Berlin-Marienfelde, BI = Bielefeld, BL = Bad Lipp-springe, DB = Duisburg, DK = Dresden-Klotzsche, EW = Eberswalde, FFM = Frankfurt/Main (four different localities: Bornheim (FB), Bockenheim (KS), Sachsenhausen (FS) and Ostend (FZ)), FT = Fuldata, GR = Gründau-Rothenbergen, HU = Husum, KL = Klein Linden, LE = Lebus, LL = Langenlehsten, MG = Mönchengladbach, MÜ = Müncheberg, RI = Rietschen, ST = Stralsund and WI = Wismar. B: Detailed view of the Rhine-Main area with Höchst a.d.N. (A1), Eichen (AS2), Heldenbergen (AS3), Klein Linden. Map was created with ArcMap 10.1. doi:10.1371/journal.pone.0102158.g001

selection among the analysed mitochondrial DNA. In addition we used Tajima's D to test recent demographic or range expansion. We also calculated pairwise F_{ST} 's to show differences between haplotype compositions of sampling points and analysed the molecular variances as well as genetic distances and genetic variability depending on geographical origin. All analyses were performed with aligned *cox1* sequences with a length of 658 bp where no frame shifts or stop codons were found. The genealogical relationship between haplotypes of *Cx. pipiens* and *Cx. torrentium* was analysed by reconstructing phylogenetic networks for each species. We used the method of statistical parsimony as described by Templeton et al. [49], implemented in the software TCS 1.21 [50].

For population analyses, models of sequence evolution for the population genetic analysis were chosen according to MODEL-TEST [51] as implemented in MEGA5 [52] and based on Akaike information criterion (AIC). Based on the AIC, the Tamura-3-parameter Model [53] as the best fitting model was used for all analysis. Furthermore, we used this model to calculate genetic distances within and between both species using MEGA5. To further analyse whether the genetic distance, increased with higher geographic distance we used the distance based redundancy analysis (dbDRA) [54], as implemented in DISTLM (distance based multivariate analysis for a linear model) [55,56]. Using this analysis we could test for signs of isolation by distance (IBD, [57]) in the dataset as implemented in DISTLM. Analyses of molecular variances (AMOVA, [58]) were carried out using Arlequin 3.5.1.2 [59] based on the distance method of Tamura and Nei [60], where data were analysed in a hierarchical manner to estimate variance

components at the different spatial scales. The level of genetic differentiation was measured by F_{CT} , F_{SC} , and F_{ST} , which refer to distance among groups, among populations within groups and within populations (group specification see Table 2). For calculations of pairwise F_{ST} 's as well as AMOVA analyses, we omitted all populations with less than 5 individuals and grouped the sampling points in Frankfurt to Frankfurt-all (FFM). We tested whether the *cox1* sequences evolved neutrally with the McDonald & Kreitman [61] test as implemented in DnaSP version 5.10.01 [62]. We used individuals of *Cx. modestus* as outgroup taxa. We also analysed Tajima's D [63] and calculated population pairwise F_{ST} 's, to determine significance by permuting genotypes among populations (1023 permutations), using Arlequin 3.5.1.2. Additionally we tested whether there was a recent range expansion, a bottleneck or a selective sweep within the two species and their populations [57,64–65]. The significances were generated using the implemented permutation test in Arlequin 3.5.1.2.

Results

Sequence analyses

In total, 597 individuals of *Cx. pipiens* (399 = 250 adults, 120 larvae and 29 pupae) and *Cx. torrentium* (198 = 88 adults, 83 larvae and 27 pupae) from 25 different localities within Germany were sequenced and compared with sequences deposited in the GenBank using the BLAST algorithm [66]. In total *Cx. pipiens* was much more abundant than *Cx. torrentium* and could be detected at 21 out of 25 sampling sites (Figure 1). At ten sites it was the only occurring *Culex* species whereas at 11 sampling sites it co-occurred with *Cx. torrentium*. In contrast *Cx. torrentium* was only detected at 15 out of 25 sampling sites; at four sites it was the only *Culex* species found. In order to identify mutations in the *cox1* gene fragment within and between species, the most frequent sequence of each species (*Cx. torrentium* 42.4%, *Cx. pipiens* 90.5%) was used as the reference (H1) for other haplotypes. For *Cx. torrentium* only one to three different haplotypes were observed in 12 out of 15 localities (Table 3) whereas in Klein Linden (n = 11), Langenlehsten (n = 9) and Dresden (n = 8) a higher haplotype diversity was detected. For *Cx. pipiens* the highest haplotype diversity was observed in Heldenbergen and Dresden (both n = 6). A haplotype diversity with more than three different haplotypes at a sampling site was identified in Berlin, Lebus, Rietschen and Stralsund.

Haplotype network reconstruction of *Culex pipiens*

The statistical parsimony network calculated with TCS using 399 *cox1* sequences of *Cx. pipiens* resulted in one single network with 24 different haplotypes and no subnetworks. The highest outgroup probability within the network was calculated for H1 which was the most frequent (n = 361 individuals) and observed at all sampling sites (Figure 2). One part of the network had a rather star like structure. This was a result of 10 different haplotypes being directly derived from haplotype H1 and differing only by one mutation from the ancestral one (H2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 13, 14 and 15). Further connections within the network started from haplotypes H2 and H9. One haplotype (H19), which is only represented by one individual from Berlin-Marienfelde, seems to be the initial point for a more branched part of the network consisting of eleven different haplotypes. Nearly all individuals that carry one of these 11 haplotypes originate in the eastern parts of Germany, with the exception of haplotypes H7, H8 and H15. Haplotype seven is shared between Bad Vilbel and Berlin, haplotype eight is shared between Duisburg and Berlin, whereas H15 was exclusively found in Frankfurt-Bockenheim. Additionally,

Table 2. AMOVA group structure of *Culex pipiens* and *Culex torrentium*.

<i>Culex pipiens</i>		<i>Culex torrentium</i>	
Group No.	Locality	Group No.	Locality
Group 1	Eichen	Group 1	Bad Vilbel
	Höchst		Klein Linden
	Bad Lippspringe		Frankfurt
	Bad Vilbel	Group 2	Dresden
	Gründau		Stralsund
	Klein Linden		Langenlehsten
	Frankfurt	Group 3	Mönchengladbach
	Heldenbergen	Group 4	Gründau
Group 2	Dresden		
	Eberswalde		
	Lebus		
	Berlin-Marienflede		
	Rietschen		
	Stralsund		
	Wismar		

Group structures are based on pairwise F_{ST} 's of *Culex pipiens* and *Culex torrentium*.
doi:10.1371/journal.pone.0102158.t002

this part of the network is also characterized by several missing hypothetical intermediate haplotypes. In general the network structure is characterized by a dominant haplotype H1 and a star like structure. In the eastern parts of Germany there seems to be much more genetic variability and structure within *Cx. pipiens*.

Haplotype network reconstruction of *Culex torrentium*

The statistical parsimony network calculated with TCS using 198 *cox1* sequences of *Cx. torrentium* resulted in one single network and no subnetworks. Even with fewer individuals (198) the dataset was partitioned into 27 haplotypes which implies a higher genetic variability within *Cx. torrentium* compared to *Cx. pipiens*. The structure of the network was not dominated by one single haplotype. In general the pattern was also rather star like with rare haplotypes ($n = 10$) that are directly derived from the most frequent one (H3, Figure 2). The haplotype network of *Cx. torrentium* shows a higher connectivity than the network of *Cx. pipiens*; nearly every haplotype is more or less directly linked to the next sampled haplotype (they differ only by one mutation from one another) and only five hypothetical haplotypes are missing. Haplotype three was found 82 times and was present at eight different localities across Germany. Furthermore this haplotype is linked to the second most frequent haplotype (H5) via H24 which differed only by one mutation from both. In contrast to the haplotype network of *Cx. pipiens*, the most frequent haplotype was not the ancestral one. In *Cx. torrentium* the most probable ancestral haplotype (H1) is represented by five individuals and was found only at four different localities (Frankfurt-Ostend, Bad Vilbel, Dresden and Stralsund). It also differed only by one mutation from the two most frequent haplotypes (H3 and H5) and was directly linked to both. Besides the most frequent haplotype H3, additional haplotypes occurred at high frequencies (H5: 41 individuals, H2: 16 individuals and H26: 14 individuals). The second most frequent haplotype, H5, occurred at four different localities and was mainly found in Mönchengladbach. Furthermore this haplotype occurred in central Germany (Frankfurt) and

eastern Germany (Dresden). Additionally some of the more frequent haplotypes were exclusively found at single localities like H26, which only occurred at Mönchengladbach. The haplotypes H3 and H5 were much more frequent at central and western localities (H3: 61 individuals and H5: 39 individuals) than in the eastern parts of Germany (H3: 13 individuals, H5: 2 individuals). Furthermore, haplotype H8 followed a similar geographical pattern to haplotypes H3 and H5 (distributed in central, eastern and northern Germany).

Population structure

Using the Tamura-3-parameter model, the analysis of genetic distances between both species resulted in a mean within group distance of 0.01% in *Cx. pipiens* and 0.03% in *Cx. torrentium*. The mean genetic distance between both species was 3%. The genetic differentiation based on population pairwise F_{ST} is shown in Tables 4 and 5. In addition the significant F_{ST} values are indicated in Figures 3 and 4, which also show the haplotype frequencies at the different sampling localities. In Figures 3 and 4 we also color coded the F_{ST} values into 4 categories [67]. These four categories were 1. very great population differentiation (red lines), 2. great population differentiation (yellow lines), 3. moderate population differentiation (green lines) and 4. low population differentiation (purple lines). In total 14 population comparisons of *Cx. torrentium* and *Cx. pipiens* showed significantly different pairwise F_{ST} values. Generally more populations were very greatly significantly differentiated in *Cx. torrentium* ($n = 11$, Figure 4) (according to the categories of Balloux and Lugon-Moulin [67]) than in *Cx. pipiens* ($n = 5$, Figure 3) but within *Cx. pipiens* a geographic pattern seemed to be more obvious. Central and eastern populations of *Cx. pipiens* were significantly differentiated and showed a moderate population differentiation, while in *Cx. torrentium* the degree of differentiation was higher and not only between central and eastern parts of Germany. Within *Cx. torrentium* the westernmost population (Mönchengladbach) was highly differentiated from all other populations except for

Table 3. Sampling localities in Germany with abbreviations and number of sequences and detected haplotypes at each locality.

Locality	<i>Culex pipiens</i>		<i>Culex torrentium</i>		<i>Culex pipiens</i>		<i>Culex torrentium</i>	
	sequences	haplotypes	sequences	haplotypes	sequences	haplotypes	sequences	haplotypes
Bad Lippspringe	BL 5	1 (1)	-	-	GR 5	1 (1)	6	3 (11;12;13)
Bad Vilbel	BV 45	2 (1;7)	14	2 (1;3)	AS 3 66	6 (1;2;3;4;5;6)	1	1 (4)
Berlin-Marienfelde	MF 17	4 (1;8;19;20)	-	-	AS 1 5	1 (1)	-	-
Bielefeld	BI -	-	2	1 (2)	HU 1	1 (1)	-	-
Dresden	DK 35	6 (1;2;9;10;11;12)	21	8 (1;2;3;5;6;7;8;9)	KL 45	2 (1;2)	58	11 (2;3;8;11;19;20;21;22;23;24;25)
Duisburg	DB 3	2 (1;8)	-	-	LL -	-	18	9 (2;3;7;8;14;15;16;17;18)
Eberswalde	EW 7	2 (1;13)	1	1 (7)	LE 7	4 (1;16;17;18)	1	1 (3)
Eichen	AS 2 39	1 (1)	-	-	MG -	-	50	3 (5;26;27)
Frankfurt-Bockenheim	KS 55	3 (1;14;15)	8	1 (3)	MÜ 4	1 (1)	-	-
Frankfurt-Bornheim	FB 1	1 (1)	6	2 (3;5)	RI 22	4 (1;2;1;22)	-	-
Frankfurt-Ostend	FZ 4	1 (1)	3	3 (1;5;10)	ST 25	4 (1;21;23;24)	5	3 (1;3;7)
Frankfurt-Sachsenhausen	FS -	-	4	2 (2;8)	WI 6	2 (1;7)	-	-
Fuldatal	FT 2	1 (1)	-	-	-	-	-	-

doi:10.1371/journal.pone.0102158.t003

Frankfurt-all with a moderate differentiation. Furthermore, significant genetic differentiation was detected in geographically much closer *Cx. torrentium* populations in Hesse (Figure 4 and Table 4).

The calculated AMOVA revealed that most of the genetic variability within *Cx. pipiens* was significantly explained by genotypic variation within populations (88.38%, Table 6). The grouping of the populations originating in western or eastern Germany additional explained a lower but significant part of the genetic variation (8.39%, Table 6). Only 3.32% of the genetic variation was explained by genotypic variation among populations within groups (see Table 6). The AMOVA for *Cx. torrentium* also revealed that the biggest part of the genetic variation was significantly explained by genotypic variation within populations (66.54%, Table 6), but in addition a higher degree of the genetic variation was explained by the variation among groups (32.42%, Table 6). The higher degree of differentiation within *Cx. torrentium* was also supported by the overall index of population differentiation (F_{ST}) derived from the AMOVA calculations where the F_{ST} value of *Cx. torrentium* (0.33) is much higher than the F_{ST} value within *Cx. pipiens* (0.11).

As there were indications of genetic differentiation between populations from central and eastern Germany within *Cx. pipiens* and also some indications for strong genetic differentiation between populations from the western parts of Germany and central and east-German populations of *Cx. torrentium* (see above), we tested for isolation by distance using distance based redundancy analysis (dbRDA). However, only a very low proportion of the genetic variation could be significantly explained by geographical distance; the spatial coordinates only explained 2% of the genetic variability in *Cx. pipiens* and 5% of the genetic variation within *Cx. torrentium*. The ratio of non-synonymous to synonymous polymorphisms within *Cx. pipiens/Cx. torrentium* and within the outgroup was not significantly different from the ratio of non-synonymous to synonymous polymorphisms fixed between these groups (Fisher's exact test $P = 0.337/0.380$). Thus, the McDonald-Kreitman test is consistent with neutral evolution of the *cox1* gene and there were no indications that there is selection acting on the studied mitochondrial gene fragment. To reveal signs of population expansion, signs of bottleneck within the population or sudden contractions, we used Tajima's D for which the level of significance was assessed using the permutation test implemented in Arlequin. The overall Tajima's D for *Cx. pipiens* was negative (-0.75 ± 0.73) but non-significant ($p > 0.05$). For *Cx. torrentium* the overall mean Tajima's D was only slightly negative (-0.13 ± 1.03) and also non-significant ($p > 0.05$). All calculations for *Cx. torrentium* populations resulted in non-significant Tajima's D which was either strongly positive or negative. In contrast several populations of *Cx. pipiens* showed a strongly negative Tajima's D (Heldenbergen: -1.77 ; Bad Vilbel: -2.18 and Frankfurt-Bockenheim: -1.45 ; all p -values > 0.05). These highly negative Tajima's D might indicate a recent demographic or range expansions within species [64,65] either after a bottleneck (e.g. [63]) or a selective sweep [57].

Discussion

Information about the genetic variability of *Cx. torrentium* and *Cx. pipiens* is of particular interest as both species are ornithophilic and potential enzootic vectors for certain arboviruses [68]. In total 597 individuals of both species from 25 localities in Germany were analysed to reveal distribution patterns of these two sibling species in Germany. *Culex pipiens* could be detected at 21 out of 25 sampling sites whereas *Cx. torrentium* was only found at 15 out of

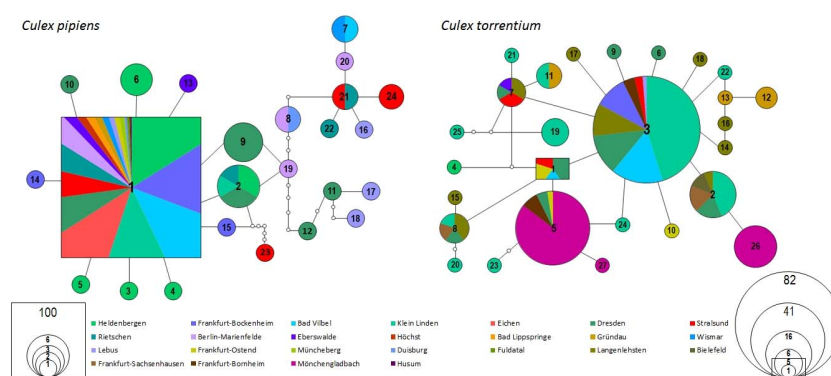


Figure 2. Haplotype networks of *Culex pipiens* and *Culex torrentium* for the *cox1* gene segment calculated using statistical parsimony as implemented in TCS 1.21. The squares stand for the most probable ancestral haplotypes, the circle for all other haplotypes. The Numbers are equal to the haplotypes of each species. Each line represents a single mutation while small white dots symbolize hypothetical missing haplotypes. The size of the circles and the square is proportional to the number of the occurring haplotypes. The number of individuals can be derived from the scale which is given in the figure. Different colors represent the different geographical sampling localities. The colored area is proportional to the occurrence at the respective site.
doi:10.1371/journal.pone.0102158.g002

25 sampling localities. One explanation for the dominance of *Cx. pipiens* at several localities could be the different developmental rates of both species which can lead to approximately one generation less per year in *Cx. torrentium* [3,69]. Another factor that might have impacted the results is temperature. The development of *Cx. pipiens* was described to take place between temperature ranges of 8–30°C [3], but in Sweden the species could only be found in areas with a mean temperature of 11.9°C from May to August 1950–2000. In the latter study *Cx. torrentium* was found in areas with a mean temperature of 10.5°C for May to August 1950–2000 [22]. Taking the influence of temperature into account, the species composition at different sites can vary within and between the years, depending on the actual but also the mean temperature. In our survey *Cx. torrentium* was often found in artificial water bodies. Although this has been described previously [12], it contradicts the common conception that *Cx. torrentium* utilizes more natural larval habitats than *Cx. pipiens* [45]. Furthermore, larvae of *Cx. pipiens* as well as of *Cx. torrentium* were found, often sympatrically, in various kinds of habitats. Therefore, it seems unlikely that habitat constitutes an important factor for species composition at the localities, as both species were equally observed in different habitats.

The genetic analyses of populations of *Cx. torrentium* and *Cx. pipiens* provide insights into the genetic structure of these potential disease vectors in Germany. While *Cx. pipiens* with its bioforms *Cx. pipiens pipiens* and *Cx. pipiens form molestus* belongs to the worldwide distributed *Cx. pipiens* complex, *Cx. torrentium* is characterized as a sibling species [28]. All of these species are known to be important vectors for various arboviruses and exhibit various behavioral differences [14] (e.g. the host preference), which are important with regard to their particular vector-competence. Due to the limited knowledge about the genetic structure of these species, it is unknown whether these behavioral modifications result from genetic variation or genetic polymorphism. In this context hybrids between ornithophilic and anthropophilic species are of particular interest, as they could serve as important bridge vectors for diseases like West Nile fever. In Germany such a hybrid was described just recently for the first time [28].

To avoid generalizations about species' vector biology, more knowledge about their spatial genetic composition is crucial as different populations could vary with regard to their vectorial abilities. Different species or even populations may also hybridize

with each other, which could result in varying biting behavior concerning the host preference. Therefore, population genetic studies are essential for evaluation of the respective roles members of the *Cx. pipiens* complex and *Cx. torrentium* play in enzootic and/or epidemic transmission of arboviruses in Europe. A clear identification of *Cx. pipiens form pipiens*, *Cx. pipiens form molestus* and *Cx. torrentium* is essential but due to the difficulties in morphological identification, molecular methods are necessary to distinguish these forms. Today, commonly used techniques are the amplification of the *cox1* gene fragment followed by restriction enzyme digestion of the amplicons [12,70] or single-nucleotide polymorphism (SNP) analysis [71], as well as the second intron of the acetylcholinesterase- (*ACE-2*) or ITS-sequences of rDNA-based PCR assays and different allozyme markers [15,72,73]. *Culex pipiens* and *Cx. torrentium* are treated in many studies just as bundles of “*Cx. pipiens/torrentium*” and have not been separated, leading to the point that not many population structure analyses of these species have been performed in the past for Europe [16]. In contrast to a study on species in the Frankfurt/Rhine-Main Metropolitan Region, where *Cx. torrentium* showed a higher genetic diversity than *Cx. pipiens* [44], the recent study provides a similar high amount of variation for both species with 27 and 24 haplotypes, respectively. It is striking to note, that in total more haplotypes could be identified from *Cx. torrentium*, but some haplotypes of *Cx. pipiens* provide more substitutions within the analysed fragment. The much lower genetic differentiation of *Cx. pipiens* populations is most likely due to the observed dominant and widespread haplotype H1 which occurred at every sampling locality. The structure of the network with one dominant haplotype and many rare haplotypes (see Figure 2) in combination with some populations showing a significant highly negative Tajima's D, might suggest a population-wide demographic [74] or a recent range expansion [64,65]. The population structure of *Cx. pipiens* might also be explained by other reasons such as a recent bottleneck (e.g. [63]) or a selective sweep [57]. Both of these events could be the result of genetic drift with in certain populations and could lead, as seen in the case of *Cx. pipiens*, to a reduced overall genetic variability. The highest genetic variability was explained by variation within populations (see Table 6) whereas isolation by distance was not the main reason for the genetic variability (as only 2% of the genetic variability was explained by spatial variables). Thus, the populations themselves are variable but there were no

Table 4. Population pairwise F_{ST} from *Culex pipiens* calculated with Arlequin 3.5.1.2.

Locality	AS 2	AS 1	BL	BV	GR	KL	FFM	AS 3	DK	EW	AS 3	MF	RI	ST	WI
AS 2	*														
AS 1	0.00000	*													
BL	0.00000	0.00000	*												
BV	-0.00323	-0.10987	-0.10987	*											
GR	0.00000	0.00000	0.00000	-0.10987	*										
KL	-0.00323	-0.10987	-0.10987	-0.00561	-0.10987	*									
FFM	-0.00751	-0.11041	-0.11041	0.00413	-0.11041	-0.00104	*								
AS 3	0.00376	-0.10057	-0.10057	0.00298	-0.10057	-0.00121	0.01082	*							
DK	0.07564	-0.06021	-0.06021	0.04654	-0.06021	0.07288	0.09651	0.07461	*						
EW	0.30534	-0.05528	-0.05528	-0.00563	-0.05528	0.16821	0.13919	0.01971	-0.00796	*					
LE	0.48905	0.06126	0.06126	0.42131	0.06126	0.50400	0.56717	0.51701	0.18985	0.11914	*				
MF	0.16537	-0.04209	-0.04209	0.07339	-0.04209	0.15784	0.19920	0.14019	0.00451	0.00866	0.12141	*			
RI	0.09749	-0.06598	-0.06598	0.03721	-0.06598	0.09313	0.12442	0.08929	0.01750	-0.01435	0.15050	-0.04295	*		
ST	0.10595	-0.05447	-0.05447	0.06418	-0.05447	0.10750	0.13726	0.11439	0.02827	-0.00910	0.10373	-0.03521	-0.03148	*	
WI	0.38291	-0.03448	-0.03448	0.15811	-0.03448	0.36754	0.41563	0.28445	0.02338	0.02173	-0.00011	-0.08272	-0.06711	-0.07826	*

Data based on the analyses of 389 sequences of the *cox1* gene segment from 17 different sampling localities in Germany (FFM = Frankfurt/Main with KS, FB and FZ). Sample size are shown in Table 1, abbreviations of each locality are shown in Table 1 and 3. Significant different F_{ST} values are shown in bold. For calculation only populations with 5 or more individuals were used.
doi:10.1371/journal.pone.0102158.t004

Table 5. Population pairwise F_{ST} from *Culex torrentium* calculated with Arlequin 3.5.1.2.

Locality	BV	FFM	GR	KL	MG	DK	ST	LL
BV	*							
FFM	0.07117	*						
GR	0.59328	0.47067	*					
KL	0.00030	0.05859	0.48753	*				
MG	0.43031	0.25075	0.57234	0.42635	*			
DK	0.02390	-0.03154	0.45560	0.01940	0.30419	*		
ST	0.27364	0.06676	0.32258	0.01877	0.36069	0.01428	*	
LL	0.01701	0.02913	0.36024	0.02495	0.36577	-0.00098	-0.03260	*

Data based on the analyses of 193 sequences of the *cox1* gene segment from 10 different sampling localities in Germany (FFM = Frankfurt/Main with KS, FB and FZ). Sample size are shown in Table 1, abbreviations of each locality are shown in Table 1 and 3. Significant different F_{ST} values are shown in bold. For calculation only populations with 5 or more individuals were used.
doi:10.1371/journal.pone.0102158.t005

clear differences between populations according to the haplotype distribution across Germany (Figure 3).

It is also obvious that there is a moderate differentiation between western and eastern populations of *Cx. pipiens* in Germany (Figure 3 and Table 3). The reason for this might be that *Cx. pipiens* occurs in two bioforms (*Cx. pipiens* form *pipiens* and *Cx. pipiens* form *molestus*) and that these bioforms differ in their relative abundance in different parts of Germany. Former studies [28] could not detect *Cx. pipiens* form *molestus* in the eastern part of Germany; nevertheless the appearance of this form cannot be excluded and could be an explanation for the observed higher haplotype diversity in eastern populations.

One main difference between the population structure of *Cx. pipiens* and *Cx. torrentium* is the much higher genetic differentiation between populations of *Cx. torrentium*; the overall F_{ST} value was 0.33 for *Cx. torrentium* compared to a three times lower F_{ST} value of *Cx. pipiens* ($F_{ST} = 0.11$). Furthermore the absence of one single dominant haplotype, the higher haplotype diversity, the stronger genetic differentiation between populations (see Figure 4) and the relative amount of genetic variability which is explained by the AMOVA among groups (see Table 6) reflects the different population structure. The high percentage of genetic variability which is explained by the defined groups in the AMOVA ($>30\%$) is mainly due to the strong differentiation of the most western population (Mönchengladbach) and one central population (Gründau-Rothenbergen) in comparison to the remaining populations. The population Mönchengladbach is represented by many individuals ($n = 50$) but there was only one haplotype that was shared between Mönchengladbach and two other sampling sites, which then led to a strong differentiation. As Gründau-Rothenbergen (GR) is only represented with five individuals the strong differentiation based on the categories by Balloux and Lugon-Moulin [67] and based on the AMOVA should be interpreted with caution. Additional sampling from this locality could lead to a detection of more widespread haplotypes and thus could lower the degree of differentiation. The observed population structure of *Cx. torrentium* might indicate lower dispersal capacities than in *Cx. pipiens* which leads to a reduced gene flow between populations and thus might explain the stronger differentiation. On the other hand, a more recent demographic or range expansion within *Cx. pipiens* could also explain the observed differences between both species. In addition, a higher amount of genetic variation is explained by the dbrDA analysis (2% within *Cx. pipiens*; 5% within *Cx. torrentium*). As the dbrDA is based on pairwise genetic distances between individuals and geographic coordinates, all individuals from every sampling site were included in this analysis.

Previous studies have shown that the mean dispersal range of *Culex* spp. is about 0.2–2.6 km, depending on various factors [75,76]. The dispersal depends on the habitat, being lower in residential than in rural areas [77]. Nevertheless, other authors estimate a mean dispersal range for *Cx. erraticus* of 0.967 km which is close to the mean range by mark-release-recapture experiments (0.73 km) [78]. This range characterizes *Cx. erraticus* as a stronger flyer than most other mosquito species that disperse only a few hundred meters. In our study, Frankfurt city center with many skyscrapers and very patchy distributed larval habitats seems to serve as a barrier between the localities FFM-Ostend (FZ), FFM-Bornheim (FB) and FFM-Bockenheim (KS). Between these localities and for FFM-Sachsenhausen (FS) the Main River serves as an additional geographic barrier which can limit both geographic as well as genetic expansion. Furthermore, the habitat of FFM-Sachsenhausen differs from the others sampling stations, as it is located in a rural, forested area. As stated by LaPointe [79]

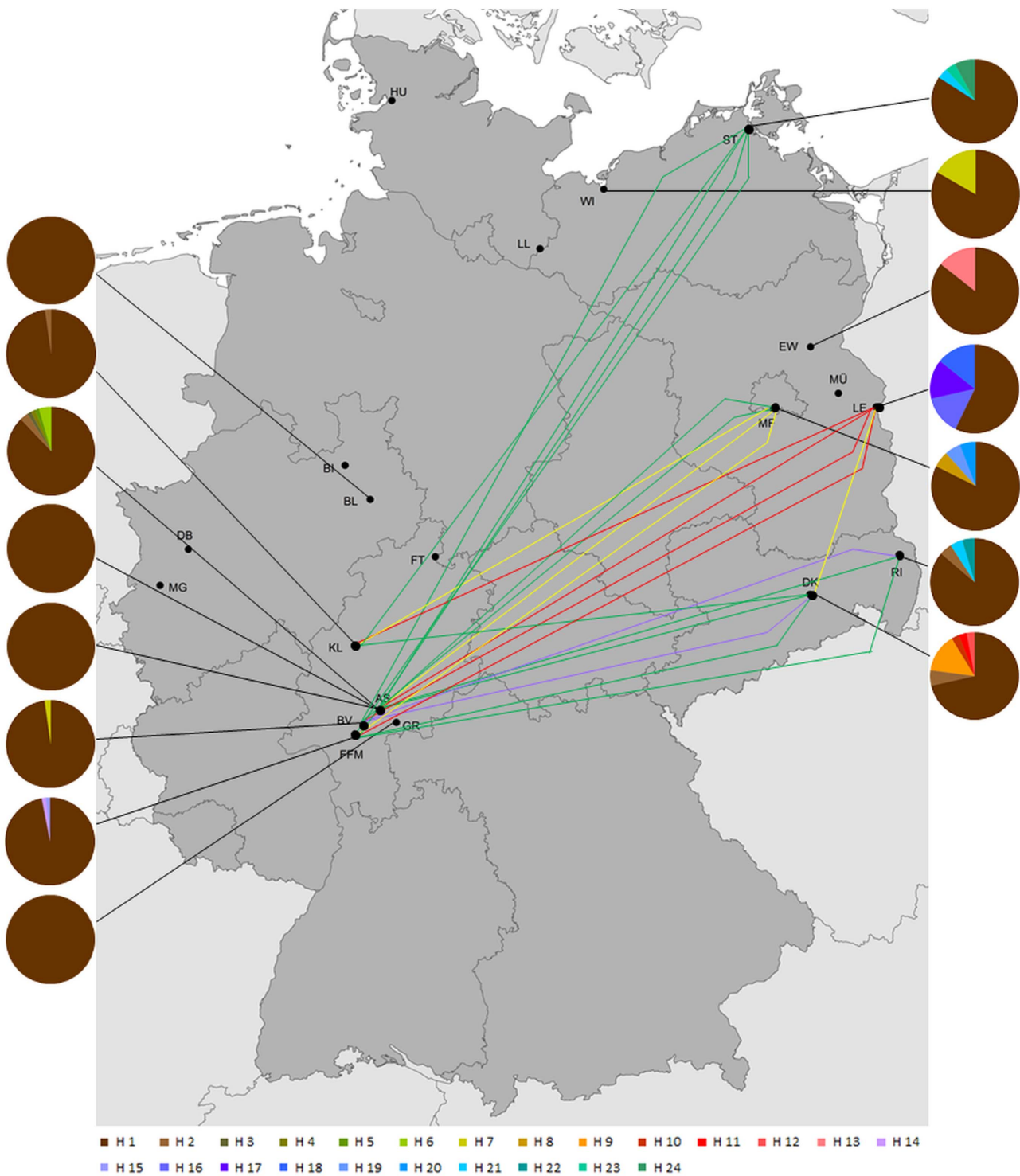


Figure 3. Sampling localities of *Culex pipiens* across Germany with significant different population pairwise F_{ST} values. Significant different pairwise F_{ST} values between populations are indicated using different line colors. Significant F_{ST} values were grouped into the four following categories: very great population differentiation (red lines), great population differentiation (yellow lines), moderate population differentiation (green lines) and low population differentiation (purple lines) [67]. Pictured are all sampling points listed in Table 4 with a summary of their haplotypes. Map was created with ArcMap 10.1.
doi:10.1371/journal.pone.0102158.g003

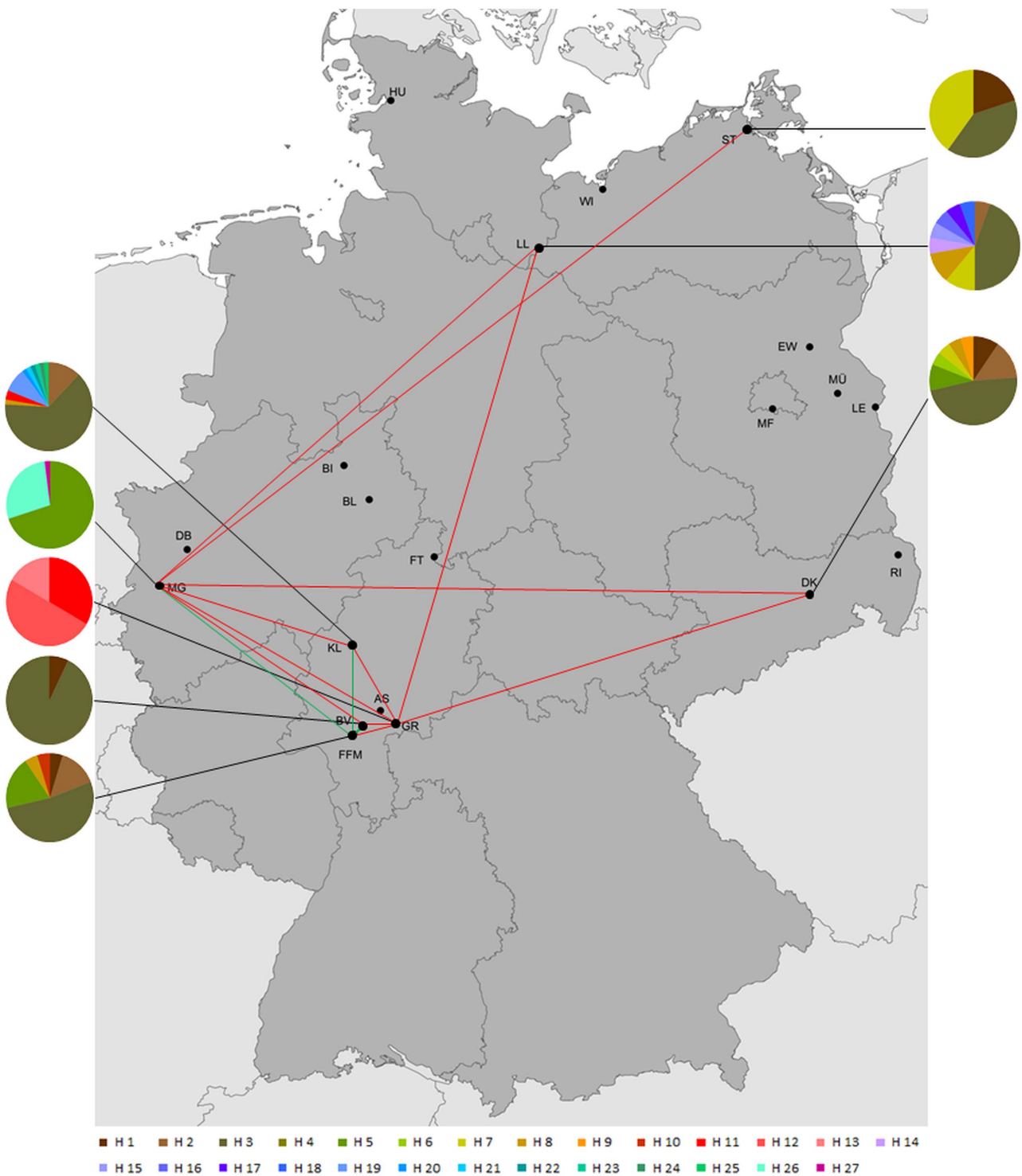


Figure 4. Sampling localities of *Culex torrentium* across Germany with significant different population pairwise F_{ST} values. Significant F_{ST} values were grouped into the four following categories: very great population differentiation (red lines), great population differentiation (yellow lines), moderate population differentiation (green lines) and low population differentiation (purple lines) [67]. Pictured are all sampling points listed in Table 5 with a summary of their haplotypes. There were no significant moderate or low F_{ST} values. Map was created with ArcMap 10.1. doi:10.1371/journal.pone.0102158.g004

in his study on *Cx. quinquefasciatus* undertaken in a forest, dispersal is the result of appetential flights, searching for hosts or oviposition sites. Here, both species were found in municipal and

in rural areas, respectively. Within the urban localities the highest numbers of specimens were found at places with a slight suburban character like gardens or patios. This indicates that *Cx. pipiens* as

Table 6. Results of the Analysis of molecular variance (AMOVA) and level of genetic differentiation of *Culex pipiens* and *Culex torrentium* measured by F_{CT} , F_{SC} and F_{ST} .

<i>Culex pipiens</i>		<i>Culex torrentium</i>										
Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	p-value	Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	p-value	
Among groups	1	5.492	0.02924	Va	8.39	Among groups	3	42.486	0.31775	Va	32.42	p<0.05
Among populations within groups	13	7.556	0.01126	Vb	3.32	Among populations within groups	4	3.383	0.01019	Vb	1.04	n.s.
within populations	374	115.204	0.30803	Vc	88.38	within populations	185	120.650	0.65216	Vc	66.54	p<0.05
Total	388	128.252	0.34853			Total	192	166.519	0.98010			

All Data were calculated in Arlequin 3.5.1.2 [59] based on the distance method of Tamura and Nei [60].
doi:10.1371/journal.pone.0102158.t006

well as *Cx. torrentium* both have adapted to a life in human neighborhoods. Suitable conditions for reproduction are met in these environments; artificial containers serve as egg deposits for both species (own observation) and hosts for blood meals are frequent, i.e. humans and synanthropic birds e.g. sparrows, pigeons and blackbirds. Therefore long appentential flights are not necessary in these areas, which might explain the differentiation between the *Cx. torrentium* populations within Frankfurt. Furthermore, the population structure of *Cx. pipiens* and the lower genetic differentiation than in *Cx. torrentium* might be due to the infection with different strains of *Wolbachia* symbionts. Not all populations are compatible with each other. Crossings of males from a southern German population with females from the North result in fertile descendants whereas reciprocal crosses, on the other hand, result in fertile clutches but no hatchings, indicating a reproduction barrier [80] as the result of cytoplasmic incompatibilities (CI) due to infection by *Wolbachia* symbionts. Additionally, several factors such as the *Wolbachia* strain, amount of infection, host species, temperature and rearing density influence the CI intensity [81–84]. In populations with infected and uninfected mosquitoes, *Wolbachia*-free females are at a reproductive disadvantage when they copulate with infected males; the spread and fixation of *Wolbachia* infections is facilitated [85] and leads to an increase in the frequency of *Wolbachia* with each generation. As such an infection can sweep through the population leading to reduced mitochondrial diversity [86]. This can explain why this species shows one dominant haplotype throughout all populations. Although 23 other haplotypes have been detected, most of these were very scarce and displayed only by one or two specimens. It would be interesting, however, to investigate, whether specimens that show the highest percentage of various haplotypes (localities Dresden and Lebus and to a lesser degree Heldenbergen), exhibit different *Wolbachia* strains resulting in CI or a higher degree of uninfected specimens. Two problems which could lead to misinterpretation of the results are pseudogenes and maternally inherited symbionts, like *Wolbachia*. While the situation for *Cx. pipiens* has been discussed already, the situation for *Cx. torrentium* is different, as pseudogenes can be excluded because of the previous testing of the dataset. No *Wolbachia* infections have been found so far in *Cx. torrentium* [87]. If *Wolbachia* infections occur in German populations of *Cx. torrentium*, it could mean that there are no reproductive barriers resulting from CI and no mitochondrial sweep through populations, which explains the heterogeneity of most of the analysed populations.

Conclusion

As shown here, *Cx. pipiens* and *Cx. torrentium* are synanthropic and share similar ecological habitats, which in some cases contradict the common conception. One example of this is the larval habitat. *Culex torrentium* was thought to utilize more natural breeding sites, whereas in this study larvae of both species were often found sympatric in artificial water bodies. However, different factors underlie the mitochondrial differentiation in both species. Some studies argued that feral and synanthropic forms seem to be sufficient for gene flow to diminish drift in *Cx. pipiens* [88]. The relatively low differentiation between most populations observed here might be explained by a sweep, resulting from insecticide resistance after eradication programs. Furthermore, a low differentiation can be induced by endosymbionts such as *Wolbachia* or insecticide-resistance due to previous eradication events. Another aspect leading to decreased genetic differentiation may be the dispersal between nearly located populations or mixing by human introduction. In the case of *Cx. torrentium* these

mechanisms seem to act in the opposite direction: dispersal as well as human introduction influences the mitochondrial diversity of populations. In previous works, *Wolbachia* could not be detected in *Cx. torrentium* [87]. Therefore, a sweep as in *Cx. pipiens* has not occurred and the mitochondrial diversity of populations could remain constant or even increase.

Nevertheless, the species show a big natural diversification. The very strong differentiation between populations indicates a splitting within *Cx. torrentium* with a higher haplotype diversity as well as the absence of one dominant haplotype which was only found for *Cx. pipiens*. Different species can vary in their insecticide resistance, ecological habits and vector competence. However, whether cryptic species are involved, or *Cx. torrentium* might be a variable species should be the focus of future studies. Hybrids between the two bioforms *pipiens* and *molestus* and between *molestus* and *torrentium* are of particular interest, as these represent potentially important bridge vectors for different zoonotic arboviruses possibly having a major impact in the risk assessments for arboviruses in Germany. It has to be noted that due to possible insecticide-resistance or *Wolbachia*-induced sweeps in populations, mitochondrial markers are not, or just in a limited way, useful for analyses of such infected populations. On the other hand, mitochondrial markers are generally producing reliable results for species without mitochondrial population-sweeps. Another explanation for the low haplotype diversity can be the result of insecticide-induced sweeps after eradication programs,

when only a small percentage of the original population remains. Apart from the aforementioned remaining questions, future studies should focus on dispersal for both species in different areas as different dispersal capabilities can result in varying differentiation and possibly even in distinct vector competences for different populations.

Supporting Information

Table S1 Names and contact details of all private persons can and will be given on request.
(DOCX)

Acknowledgments

We thank Stefanie Becker (BNITM) and Andreas Krüger (Military Hospital Hamburg) for providing the samples from Langenlehsten as well as the German mosquito control association (KABS e.V.), especially Achim Kaiser, Artur Jöst and Norbert Becker.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CM SK. Performed the experiments: AW SB. Analyzed the data: JS. Contributed reagents/materials/analysis tools: SK. Contributed to the writing of the manuscript: CM JS AW AD SK.

References

- Dreyer G, Noroës J, Figueredo-Silva J, Piessens W (2000) Pathogenesis of lymphatic disease in Bancroftian Filariasis: A clinical perspective. *Parasitol* 16: 544–548.
- Avšič-Zupanc T (2013) Mosquito-borne diseases – a new threat to Europe? *Clin Microbiol Infect* 19: 683–684.
- Becker N, Petric D, Zgomba M, Boase C, Madon M, et al. (2010) Mosquitoes and their control. Heidelberg: Springer. 577p.
- Straetemans M, on behalf of the ECDC consultation group on vector-related risk for Chikungunya virus transmission in Europe (2008) Vector-related risk mapping of the introduction and establishment of *Aedes albopictus* in Europe. *Euro Surveill* 13: 11.
- Medlock JM, Hansford KM, Schaffner F, Versteir V, Hendrickx G, et al. (2012) A review of the invasive mosquitoes in Europe: Ecology, public health risks, and control options. *Vector Borne Zoonotic Dis* 12: 435–447.
- WHO (2013) Regional framework for surveillance and control of invasive mosquito vectors and re-emerging vector-borne diseases. Regional committee for Europe sixty-third session. Available: http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0020/194105/63wd09e_Vector-borne-2.pdf. Accessed: 2014 Mar 10.
- Hubálek Z (2008) Mosquito-borne viruses in Europe. *Parasitol Res* 103: 29–43.
- Jöst H, Bialonski A, Storch V, Günther S, Becker N, et al. (2010) Isolation and phylogenetic analysis of Sindbis viruses from mosquitoes in Germany. *J Clin Microbiol* 48: 1900–1903.
- Jöst H, Bialonski A, Schmetz C, Günther S, Becker N, et al. (2011) Isolation and phylogenetic analysis of Batai virus, Germany. *Am J Trop Med Hyg* 84: 241–243.
- Jöst H, Bialonski A, Maus D, Sambri V, Eiden M, et al. (2011) Isolation of Usutu virus in Germany. *Am J Trop Med Hyg* 85: 551–553.
- Ventim R, Ramos JA, Osório H, Lopes RJ, Pérez-Tris J, et al. (2012) Avian malaria infections in western European mosquitoes. *Parasitol Res* 111: 637–645.
- Hesson JC, Rettich F, Merdić E, Vignjević G, Östman O, et al. (2013) The arbovirus vector *Culex torrentium* is more prevalent than *Culex pipiens* in northern and central Europe. *Med Vet Entomol* doi: 10.1111/mve.12024.
- Farajollahi A, Fonseca DM, Kramer LD, Kilpatrick AM (2011) "Bird biting" mosquitoes and human disease: A review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes in epidemiology. *Infect Genet Evol*. 11: 1577–1585.
- Vinogradova EB (2000) *Culex pipiens pipiens* mosquitoes: Taxonomy, distribution, ecology, physiology, genetics, applied importance and control. Sofia-Moscow: Pensoft Publishers. 253p.
- Weitzel T, Collado A, Jöst A, Pietsch K, Storch V, et al. (2009) Genetic differentiation of populations within the *Culex pipiens* complex and phylogeny of related species. *J Am Mosq Control Assoc* 25: 6–17.
- Weitzel T, Braun K, Collado A, Jöst A, Becker N (2011) Distribution and frequency of *Culex pipiens* and *Culex torrentium* (Culicidae) in Europe and diagnostic allozyme markers. *Eur Mosq Bull* 29: 22–37.
- Vinogradova EB, Shaikovich EV, Ivanitsky AV (2007) A study of the distribution of the *Culex pipiens* complex (Insecta: Diptera: Culicidae) mosquitoes in the European part of Russia by molecular methods of identification. *Comp Cytogen* 1: 129–138.
- Scherpner C (1960) Zur Ökologie und Biologie der Stechmücken des Gebietes Frankfurt am Main (Diptera, Culicidae). *Mitt Zool Mus Berlin* 36: 49–99.
- Raymond M (1995) On the breeding period of *Culex pipiens* and *Culex torrentium* (Diptera, Culicidae) in Uppsala, Sweden. *Entomol Tidskr* 116: 65–66.
- Jaenson TGT, Niklasson B (1986) Feeding patterns of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in relation to the transmission of Ockelbo disease in Sweden. *Bull Entomol Res* 76: 375.
- Lundström JO, Niklasson B, Francy DB (1990) Swedish *Culex torrentium* and *Cx. pipiens* (Diptera: Culicidae) as experimental vectors of Ockelbo virus. *J Med Entomol* 27: 561–563.
- Hesson JC, Östman O, Schäfer M, Lundström JO (2011) Geographic distribution and relative abundance of the sibling vector species *Culex torrentium* and *Culex pipiens* in Sweden. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11: 1383–1389.
- Tsai TF, Popovici F, Cernescu C, Campbell GL, Nedelcu NI (1998) West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. *Lancet* 352: 1–5.
- West Nile Virus: Fact sheet N° 354. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs354/en/>. Accessed 2014 Jan 30.
- Melaun C, Werblow A, Busch MW, Liston A, Klimpel S (2014) Bats as potential reservoir hosts for vector-borne diseases. In: Klimpel S, Mehlhorn H editors. *Parasitology Research Monographs*. Springer: pp. 25–61.
- Smith JL, Fonseca DM (2004) Rapid assays for identification of members of the *Culex (Culex) pipiens* complex, their hybrids, and other sibling species (Diptera: Culicidae). *Am J Trop Med Hyg* 70: 339–345.
- Vinogradova EB, Shaikovich EV (2007) Morphometric, physiological and molecular characteristics of underground populations of the urban mosquito *Culex pipiens* Linnaeus f. *molestus* Forskål (Diptera: Culicidae) from several areas of Russia. *Eur Mosq Bull* 22: 17–24.
- Rudolf M, Czajka C, Börstler J, Melaun C, Jöst H, et al. (2013) First nationwide surveillance of *Culex pipiens* complex and *Culex torrentium* mosquitoes demonstrated the presence of *Culex pipiens* Biotype *pipiens/molestus* hybrids in Germany. *PLoS ONE* 8: doi: 10.1371/journal.pone.0071832.
- Krzywinski J, Wilkerson RC, Besansky NJ (2001) Toward understanding Anophelinae (Diptera, Culicidae) phylogeny: insights from nuclear single-copy genes and weight of evidence. *Syst Biol* 50: 540–546.
- Sallum MAM, Schultz TR, Foster PG, Aronstein K, Wirtz RA, et al. (2002) Phylogeny of Anophelinae (Diptera: Culicidae) based on nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequences. *Syst Entomol* 27: 361–382.
- Reidenbach KR, Cook S, Bertone MA, Harbach RE, Wiegmann BM, et al. (2008) Phylogenetic analysis and temporal diversification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) based on nuclear genes and morphology. *BMC Evol Biol* 9: 298.

32. Mirabello L, Conn JE (2008) Population analysis using the nuclear white gene detects Pliocene/Pleistocene lineage divergence within *Anopheles nuneztovari* in South America. *Med Vet Entomol* 22: 109–119.
33. Sallum MAM, Marrelli MT, Nagaki SS, Laporta GZ, dos Santos CL (2008) Insight into *Anopheles (Nyssorhynchus)* (Diptera: Culicidae) species from Brazil. *J Med Entomol* 45: 970–981.
34. Bourke BP, Oliveira TP, Suesdek L, Bergo ES, Sallum MA (2013) A multi-locus approach to barcoding in the *Anopheles stroedei* subgroup (Diptera: Culicidae). *Parasit Vectors* 6: 111.
35. Foster PG, Bergo ES, Bourke BP, Oliveira TP, Nagaki SS, et al. (2013) Phylogenetic analysis and DNA-based species confirmation in *Anopheles (Nyssorhynchus)*. *PLoS ONE* 8: 54063.
36. Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, de Waard JR (2003a) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 270: 313–321.
37. Hebert PDN, Ratnasingham S, de Waard JR (2003b) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 270: 96–99.
38. Saeung A, Baimai V, Otsuka Y, Rattanarithikul R, Somboon P, et al. (2008) Molecular and cytogenetic evidence of three sibling species of the *Anopheles barbirostris* form A (Diptera: Culicidae) in Thailand. *Parasitol Res* 102: 499–507.
39. Pedro P, Sallum MAM (2009) Spatial expansion and population structure of the Neotropical malaria vector, *Anopheles darlingi*. *Biol J Linn Soc Lond* 97: 854–866.
40. Meyer CP, Paulay G (2005) DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biol* 3: 422.
41. Lou M, Golding GB (2010) Assigning sequences to species in the absence of large interspecific differences. *Mol Phylogenet Evol* 56: 187–194.
42. Meier R, Shiyang K, Vaidya G, Ng PK (2006) DNA barcoding and taxonomy in Diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success. *Syst Biol* 55: 715–728.
43. van Velzen R, Weitschek E, Felici G, Bakker FT (2012) DNA barcoding of recently diverged species: relative performance of matching methods. *PLoS ONE* 7: 30490.
44. Werblow A, Bolius S, Dorresteyn AWC, Melaun C, Klimpel S (2013) Diversity of *Culex torrentium* Martini, 1925 – a potential vector of arboviruses and filaria in Europe. *Parasitol Res* 112: 2495–2501.
45. Mohrig W (1969) Die Culiciden Deutschlands. Untersuchungen zur Taxonomie, Biologie und Ökologie der einheimischen Stechmücken. Jena: Parasitol Schriftenreihe.
46. Zittra C (2012) Bestimmungsschlüssel der Culiciden (Insecta: Diptera) im Nationalpark Donau-Auen. Wissenschaftl Reihe Nationalpark Donau-Auen 27: 44 pp.
47. Ivanova NV, deWaard J, Hebert PDN (2006) An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high quality DNA. *Mol Ecol Notes* 6: 998–1002.
48. 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 Biotech* 3: 294–297.
49. Templeton AR, Crandall KA, Sing CF (1992) A cladistics analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonucleases mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* 132: 619–633.
50. Clement M, Posada D, Crandall KA (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol Ecol* 9: 1657–1659.
51. Posada D, Crandall KA (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817–818.
52. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, et al. (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 10: 2731–2739.
53. Tamura K (1992) Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. *Mol Biol Evol* 9: 678–687.
54. Legendre P, Anderson MJ (1999) Distance based redundancy analysis: testing multispecies responses in multifactorial ecological experiments. *Ecol Monogr* 69: 1–24.
55. McArdle BH, Anderson MJ (2001) Fitting multivariate models to community data: a comment on distance-based redundancy analysis. *Ecology* 82: 290–297.
56. Anderson MJ (2004) DISTLM v.5: a FORTRAN computer program to calculate a distance-based multivariate analysis for a linear model. New Zealand: Department of University of Auckland, Statistics.
57. Jensen JD, Kim Y, Dumont VB, Aquadro CF, Bustamante CD (2005) Distinguishing between selective sweeps and demography using DNA polymorphism data. *Genetics* 170: 1401–1410.
58. Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479–491.
59. Excoffier L, Lischer HE (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Res* 10: 564–567.
60. Tamura K, Nei M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 10: 512–526.
61. McDonald JH, Kreitman M (1991) Adaptive protein evolution at the Adh locus in *Drosophila*. *Nature* 351: 652–654.
62. Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451–1452.
63. Tajima F (1989) Statistical-method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585–595.
64. Taylor DR, Keller SR (2007) Historical range expansion determines the phylogenetic diversity introduced during contemporary species invasion. *Evolution* 61: 334–345.
65. Excoffier L, Foll M, Petit RJ (2009) Genetic consequences of range expansion. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 40: 481–501.
66. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search program. *Nucleic Acids Res* 25: 3389–3402.
67. Ballou F, Lugon-Moulin N (2002) The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Mol Ecol* 11: 155–165.
68. Lindström JO (1999) Mosquito-borne viruses in Western Europe: a review. *J Vector Ecol* 24: 1–39.
69. Dahl C (1988) Taxonomic studies on *Culex pipiens* and *Culex torrentium*. In: Service MW, editor. *Biosystematics of haematophagous insects*. Oxford: Clarendon Press: pp. 149–175.
70. Shaikevich EV (2007) PCR-RFLP of the COI gene reliably differentiates *Cx. pipiens*, *Cx. pipiens f. molestus* and *Cx. torrentium* of the *pipiens* complex. *European Mosquito Bulletin* 23: 25–30.
71. Engdahl C, Larsson P, Näslund J, Bravo M, Evander M, et al. (2013) Identification of Swedish mosquitoes based on molecular barcoding of the COI gene and SNP analysis. *Mol Ecol Res*: doi: 10.1111/1755-0998.12202.
72. Miller BR, Crabtree BR, Savage HM (1996) Phylogeny of fourteen *Culex* mosquito species, including the *Culex pipiens* complex, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Insect Mol Biol* 5: 93–107.
73. Osório HC, Zé-Zé L, Amaro F, Nunes A, Alves MJ (2014) Sympatric occurrence of *Culex pipiens* (Diptera, Culicidae) biotypes *pipiens*, *molestus* and their hybrids in Portugal, Western Europe: feeding patterns and habitat determinants. *Med Vet Entomol* 28: 103–109.
74. Bandelt H-J, Forster P, Sykes BC, Richards MB (1995) Mitochondrial portraits of human populations using median networks. *Genetics* 141: 743–753.
75. Lindquist AW, Ikeshoji T, Grab T, Botha de Meillon, Khan ZH (1967) Dispersion studies of *Culex pipiens fatigans* tagged with 32P in the Kemmendine Area of Rangoon, Burma. *Bull Wld Hlth Org* 36: 21–37.
76. Tsuda Y, Komagata O, Kasai S, Hayashi T, Nihei N, et al. (2008) A mark-recapture study on dispersal and flight distance of *Culex pipiens pallens* in an urban area of Japan. *J Am Mosq Control Assoc* 24: 339–343.
77. Reisen WK, Milby MM, Meyer RP, Pfuntner AR, Spoehel J, et al. (1991) Mark-recapture studies with *Culex* mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Southern California. *J Med Entomol* 28: 357–371.
78. Estep LK, Burkett-Cadena ND, Hill GE, Unnasch RS, Unnasch TR (2010) Estimation of dispersal distances of *Culex erraticus* in a focus of Eastern Equine Encephalitis virus in the southeastern United States. *J Med Entomol* 47: 977–986.
79. LaPointe DA (2008) Dispersal of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in a Hawaiian rain forest. *J Med Entomol* 45: 600–609.
80. Laven H (1951) Crossing experiments with *Culex* strains. *Evolution* 5: 370–375.
81. Wiwatanaratnabutr S, Kittayapong P (2009) Effects of crowding and temperature on *Wolbachia* infection density among life cycle stages of *Aedes albopictus*. *J Invertebr Pathology* 102: 220–224.
82. Boyle L, O'Neill SL, Robertson HM, Karr TL (1993) Interspecific and intraspecific horizontal transfer of *Wolbachia* in *Drosophila*. *Science* 260: 1796–1799.
83. Hoffmann AA, Clancy DJ, Duncan J (1996) Naturally-occurring *Wolbachia* infection in *Drosophila simulans* that does not cause cytoplasmic incompatibility. *Heredity* 76: 1–8.
84. Clancy DJ, Hoffmann AA (1998) Environmental effects on cytoplasmic incompatibility and bacterial load in *Wolbachia*-infected *Drosophila simulans*. *Entomol Exp Appl* 86: 13–24.
85. Rousset F, Raymond M (1991) Cytoplasmic incompatibility in insects: why sterilize females? *Trends Ecol Evol* 6: 54–57.
86. Sinkins SP, Walker T, Lynd AR, Steven AR, Makepeace BL, et al. (2005) *Wolbachia* variability and host effects on crossing type in *Culex* mosquitoes. *Nature* 436: 257–260.
87. Khrabrova NV, Bukhanskaya ED, Sibataev AK, Volkova TV (2009) The distribution of strains of endosymbiotic bacteria *Wolbachia pipiensis* in natural populations of *Culex pipiens* mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Eur Mosq Bull* 2009 27: 18–22.
88. Chevillon C, Eritja R, Pasteur N, Raymond M (1995) Commensalism, adaptation and gene flow: mosquitoes of the *Culex pipiens* complex in different habitats. *Genet Res* 66: 147–157.

Modeling of the putative distribution of the arbovirus vector *Ochlerotatus japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae) in Germany

Christian Melaun · Antje Werblow · Sarah Cunze · Sina Zotzmann · Lisa K. Koch · Heinz Mehlhorn · Dorian D. Dörge · Katrin Huber · Oliver Tackenberg · Sven Klimpel

Received: 3 December 2014 / Accepted: 15 December 2014 / Published online: 13 January 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract Today, international travel and global freight transportation are increasing and have a direct influence on the introduction and establishment of non-native mosquito species as well as on the spread of arthropod (mosquito)-borne diseases inside Europe. One of the mosquito species that has become invasive in many areas is the Asian rock pool or bush mosquito *Ochlerotatus japonicus japonicus* (synonyms: *Aedes japonicus japonicus* or *Hulecoeteomyia japonica japonica*). This species was detected in Germany in 2008 for the first time. Until today, three different *Oc. j. japonicus* populations have been documented. Laboratory studies have shown that *Oc. j. japonicus* can act as a vector for a variety of disease agents. Thus, the knowledge on its current distribution is essential for different measurements. In the present study, ecological niche models were used to estimate the potential distribution of *Oc. j. japonicus* in Germany. The aim was to detect areas within Germany that could potentially function as habitats for this species. According to our model, areas in

western, southern, and central Germany offer suitable conditions for the mosquito and may therefore be at risk for an invasion of the species. We strongly suggest that those areas should be monitored more intensively in the future. For this purpose, it would also be essential to search for possible dispersal routes as well as for natural barriers.

Keywords *Ochlerotatus japonicus japonicus* · Germany · Vector · Modeling

Introduction

The introduction of non-native species throughout the globe is increasing due to human movement and global trade (Mack et al. 2000; Juliano et al. 2004). Species are repeatedly introduced into new areas, but very few of them become established. Often, the establishment and invasion of non-native species is possible due to their ability to adapt to changing climate conditions and habitats. The distribution of many species has already expanded. This concerns both regional and global distributions, since the increasing international travel and global freight transportation have direct influence on the introduction and possible establishment of mosquito species as well as of mosquito-associated pathogens, arriving from other countries.

Two examples of such invasive species are the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* and the tiger mosquito *Aedes albopictus*. The Asian rock pool or bush mosquito *Ochlerotatus japonicus japonicus* (synonyms: *Aedes japonicus japonicus* or *Hulecoeteomyia japonica japonica*) is another invasive species, which successfully established in many parts of the world (Tanaka et al. 1979; Kaufman and

C. Melaun · A. Werblow · S. Zotzmann · L. K. Koch · D. D. Dörge · S. Klimpel (✉)

Institute for Ecology, Evolution and Diversity, Senckenberg Biodiversity and Climate Research Centre, Senckenberg Gesellschaft für Naturforschung, Goethe-University, Max-von-Laue-Str. 13, 60438 Frankfurt/ M., Germany
e-mail: Sven.Klimpel@senckenberg.de

S. Cunze · O. Tackenberg
Institute for Ecology, Evolution and Diversity; Department Ecology and Geobotany, Goethe-University, Max-von-Laue-Str. 13, 60438 Frankfurt/ M., Germany

H. Mehlhorn
Institute for Parasitology, Heinrich Heine University, Universitätsstr. 1, 40225 Düsseldorf, Germany

K. Huber
Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, Bernhard-Nocht-Str. 74, 20359 Hamburg, Germany

Fonseca 2014). The first detection of *Oc. j. japonicus* outside its native range was in New Zealand in 1993 (Laird et al. 1994). Although further introductions of this species were detected, all individuals were eliminated, and no further establishment has been observed in New Zealand so far. In 1998, *Oc. j. japonicus* was documented in the USA for the first time when several specimens were collected from New York (Peyton et al. 1999). Since then, the species has been described from 33 different states in the USA (Kaufman and Fonseca 2014). In 2001, this species was also found in the Canadian province Quebec (Savignac et al. 2002). The first occurrence of *Oc. j. japonicus* in Europe was described from France, but all introduced specimens could be eliminated (Schaffner et al. 2003, 2009). Since the suggested establishment of *Oc. j. japonicus* in Belgium (2003), to date, the species can also be found in Austria and Slovenia (both since 2011), the Netherlands, Croatia as well as again in France (findings all 2013) (Versteirt et al. 2009; Schaffner et al. 2009; Seidel et al. 2012; Werner and Kampen 2013; Ibañez-Justicia et al. 2014; Kampen and Werner 2014). An additional European population was found northern Switzerland in 2008 (Schaffner et al. 2009) from where it is suspected of having been spread to Germany (Becker et al. 2011), with a first detection in a southern region of Baden-Wuerttemberg during the same year. Four years later, in 2012, another population of *Oc. j. japonicus* was found in North Rhine-Westphalia, and in 2013, a third population was found in an area close to Hanover (Lower Saxony) (Werner and Kampen 2013). In both the native as well as newly colonized regions, *Oc. j. japonicus* seems to be present in a broad range of habitats, including rural, suburban, and urban settings (Takashima and Rosen 1989; Andreadis et al. 2001). Overall, this species is found in a wider variety of habitats than ecologically similar species.

In the field, females feed primarily on mammals, including humans (Apperson et al. 2004), but under laboratory conditions, they feed readily on avian hosts (Sardelis et al. 2002a, 2003). *Ochlerotatus j. japonicus* is known as a nuisance biter from various sites but not as a generally aggressive human biter (Kaufman and Fonseca 2014). However, the role of *Oc. j. japonicus* as a nuisance species or disease vector in Germany is unknown. In the laboratory, it was found to be a possible vector of several diseases like La Crosse encephalitis (LAC), St. Louis encephalitis (SLEV), Eastern equine encephalitis (EEEV) and West Nile virus (WNV) (Sardelis et al. 2002a, 2002b, 2003; Turell et al. 2005). The West Nile virus as well as the Japanese equine encephalitis virus (JEV) has also been detected in field-collected specimens (Kampen and Werner 2014). The combination of its possible vector competence for such diseases and man-biting habits makes the species a new potential health threat in Europe. Further surveillance of the spread of *Oc. j. japonicus* in Europe is therefore necessary. The major reasons for the success of *Oc. j. japonicus* as an

invasive species but also as a disease vector are numerous of its native range characteristics, e.g., its tolerance of cold temperature, host feeding preferences, use of diverse larval habitats and its disposition for forested areas (Kaufman and Fonseca 2014). Although new breeding sites have been reported annually, the radiation mechanisms of this species are not fully clarified. In the present study, new records of *Oc. j. japonicus* near to already known localities of their occurrence were made. Based on these records and on six bioclimatic variables, we modeled the potential distribution of *Oc. j. japonicus* in Germany using ecological niche modeling (Fig. 1). Ecological niche models (ENMs), also known as species distribution models (SDMs), are correlative models that relate data of species occurrence to the environmental conditions at given sites (Guisan and Zimmermann 2000) in order to project the potential distribution of a species under current and projected future climatic conditions resulting in habitat suitability maps (Guisan and Thuiller 2005). Additionally, the climatic conditions (mean temperatures of 1950–2010) of the worldwide known distribution of the species show a broad range of possible new habitats, limited to the northern hemisphere (Fig. 2). Both calculations may lead to a better understanding of the radiation of this species and the coordination of surveillance programs.

Methods

Sampling and morphological identification

The recently collected specimens of *Oc. j. japonicus* were obtained during the survey period in October 2013 and between March and October 2014 at ten different localities (Table 1). The sampling points are located in the German states of North Rhine Westphalia ($n=3$), Baden-Wuerttemberg ($n=4$), and Rhineland Palatinate ($n=3$) close to other collection sites of previous studies (Kampen et al. 2012; Werner and Kampen 2013; Huber et al. 2014). Larvae were caught with small hand nets from flower vases or wells on different cemeteries. Some of the caught larvae were preserved in 70 % ethanol, whereas most of them were reared to adults in the laboratory. In order to kill the animals and for morphological identification, the hatched adults were frozen at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for at least 20 min. After morphological identification of the individuals by means of a stereomicroscope and using the identification keys of Gutsevich et al. (1974) and Tanaka et al. (1979), adults and larvae were pictured with an Olympus MVX 10 MacroView microscope (Figs. 3 and 4).

Molecular species identification

To verify the morphological results, 29 samples (Table 1) were analyzed with molecular methods. The DNA was extracted

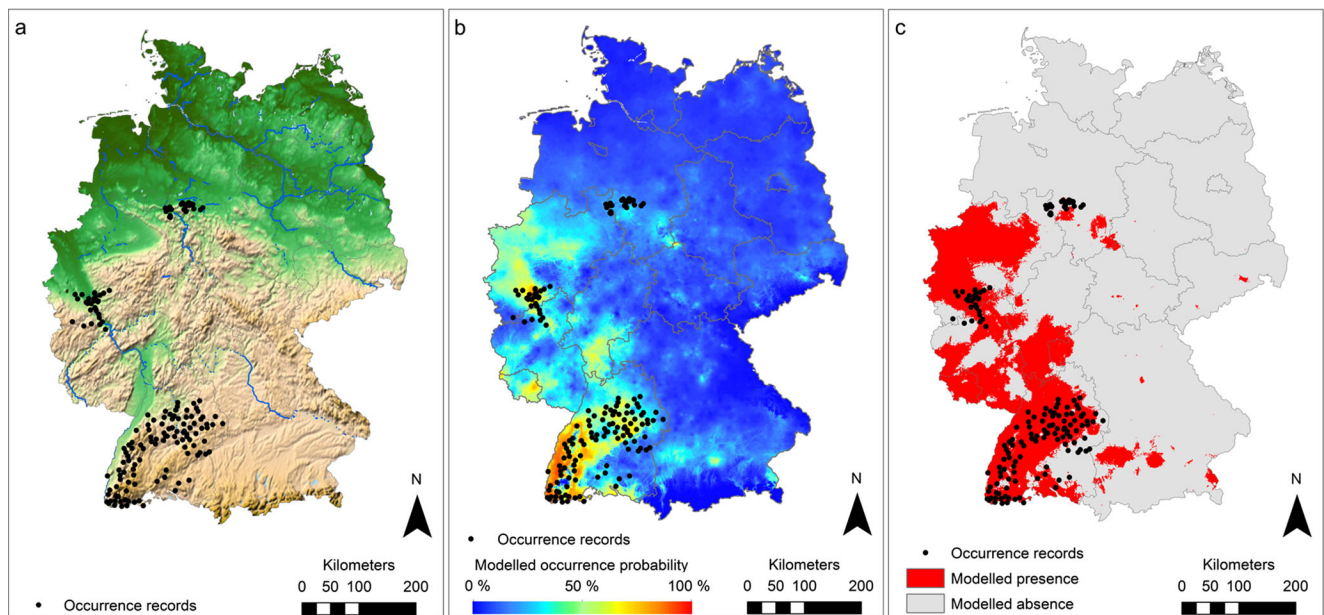


Fig. 1 Modeling results for *Ochlerotatus japonicus japonicus* in Germany (dots show the occurrence points). **a** Current occurrence records in a physical map with the biggest water streams (map provided by ArcGIS online within ArcGIS 10.1, water streams by Wasser- und Schifffahrtsverwaltung des Bundes: [http://www.wsv.de/service/karten_

[geoinformationen/verknnet_bwast/index.html](http://www.wsv.de/service/karten_)]). **b** Continuous modeling results: warmer colors (on a scale from blue to red) indicate areas with a higher modeled occurrence probability. **c** Dichotomous modeling results: threshold 25.5 % (optimization criteria: minimizing the difference between specificity and sensitivity) Projection: Gauss Krüger

from whole mosquitoes using the protocol of Ivanova et al. (2006) with glass fiber plates (Pall GmbH, Dreieich, Germany). The cytochrome c oxidase subunit 1 gene fragment (cox1) was amplified using BC-Kumar forward/reverse primers (Kumar et al. 2007). PCR reaction mixture contained 12.5 μ l Master Mix (Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen, Germany) containing 0.4 mM dNTP, 4 mM MgCl₂, 40 mM Tris-HCl, 32 mM (NH₄)₂SO₄, 0.02 % Tween 20, and 1.25 U

Taq-Polymerase, 1 μ l of each primer (10 pmol μ l⁻¹), as well as varying concentrations of DNA and ddH₂O, in a total volume of 25 μ l. The cycle parameters were as follows: 1 cycle of 94 °C, 2 min; 40 cycles of 94 °C, 60 s; 59 °C, 60 s; and 72 °C, 60 s, followed by terminal extension of 72 °C, 5 min and a final ramping to 8 °C. The yield and quality of DNA was analyzed with SYBR-Green (Life Technologies GmbH) staining and agarose gel-electrophoresis. Sequencing and sequence

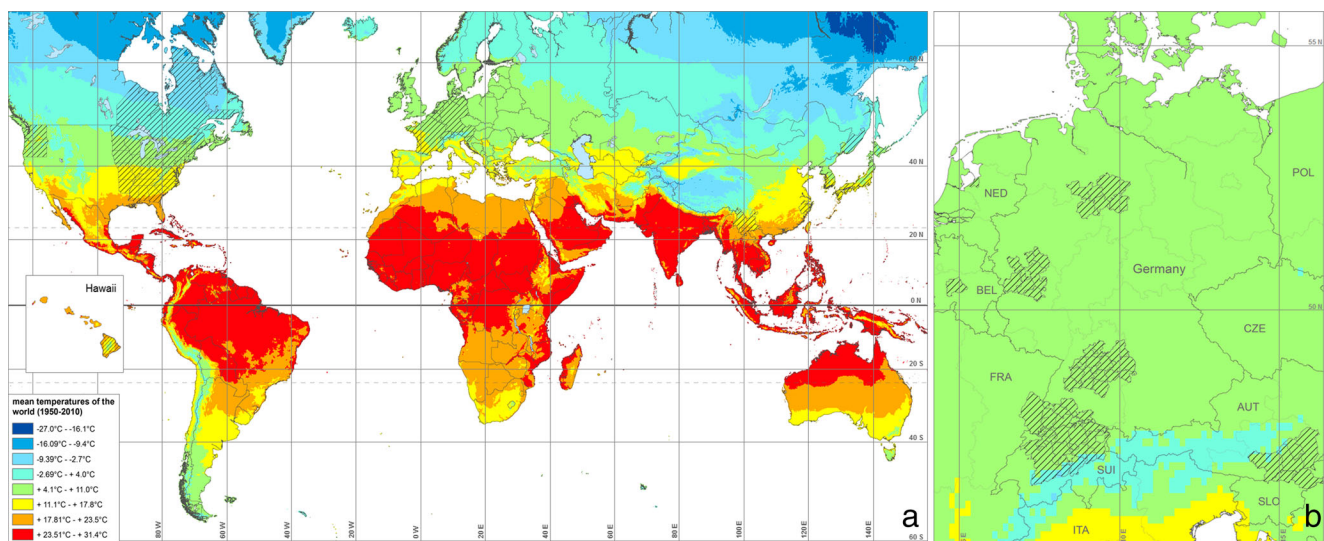


Fig. 2 Current known distribution of *Ochlerotatus japonicus japonicus* (crosshatched regions). **a** Mean annual temperature together with the worldwide distribution of *Ochlerotatus japonicus japonicus* (islands of

Hawaii shown bigger), as it is part of the species' distribution. **b** Europe-wide distribution of *Oc. j. japonicus*

Table 1 Collection sites where *Ochlerotatus japonicus japonicus* was found during the survey between October 2013 and October 2014

State	Locality	Coordinates	Sampling dates	Analyzed specimens
North Rhine-Westphalia	Bad Honeff	50.63215°/7.22815°	06 Sep. 2013	3
			14 Mar. 2014	
			17 Jul. 2014	2
	Bonn (Holtorf)	50.729571°/7.183810°	06 Sep. 2013	2
			14 Mar. 2014	
			06 Sep. 2013	3
Bonn (Holzlar)	50.73563°/7.19843°	14 Mar. 2014	2	
		06 Apr. 2014	3	
		17 Jul. 2014	2	
Rhineland-Palatinate	Leutesdorf	50.452324°/7.386395°	17 Jul. 2014	2
			30 Jul. 2014	
	Koblenz	50.343015°/7.613236	30 Jul. 2014	2
			Neuwied	50.451213°/7.431407°
Baden-Wuerttemberg	Backnang	48.942536°/9.440181°	30 Jul. 2014	
			23 Jul. 2014	3
	Höflingswart	48.830071°/9.457525°	1 Oct. 2014	
			23 Jul. 2014	2
	Remshalden (Geradstetten)	48.81098°/9.43779°	7 Oct. 2014	
			4 Oct. 2013	2
Remshalden (Rohrbronn)	48.815006°/9.464687°	28 Jun. 2014	2	
		23 Jul. 2014	2	

analysis were carried out as previously described (Werblow et al. 2013). The obtained sequences were deposited in GenBank under accession numbers KP076230–KP076258.

Ecological niche modeling

Maxent

The maximum entropy approach was implemented in the software Maxent (Phillips et al. 2004; Phillips and Dudík 2008), a correlative and presence-only ENM-approach. Maxent is one of the most popular tools (Merow et al. 2013) used in order to project the potential distribution of a species under current or future climatic conditions (e.g., Hijmans and Graham 2006; Kumar and Stohlgren 2009; Stabach et al. 2009; Trisurat et al. 2009; Reiss et al. 2011) and scores well in comparative studies (e.g., Elith et al. 2006).

Occurrence data

One hundred sixty occurrence records were used from Germany (107 from Baden-Wuerttemberg, 30 from the Bonn-Koblenz area, and 23 from the Hanover area; Fig. 1). Out of the sampling sites described in Table 1, only localities which had been checked until 19 March 2014 were used for modeling purposes. The model of the possible future

distribution of *Oc. j. japonicus* in Germany was calculated on the basis of these and additional locality data of the German Mosquito Control Association (KABS/GFS) throughout the years 2011–2013 as well as from the literature (Kampen et al. 2012; Werner and Kampen 2013).

Environmental data

Only climatic variables were considered in this study. In ecological niche modeling, bioclimatic variables derived from monthly temperature and rainfalls (Hijmans et al. 2005) are commonly used in order to project areas with suitable climatic conditions. Since climate changes have already taken place in the last decades and due to the fact that *Oc. j. japonicus* was not known to occur in Germany before 2008, we decided not to use the data provided by worldclim (<http://www.worldclim.org>), which are based on the average condition of the period from 1950 to 2000 in order to model the potential distribution of *Oc. j. japonicus*. Thus, the bioclimatic variables based on the data on monthly temperature and rainfall in Germany provided by the Deutscher Wetterdienst (DWD) were used following the Arc-Info workstation script (<http://www.worldclim.org/bioclim-aml>), considering the period from 2011 to 2013. This period corresponds to the observation data noted for the occurrence records used generally for modeling.

Fig. 3 *Ochlerotatus japonicus japonicus* adult. **a** Adult female; **b** adult male; **c** head, female (note the short palps and the pilose antennae in comparison with the female); **d** head, male (note the long palps and the plumose antennae in comparison with the female); **e** lateral view of thorax showing the characteristic patches; **f** dorsal view of thorax (note the characteristic pattern)



Studies were worked out at a spatial resolution of 30 arc seconds (~1 km) which is in accordance with the spatial resolution of the occurrence points. Among the 19 available bioclimatic variables provided by worldclim (<http://www.worldclim.org/bioclim>), a subset of seven variables was used being only little intercorrelated (Spearman correlation coefficient $r < 0.79$, see Table 2): bio01=Annual Mean Temperature, bio04=Temperature Seasonality, bio05=Max Temperature of Warmest Month, bio06=Min Temperature of Coldest Month, bio12=Annual Precipitation, bio14=Precipitation of Driest Month, and bio18=Precipitation of Warmest Quarter.

Distribution data

In order to get an idea of the further potential spread of *Oc. j. japonicus*, we used the data provided by worldclim (www.worldclim.org),

representing the average condition of the period from 1950 to 2000 to calculate the mean temperatures over the time with ArcMap 10.1. To show the worldwide distribution of *Oc. j. japonicus*, the published distribution data of *Oc. j. japonicus* from Asia, North America, and Europe were used (e.g., Kaufman and Fonseca 2014).

Results

Observed distributions

The current distribution of *Oc. j. japonicus* in Germany seems to be limited to Baden-Wuerttemberg, a region in North Rhine-Westphalia (West-Germany) as well as to the area around Hanover in Lower Saxony (Fig. 1a–c). As shown in

Fig. 4 *Ochlerotatus japonicus japonicus* larva. **a** Dorsal view of head (*upper* and *lower* head setae in a straight line); **b** ventral view of head; **c**, **d** posterior end, siphonal tuft within pecten; **e** total, dorsal view; **f** total, lateral view

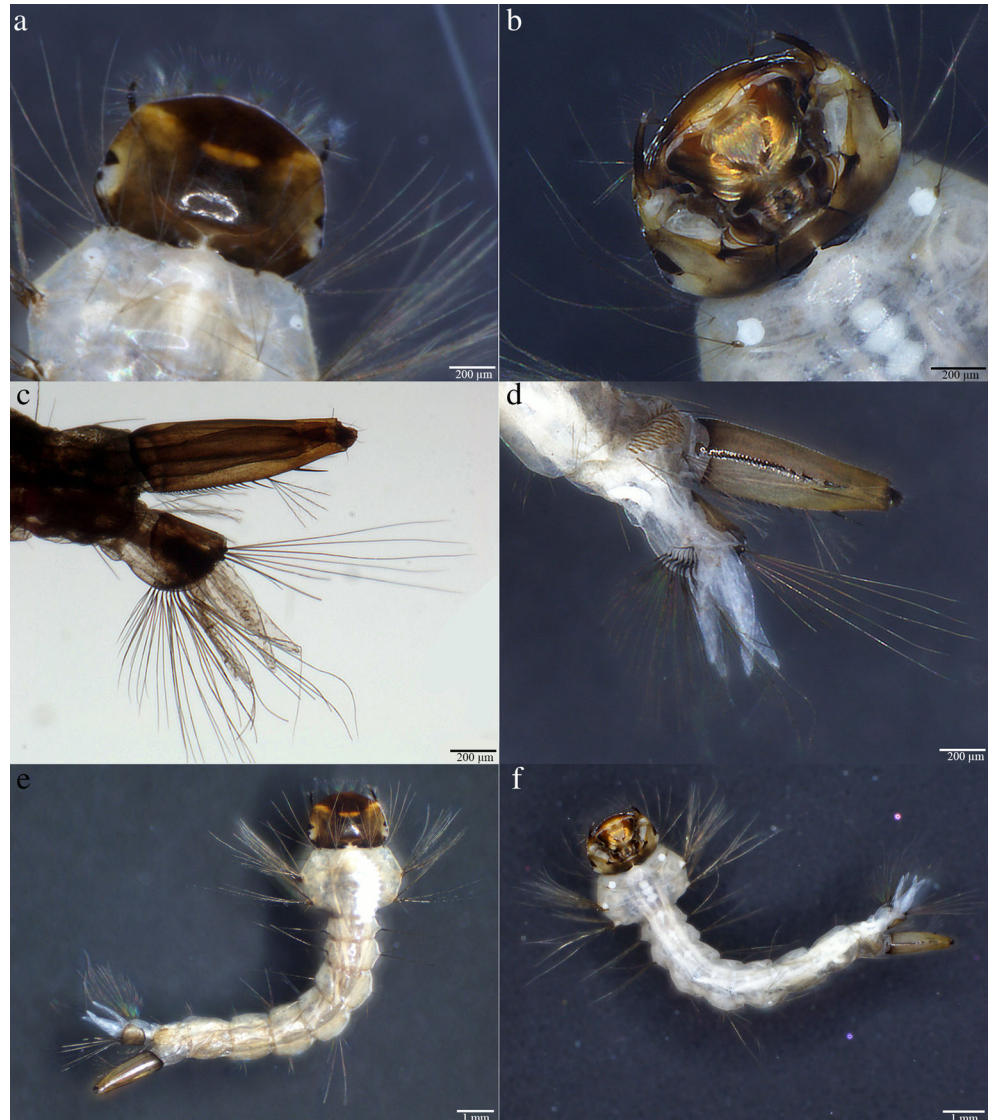


Fig. 1a, the localities in Baden-Wuerttemberg are prevailed and spread throughout the Black Forest, Kraichgau, and other mountain regions. Different from the localities near Bonn and Koblenz, where *Oc. j. japonicus* can be found along the river Rhine, the species is rarely found in the Rhine Valley close to the Black Forest.

Modeled distribution

Figure 1b, c shows the Maxent modeling results for the *Oc. j. japonicus* in Germany based on six bioclimatic variables. The area under the receiver operating characteristic curve (AUC, Liu 2005) value is 0.88 (mean averaged over 100 replications). In Fig. 1b, the continuous modeling results are shown. Warmer colors indicate areas with higher projected habitat suitability. In Fig. 1c, the dichotomous modeling results are shown. Areas with a modeled occurrence probability over

25.5 % are displayed in red. The threshold of 25.5 % was chosen according to the optimization criteria that minimize the difference between specificity and sensitivity. According to the modeling, the results of *Oc. j. japonicus* are projected to potentially occur in large parts of South-Western Germany (North Rhine-Westphalia, parts of southern Lower Saxony, Rhineland-Palatinate, southern Hesse, Saarland, Baden-Wuerttemberg and parts of Bavaria (Fig. 1b, c). The modeled distribution reflects well the observed distribution and even goes beyond (in particular with respect to results in the northern parts of North Rhine-Westphalia, Rhineland-Palatinate, southern Hesse, and Saarland).

Worldwide range and temperature tolerance

In Fig. 2a, the average temperatures over the world are shown together with the current known distribution areas of *Oc. j.*

Table 2 Spearman correlation coefficients between the 19 bioclimatic variables provided by worldclim

	bio01	bio02	bio03	bio04	bio05	bio06	bio07	bio08	bio09	bio10	bio11	bio12	bio13	bio14	bio15	bio16	bio17	bio18	bio19
bio01	1.00	0.06	0.46	-0.23	0.53	0.69	-0.23	0.41	0.90	0.70	0.84	-0.53	-0.43	-0.34	-0.50	-0.60	-0.47	-0.53	-0.49
bio02	0.06	1.00	0.50	0.60	0.76	-0.50	0.84	0.16	0.05	0.50	-0.18	-0.04	-0.11	0.29	-0.19	0.05	0.07	0.00	-0.14
bio03	0.46	0.50	1.00	-0.28	0.40	0.31	0.00	0.09	0.53	0.24	0.51	-0.18	-0.35	-0.14	-0.39	-0.44	-0.12	-0.42	-0.15
bio04	-0.23	0.60	-0.28	1.00	0.51	-0.79	0.89	0.25	-0.36	0.47	-0.64	-0.07	0.14	0.35	0.07	0.33	0.04	0.29	-0.12
bio05	0.53	0.76	0.40	0.51	1.00	-0.12	0.64	0.41	0.48	0.88	0.21	-0.31	-0.29	0.12	-0.40	-0.21	-0.15	-0.23	-0.38
bio06	0.69	-0.50	0.31	-0.79	-0.12	1.00	-0.82	0.14	0.72	0.07	0.91	-0.30	-0.34	-0.55	-0.31	-0.56	-0.37	-0.47	-0.24
bio07	-0.23	0.84	0.00	0.89	0.64	-0.82	1.00	0.13	-0.28	0.42	-0.55	0.09	0.10	0.47	0.03	0.33	0.21	0.26	-0.02
bio08	0.41	0.16	0.09	0.25	0.41	0.14	0.13	1.00	0.27	0.57	0.18	-0.39	-0.22	-0.13	-0.25	-0.21	-0.29	-0.01	-0.38
bio09	0.90	0.05	0.53	-0.36	0.48	0.72	-0.28	0.27	1.00	0.54	0.89	-0.35	-0.40	-0.30	-0.45	-0.57	-0.30	-0.53	-0.31
bio10	0.70	0.50	0.24	0.47	0.88	0.07	0.42	0.57	0.54	1.00	0.31	-0.53	-0.30	-0.04	-0.43	-0.31	-0.36	-0.28	-0.54
bio11	0.84	-0.18	0.51	-0.64	0.21	0.91	-0.55	0.18	0.89	0.31	1.00	-0.29	-0.41	-0.44	-0.42	-0.58	-0.32	-0.52	-0.29
bio12	-0.53	-0.04	-0.18	-0.07	-0.31	-0.30	0.09	-0.39	-0.35	-0.53	-0.29	1.00	0.72	0.59	0.78	0.79	0.89	0.74	0.87
bio13	-0.43	-0.11	-0.35	0.14	-0.29	-0.34	0.10	-0.22	-0.40	-0.30	-0.41	0.72	1.00	0.63	0.94	0.85	0.67	0.83	0.63
bio14	-0.34	0.29	-0.14	0.35	0.12	-0.55	0.47	-0.13	-0.30	-0.04	-0.44	0.59	0.63	1.00	0.51	0.64	0.80	0.58	0.56
bio15	-0.50	-0.19	-0.39	0.07	-0.40	-0.31	0.03	-0.25	-0.45	-0.43	-0.42	0.78	0.94	0.51	1.00	0.88	0.65	0.86	0.68
bio16	-0.60	0.05	-0.44	0.33	-0.21	-0.56	0.33	-0.21	-0.57	-0.31	-0.58	0.79	0.85	0.64	0.88	1.00	0.71	0.94	0.61
bio17	-0.47	0.07	-0.12	0.04	-0.15	-0.37	0.21	-0.29	-0.30	-0.36	-0.32	0.89	0.67	0.80	0.65	0.71	1.00	0.66	0.85
bio18	-0.53	0.00	-0.42	0.29	-0.23	-0.47	0.26	-0.01	-0.53	-0.28	-0.52	0.74	0.83	0.58	0.86	0.94	0.66	1.00	0.57
bio19	-0.49	-0.14	-0.15	-0.12	-0.38	-0.24	-0.02	-0.38	-0.31	-0.54	-0.29	0.87	0.63	0.56	0.68	0.61	0.85	0.57	1.00

bio1 = Annual Mean Temperature; bio2 = Mean Diurnal Range (Mean of monthly (max temp-min temp)); bio3 = Isothermality (BIO2/BIO7) (*100); bio4 = Temperature Seasonality (standard deviation *100); bio5 = Max Temperature of Warmest Month; bio6 = Min Temperature of Coldest Month; bio7 = Temperature Annual Range (bio5-bio6) → bio4; bio8 = Mean Temperature of Wettest Quarter bio9 = Mean Temperature of Driest Quarter; bio10 = Mean Temperature of Warmest Quarter; bio11 = Mean Temperature of Coldest Quarter; bio12 = Annual Precipitation; bio13 = Precipitation of Wettest Month; bio14 = Precipitation of Driest Month; bio15 = Precipitation Seasonality (Coefficient of Variation); bio16 = Precipitation of Wettest Quarter; bio17 = Precipitation of Driest Quarter; bio18 = Precipitation of Warmest Quarter; bio19 = Precipitation of Coldest Quarter

japonicus. The Asian rock pool mosquito is present within 23° and 48° N (Asia), 30°–50° N (USA and Canada), as well as 20° N (Hawaii) and thus occurs in a wide range of temperatures (annual mean temperatures between –2.69 and 23.5 °C). In the southern hemisphere—where temperature conditions prevail that are within this range—the species is not yet found. In the area displayed in Fig. 2b, the annual mean temperatures range between –2.69 and 11.0 °C. This is only a little part of the temperature range that is known to be suitable for *Oc. j. japonicus*. In Europe (Fig. 2b), the current records are more or less selective. Only the sampling areas in Switzerland, France, and Germany, as well as between Austria and Slovenia, may be linked to each other. Here, the species is present between 46°–53° N and 15.5°–16.5° E. Most of these areas show mean temperatures within the range of 4.1 and 11.0 °C.

Discussion

The modeled area with suitable habitat conditions for *Oc. j. japonicus* covers the observed distribution and goes beyond. The areas with modeled suitable conditions but no observed occurrence until now, are worth to be intensively monitored. Information about the potential and actual distribution of *Oc. j. japonicus* is essential due to the medical relevance of the species that is supposed to act as vector for a variety of diseases. *Oc. j. japonicus* is listed as an invasive species in the Global Invasive Species Database (Schneider 2011).

A key assumption in ecological modeling is that the species is in equilibrium with its environment (equilibrium assumption, e.g., Elith and Leathwick 2009), i.e., this means that the species is absent from all unsuitable areas (Pearson 2010) and that all suitable habitats are fully occupied by the species (Wiens et al. 2009). Whereas a species can never be thought to be fully in equilibrium with its environment (e.g., Lobo et al. 2010; Gillson et al. 2013), the equilibrium assumption is especially assumed to be violated in case of invasive species that are expanding their new ranges during the invasion process. The distributions of invasive species in the new ranges are thought to be strongly affected by dispersal and colonization processes (Václavík and Meentemeyer 2012).

Oc. j. japonicus was first detected in Germany in 2008 on the Swiss-German border (Kampen et al. 2012). Since then, the species has been observed to expand northward. Due to dispersal limitation and the short time period since the first detection, *Oc. j. japonicus* is strongly supposed not to be in equilibrium with its environment in Germany. Thus, the species is supposed to be absent in parts of the study area because the species has not been able to reach it although the environmental conditions are suitable there.

The potentially violated equilibrium assumption has to be kept in mind when interpreting the modeling results.

However, it must be considered that the modeling results can be taken as a valuable basis for monitoring. Due to the dispersal limitation the potential distribution of *Oc. j. japonicus* in Germany may be underestimated (Pearson 2010). *Oc. j. japonicus* is supposed to be tolerant to a wide range of temperatures. As shown in Fig. 2, *Oc. j. japonicus* occurs in regions with an annual mean temperature of –2.69 to 23.5 °C. As a cold-tolerant species, *Oc. j. japonicus* has been detected in regions with low winter temperatures, down to –18 °C (Bevins 2007). It overwinters primarily in the egg stage but sometimes also in the larval stage (Bevins 2007; Kaufman and Fonseca 2014). In comparison to co-occurring species, larvae of *Oc. j. japonicus* have been observed to be more abundant in containers with lower mean water temperatures. Another observation was the negative correlation between the presence of *Oc. j. japonicus* larvae and temperature (Gray et al. 2005; Grim et al. 2007; Kaufman and Fonseca 2014). Compared with other container-dwelling species, *Oc. j. japonicus* has longer active periods in its native as well as in its expanded distribution range. For instance, it starts to hatch in some habitats at temperatures which are typically associated with spring-snow pool *Aedes/Ochlerotatus* (Thielman and Hunter 2006; Burger and Davis 2008; Kaufman and Fonseca 2014). Compared to the temperature range in which *Oc. j. japonicus* has been recorded, the area of this study in Germany only covers a small part. Temperature is thus considered not to be a limiting factor in Germany. We suppose that the current distribution of *Oc. j. japonicus* in Germany is still mainly affected by dispersal and population dynamic processes. The pattern of the occurrence records in North Rhine-Westphalia that seem to follow the Rhine can be considered as a further hint that dispersal played still a major role considering the current distribution of *Oc. j. japonicus* in Germany.

After the first detection of *Oc. j. japonicus* in southern Baden Württemberg in the year 2008, a second population was found about 80 km north of the first site in 2010 (Schneider 2011). For the southern population, Huber et al. (2012) described a decrease in the distribution, which may have resulted from the dry spring in the year 2011. The northern population, which already occupied an area of about 4000 km² in 2011, has shown much higher larval densities than the southern population. This was explained by the more suitable climatic conditions (Huber et al. 2012). This is slightly contradictory to our modeled distribution, which indicates a rather low occurrence probability around the Stuttgart area, when compared to the south. Anyway, it is possible that important, but still unknown, factors which may influence the invasion of an area have not been considered. Also, when dealing with human-caused introductions, species may also settle in suitable, although not perfect areas.

Both the western population in North Rhine-Westphalia as well as the one in Lower Saxony appear to be attributed to

bigger streaming waters (Fig. 1a). In the West, the species seems to spread along the Rhine, in Lower Saxony along the Midland canal and Weser. Regarding the latter population, it has been speculated in the past that it is the younger one, because it is not as dense as that in North Rhine-Westphalia (Kampen and Werner 2014). This might be true, but also, the possibility of less suitable conditions exists with respect to the fact that breeding places have not yet been considered. In our model, there is one suitable area close to the Lower Saxony population, but the population itself is found in an area with lower probability. Werner and Kampen (2013) mentioned the concentration of the larval-positive cemeteries where they found larvae of the species in Lower Saxony along the motorways A2 and A7. This kind of human-induced dispersion has to be considered, but transport of suitable containers within Germany and between European countries is more restricted than within the USA as well as in US–Canadian transports (Buehler 2010; Kaufman and Fonseca 2014). Nevertheless, especially, the role of bigger streaming waters in the dispersion of *Oc. j. japonicus* has to be investigated very precisely in the future. Although numerous rivers and creeks occur in the Black Forest, these may not be the main reason for the occurrence of the new species, as most of these streams are too small for shipping. It is possible that the species finds enough rock pools along these running waters, which can be also found in higher numbers in the granite formations in the Black Forest. The opposite is true when looking on basalt and tuffs, which are common in the Westerwald.

Between the years 2011 and 2012, the situation changed a little bit as the population densities increased dramatically from 54 to 124 municipalities in Baden-Wuerttemberg (Huber et al. 2014). Although surprising with respect to the extent, the area in which this increase took place corresponds with the modeled occurrence probability in this study. The pattern of the modeled occurrence surprises only for the first moment because of the altitude of the sites and the colder weather conditions. Temperature, however, does not seem to be a limiting factor to *Oc. j. japonicus*. Similarly, in northern USA states, *Oc. j. japonicus* has spread widely and has risen to pest levels, as these regions were too cold for other mosquito species, e.g., *Culex pipiens* (Zielke et al., 2014). In such regions, the species seems to occupy an ecological niche, which is avoided by most other Culicidae. According to our model, this mountain range is outside the range of suitable habitats for *Oc. j. japonicus* when considering climatic conditions. Additionally, the native rock of basalt and tuffs may not offer the proper conditions to form water-storing rock pools. So, the climate as well as the native rock may serve as natural barriers of distribution to the east. With alternative breeding sites, for example, thrown away old tires, these barriers could have been overcome. The Rothaar Mountains are a possible natural barrier in the northeast. These consist mainly of slate. Here, the ground cannot store water in bigger quantities and

numerous small streaming waters can be found, but small semi-permanent water bodies are rare. For the future, the role of human-induced dispersion via highways as well as the reason for a possible dispersion along big streaming waters has to be investigated to understand the invasion biology of *Oc. j. japonicus* completely.

Conclusions

The present modeling results show that an area in Germany, which reaches beyond the current distribution, has good conditions for an establishment of the species. The area with modeled suitable conditions and thus probable for establishment should be monitored more intensively in the future. In this context, it is important to look for possible dispersal routes as well as natural barriers. Projecting the potential distribution of *Oc. j. japonicus* in Germany is essential for human and animal health, as this species can act as vector for a variety of diseases in the laboratory. Colonies in Japan and the USA are competent for the Japanese encephalitis virus (Takashima and Rosen 1989) and West Nile Virus (Turell et al. 2001). Furthermore, a European colony was found to be a competent vector for Chikungunya virus and dengue virus (Schaffner et al. 2011).

Acknowledgments This research was funded by the ERA-Net BiodivERsA, with the national funders German Research Foundation (DFG KL 2087/6-1), Austrian Science Fund (FWF I-1437), and The French National Research Agency (ANR-13-EBID-0007-01), part of the 2013 BiodivERsA call for research proposals, by the research funding program “LOEWE—Landes-Offensive zur Entwicklung Wissenschaftlich-ökonomischer Exzellenz” of Hesse’s Ministry of Higher Education, Research, and the Arts, and by the Senate Competition Committee grant (SAW-2014-SGN-3, SAW-2011-BNI-3) of the Leibniz Association.

References

- Andreadis TG, Anderson JF, Munstermann LE, Wolfe RJ, Florin DA (2001) Discovery, distribution, and abundance of the newly introduced mosquito *Ochlerotatus japonicus* (Diptera: Culicidae) in Connecticut, USA. *J Med Entomol* 38:774–779
- Apperson CS, Hassan HK, Harrison BA, Savage HM, Aspen SE, Farajollahi A, Crans W, Daniels TJ, Falco RC, Benedict M, Anderson M, McMillen L, Unnasch TR (2004) Host feeding patterns of established and potential mosquito vectors of West Nile virus in the Eastern United States. *Vector Borne Zoonotic Dis* 4:71–82
- Becker N, Huber K, Pluskota B, Kaiser A (2011) *Ochlerotatus japonicus japonicus*—a newly established neozoon in Germany and a revised list of the German mosquito fauna. *Eur Mosq Bull* 29:88–102
- Bevins SN (2007) Establishment and abundance of a recently introduced mosquito species *Ochlerotatus japonicus* (Diptera: Culicidae) in the southern Appalachians, USA. *J Med Entomol* 44:945–52

- Buehler R (2010) Transport policies, automobile use, and sustainable transport: a comparison of Germany and the United States. *J Plan Educ Res* 30:76–93
- Burger JF, Davis H (2008) Discovery of *Ochlerotatus japonicus japonicus* (Theobald) (Diptera: Culicidae) in southern New Hampshire, USA and its subsequent increase in abundance in used tire casings. *Entomol News* 119:439–44
- Elith J, Leathwick JR (2009) Species distribution models: ecological explanation and prediction across space and time. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 40:677–697. doi:10.1146/annurev.ecolsys.110308.120159
- Elith J, Graham CH, Anderson RP, Dudík M, Ferrier S, Guisan A, Hijmans RJ, Huettmann F, Leathwick JR, Lehmann A, Li J, Lohmann LG, Loiselle BA, Manion G, Moritz C, Nakamura M, Nakazawa Y, Overton JCM, Peterson AT, Phillips SJ, Richardson K, Scachetti-Pereira R, Schapire RE, Soberón J, Williams S, Wisz MS, Zimmermann NE (2006) Novel methods improve prediction of species' distributions from occurrence data. *Ecography* 29:129–151. doi:10.1111/j.2006.0906-7590.04596.x
- Gillson L, Dawson TP, Jack S, McGeoch MA (2013) Accommodating climate change contingencies in conservation strategy. *Trends Ecol Evol* 28:135–142. doi:10.1016/j.tree.2012.10.008
- Gray EW, Harrison BA, Womack ML, Kerce J, Neely CJ, Noblet R (2005) *Ochlerotatus japonicus japonicus* (Theobald) in Georgia and North Carolina. *J Am Mosq Control Assoc* 21:144–46
- Grim DC, Jackson BT, Paulson SL (2007) Abundance and bionomics of *Ochlerotatus j. japonicus* in two counties in southwestern Virginia. *J Am Mosq Control Assoc* 23:259–63
- Guisan A, Thuiller W (2005) Predicting species distribution: offering more than simple habitat models. *Ecol Lett* 8:993–1009
- Guisan A, Zimmermann NE (2000) Predictive habitat distribution models in ecology. *Ecol Model* 135:147–186
- Gutsevich AV, Monchadskii S, Shtakel'berg AA (1974) Fauna SSSR, Diptera Vol. II, No. 4 Family Culicidae. Leningrad Akad Nauka SSSR Zool Inst N S No. 100, English translation: Israel Program for Scientific Translations, pp 384
- Hijmans RJ, Graham CH (2006) The ability of climate envelope models to predict the effect of climate change on species distributions. *Global Change Biol* 12:2272–2281. doi:10.1111/j.1365-2486.2006.01256.x
- Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jones PG, Jarvis A (2005) Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *Int J Climatol* 25:1965–1978. doi:10.1002/joc.1276
- Huber K, Pluskota B, Jöst A, Hoffmann K, Becker N (2012) Status of the invasive species *Aedes japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae) in southwest Germany in 2011. *J Vector Ecol* 37:462–465
- Huber K, Schuldt K, Rudolf M, Marklewitz M, Fonseca DM, Kaufmann C, Tsuda Y, Junglen S, Krüger A, Becker N, Tannich E, Becker SC (2014) Distribution and genetic structure of *Aedes japonicus japonicus* populations (Diptera: Culicidae) in Germany. *Parasitol Res* 113:3201–3210. doi:10.1007/s00436-014-4000-z
- Ibañez-Justicia A, Kampen H, Braks M, Schaffner F, Steeghs M, Werner D, Zielke D, Hartog W, Brooks M, Dik M, van de Vossen B, Scholte E-J (2014) First report of established population of *Aedes japonicus japonicus* (Theobald, 1901) (Diptera, Culicidae) in the Netherlands. *J Eur Mosq Contr Assoc* 32:9–13
- Ivanova NV, de Waard J, Hebert PDN (2006) An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high quality DNA. *Mol Ecol Notes* 6:998–1002. doi:10.1111/j.1471-8286.2006.01428.x
- Juliano SA, Lounibos LP, O'Meara GF (2004) A field test for competitive effects of *Aedes albopictus* on *Aedes aegypti* in south Florida: differences between sites of coexistence and exclusion? *Oecologia* 139:583–593
- Kampen H, Werner D (2014) Out of the bush: the Asian bush Mosquito *Aedes japonicus japonicus* (Theobald, 1901) (Diptera, Culicidae) becomes invasive. *Parasit Vectors* 7:59
- Kampen H, Zielke D, Werner D (2012) A new focus of *Aedes japonicus japonicus* (Theobald, 1901) (Diptera, Culicidae) distribution in Western Germany: rapid spread or a further introduction event? *Parasit Vectors* 5:284. doi:10.1186/1756-3305-5-284
- Kaufman MG, Fonseca DM (2014) Invasion Biology of *Aedes japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae). *Annu Rev Entomol* 59:31–49
- Kumar S, Stohlgren TJ (2009) Maxent modeling for predicting suitable habitat for threatened and endangered tree *Canacomyrica monticola* in New Caledonia. *J Ecol Nat Environ* 1:94–98
- Kumar NP, Rajavel AR, Natarajan R, Jambulingam P (2007) DNA barcodes can distinguish species of Indian mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 44:1–7
- Laird M, Calder L, Thornton RC, Syme R, Holder PW, Mogi M (1994) Japanese *Aedes albopictus* among four mosquito species reaching New Zealand in used tires. *J Am Mosq Control Assoc* 10:14–23
- Lobo JM, Jiménez-Valverde A, Hortal J (2010) The uncertain nature of absences and their importance in species distribution modelling. *Ecography* 33:103–114. doi:10.1111/j.1600-0587.2009.06039.x
- Mack RN, Simberloff D, Lonsdale WM, Evans H, Clout M, Bazzaz FA (2000) Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences, and control. *Ecol Appl* 10:689–710
- Merow C, Smith MJ, Silander JA (2013) A practical guide to MaxEnt for modeling species' distributions: what it does, and why inputs and settings matter. *Ecography* 36:1058–1069. doi:10.1111/j.1600-0587.2013.07872.x
- Pearson RG (2010) Species' distribution modeling for conservation educators and practitioners. *Lessons in Conservation* 3:54–89
- Peyton EL, Campbell SR, Candeletti TM, Romanowski M, Crans WJ (1999) *Aedes (Finlaya) japonicus japonicus* (Theobald), a new introduction into the United States. *J Am Mosq Contr Assoc* 15:238–241
- Phillips SJ, Dudík M (2008) Modeling of species distributions with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation. *Ecography* 31:161–175. doi:10.1111/j.0906-7590.2008.5203.x
- Phillips SJ, Dudík M, Schapire RE (2004) A maximum entropy approach to species distribution modeling. *Proceedings of the Twenty-First International Conference on Machine Learning*, 655–662
- Reiss H, Cunze S, Koenig K, Neumann H, Kroencke I (2011) Species distribution modelling of marine benthos: a North Sea case study. *Mar Ecol Prog Ser* 442:71–86
- Sardelis MR, Dohm DJ, Pagac B, Andre RG, Turell MJ (2002a) Experimental transmission of eastern equine encephalitis virus by *Ochlerotatus j. japonicus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 39:480–484
- Sardelis MR, Turell MJ, Andre RG (2002b) Laboratory transmission of La Crosse virus by *Ochlerotatus j. japonicus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 39:635–639
- Sardelis MR, Turell MJ, Andre RG (2003) Experimental transmission of St. Louis encephalitis virus by *Ochlerotatus j. japonicus*. *J Am Mosq Control Assoc* 19:159–162
- Savignac R, Back C, Bourassa J (2002) Biological notes on *Ochlerotatus japonicus* & other mosquito species new to Quebec [abstract]. In The abstract book of a joint meeting: 68th Annual Meeting of the American Mosquito Control Association and the West Central Mosquito & Vector Control Association. Eatontown, NJ, American Mosquito Control Association. 21–22
- Schaffner FL, Chouin S, Guilloteau J (2003) First record of *Ochlerotatus (Finlaya) japonicus japonicus* (Theobald, 1901) in metropolitan France. *J Am Mosq Control Assoc* 19:1–5
- Schaffner F, Kaufman C, Hegglin D, Mathis A (2009) The invasive mosquito *Aedes japonicus* in Central Europe. *Med Vet Entomol* 23:448–451
- Schaffner F, Kaufmann C, Failloux AB, Mathis A (2011) Vector competence of *Aedes japonicus* for chikungunya and dengue viruses. *Eur Mosq Bull* 29:141–142
- Schneider K (2011) Breeding of *Ochlerotatus japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae) 80 km north of its known range in southern Germany. *Eur Mosq Bull* 29:129–132

- Seidel B, Duh D, Nowotny N, Allerberger F (2012) Erstnachweis der Stechmücken *Aedes (Ochlerotatus) japonicus japonicus* (Theobald, 1901) in Österreich und Slowenien in 2011 und für *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1895) in Österreich 2012 (Diptera: Culicidae). *Entomol Zeitschrift* 5:223–226
- Stabach JA, Laporte N, Olupot W (2009) Modeling habitat suitability for Grey Crowned-cranes (*Baelearica regulorum gibbericeps*) throughout Uganda. *Int J Biodivers Conserv* 1:177–186
- Takashima I, Rosen L (1989) Horizontal and vertical transmission of Japanese encephalitis virus by *Aedes japonicus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 26:454–458
- Tanaka K, Mizusawa K, Saugstad ES (1979) A revision of the adult and larval mosquitoes of Japan (including the Ryukyu Archipelago and the Ogasawara islands) and Korea (Diptera: Culicidae). *Contrib of the Am Entomol Inst* 16:1–987
- Thielman A, Hunter FF (2006) Establishment of *Ochlerotatus japonicus* (Diptera: Culicidae) in Ontario, Canada. *J Med Entomol* 43:138–42
- Trisurat Y, Alkemade R, Arets E (2009) Projecting forest tree distributions and adaptation to climate change in northern Thailand. *J Ecol Nat Environ* 1:55–63
- Turell MJ, O'Guinn ML, Dohm DJ, Jones JW (2001) Vector competence of North American mosquitoes (Diptera: Culicidae) for West Nile virus. *J Med Entomol* 38:130–134
- Turell MJ, Dohm DJ, Sardelis MR, O'Guinn ML, Andreadis TG, Blow JA (2005) An update on the potential of North American mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit West Nile Virus. *J Med Entomol* 42: 57–62
- Václavík T, Meentemeyer RK (2012) Equilibrium or not? Modelling potential distribution of invasive species in different stages of invasion. *Divers Distrib* 18:73–83. doi:10.1111/j.1472-4642.2011.00854.x
- Versteirt V, Schaffner F, Garros C, Dekoninck W, Coosemans M, Van Bortel W (2009) Introduction and establishment of the exotic mosquito species *Aedes japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae) in Belgium. *J Med Entomol* 46:1464–1467
- Werblow A, Bolius S, Dorresteijn AWC, Melaun C, Klimpel S (2013) Diversity of *Culex torrentium* Martini, 1925—a potential vector of arboviruses and filarial in Europe. *Parasitol Res* 112:2495–2501
- Werner D, Kampen H (2013) The further spread of *Aedes japonicus japonicus* (Diptera, Culicidae) towards northern Germany. *Parasitol Res* 112:3665–3668
- Wiens JA, Stralberg D, Jongsomjit D, Howell CA, Snyder MA (2009) Colloquium papers: niches, models, and climate change: assessing the assumptions and uncertainties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(2): 19729–19736. doi:10.1073/pnas.0901639106
- Zielke DE, Werner D, Schaffner F, Kampen H, Fonseca DM (2014) Unexpected patterns of admixture in German populations of *Aedes japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae) underscore the importance of human intervention. *PLoS One*. doi:10.1371/journal.pone.0099093

Medical and Veterinary Entomology

Preview

From: mary.cameron@lshtm.ac.uk

Antje.Werblow@senckenberg.de, flechl_eva@gmx.net, Sven.Klimpel@senckenberg.de, carina.zittra@vetmeduni.ac.at,

To: karin.lebl@vetmeduni.ac.at, katrin.kieser@gmail.com, a.laciny@gmx.at, katja.silbermayr@vetmeduni.ac.at,
christian.melaun@senckenberg.de, hans-peter.fuehrer@vetmeduni.ac.at

CC:

Subject: Medical and Veterinary Entomology - Decision on Manuscript ID MVE-14-1058.R1 [email ref: DL-RW-1-a]

Body: 17-Feb-2015

Dear Dr. Fuehrer:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Direct PCR of indigenous and invasive mosquito species: a time and cost effective technique of mosquito barcoding." in its current form for publication in Medical and Veterinary Entomology. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

Please note although the manuscript is accepted the files will now be checked to ensure that everything is ready for publication, and you may be contacted if final versions of files for publication are required.

Your article cannot be published until the publisher has received the appropriate signed license agreement. Within the next few days the corresponding author will receive an email from Wiley's Author Services system which will ask them to log in and will present them with the appropriate license for completion.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of Medical and Veterinary Entomology, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,
Dr. Mary Cameron
Editor in Chief, Medical and Veterinary Entomology
mary.cameron@lshtm.ac.uk

Editor-in-Chief Comments to Author:

Reviewer(s)' Comments to Author:

Date Sent: 17-Feb-2015

1 **Direct PCR of indigenous and invasive mosquito species: a time and cost effective**
2 **technique of mosquito barcoding.**

3

4 Antje Werblow¹, Eva Flechl², Sven Klimpel¹, Carina Zित्रा², Karin Lebl³, Katrin Kieser², Alice
5 Laciny², Katja Silbermayr², Christian Melaun¹, Hans-Peter Fuehrer²

6

7 ¹ Goethe University (GU), Institute for Ecology, Evolution and Diversity; Senckenberg
8 Biodiversity and Climate Research Centre (BiK-F); Senckenberg Gesellschaft für
9 Naturforschung (SGN), Max-von-Laue-Strasse 13, 60438 Frankfurt am Main, Germany

10

11 ² Institute of Parasitology, Department of Pathobiology, University of Veterinary Medicine
12 Vienna, Veterinaerplatz 1, 1210 Vienna, Austria

13

14 ³ Institute for Veterinary Public Health, University of Veterinary Medicine Vienna,
15 Veterinaerplatz 1, 1210 Vienna, Austria

16

17 Running head: Mosquito-Barcoding using direct PCR

18

19 |

20 **Abstract**

21 Millions of people die every year as a result of pathogens transmitted by mosquitoes.
22 However, the morphological identification of mosquito species can be difficult even to
23 experts. Morphologically indistinguishable species like members of the *Anopheles*
24 *maculipennis*-complex and possible hybrids such as *Culex pipiens pipiens/Cx. pipiens*
25 *molestus* present a major problem. In addition, the detection and discrimination of new
26 introduced species can be challenging, particularly to experts without previous experience.
27 Because of their medical importance, a clear identification of all relevant mosquito species is
28 essential. Using the direct PCR method described here, DNA amplification without prior
29 DNA-extraction is possible and thus species identification after sequencing can be achieved.
30 Different amounts of tissue (leg, head, larvae or adult) as well as different storage conditions
31 (dry, ethanol, -20°C and -80°C) and storage times were successfully applied and showed
32 positive results after amplification and gel-electrophoresis. Overall, 28 different mosquito
33 species, indigenous as well as non-indigenous, were analysed using a gene fragment of the
34 *cox1* gene for species differentiation and identification by sequencing this 658bp fragment.
35 Compared to standard PCR, this method is time and cost effective and could thus improve
36 existing surveillance and control programs.

37

38 Correspondence: Hans-Peter Fuehrer, Institute of Parasitology, Department of Pathobiology,
39 University of Veterinary Medicine Vienna, Veterinärplatz 1, 1210 Vienna, Austria, Tel.:
40 +43125077-2205; Fax: +43125077-2290; E-mail: hans-peter.fuehrer@vetmeduni.ac.at

41

42 **Keywords**

43 Mosquitoes, molecular identification, molecular differentiation, direct PCR, Barcoding,
44 vector-borne diseases

45

46 **Introduction**

47 Every year, one billion people worldwide get infected by vector-borne diseases such as
48 malaria, Dengue fever, Yellow fever or West Nile fever (Hill *et al.*, 2005; WHO, 2014) and
49 more than 1.3 million people die as a result of the disease implications, with mosquitoes
50 (Diptera: Culicidae) being the most important vectors (Beerntsen *et al.*, 2000). Globally,
51 more than 3,500 mosquito species are described. Of those about 50-51 species occur in

52 Germany and 43 species are recorded for Austria (Becker *et al.*, 2014; Zittra & Waringer
53 2013). In addition to *Culiseta longiareolata*, another species is now documented and
54 reported to be newly introduced to Austria (Zittra *et al.* 2014). Climate change and even a
55 higher degree of globalization, lead to the introduction and spread of species to new regions,
56 countries or even continents (Keller *et al.*, 2011). In recent years, the spread of invasive non-
57 indigenous species like *Hulecoeteomyia japonica japonica* (syn. *Ochlerotatus japonicus*
58 *japonicus*) (Theobald 1901) or *Stegomyia albopicta* (syn. *Aedes albopictus*) (Skuse 1895) as
59 well as of *Stegomyia aegypti* (syn. *Aedes aegypti*) (Linnaeus 1762) to European countries has
60 increased dramatically (Almeida *et al.*, 2007; ECDC, 2014). All the aforementioned species
61 are known to be vectors of a variety of disease agents in the wild (CDC 2012; Schaffner *et al.*,
62 2012) and have been proven to possess vector abilities under laboratory conditions. In
63 particular, *St. albopicta* is known as a vector for 22 arboviruses (Petric *et al.*, 2014). Besides
64 non-indigenous species, native species in Austria and Germany can also act as competent
65 vectors for e.g. Sindbis-virus, Ockelbo-virus, Usutu-virus, Batai-virus or malaria and West-
66 Nile virus (Avšič-Županc, 2013; Jöst *et al.*, 2010; Jöst *et al.*, 2011a, 2011b; Ventim *et al.*,
67 2012). Species like *Culex pipiens*, Linnaeus 1758, *Culex modestus*, Ficalbi 1889 or
68 *Coquillettidia richiardii*, (Ficalbi 1889) are considered as the major vectors of West-Nile virus
69 in European outbreaks (Votýpka *et al.*, 2008). Because of their major impact on health as
70 well as their ecological and socio-economical relevance, a clear identification of the different
71 species is essential. However, this is not always possible as morphological identification keys
72 often include only certain developmental stages or characteristics that are easily lost during
73 collection or transportation like scales and setae. Additionally, morphological identification
74 can be challenging due to sibling species complexes, which are often morphologically
75 indistinguishable but are vectors for different pathogens (Kumar *et al.*, 2007, Becker *et al.*
76 2010). For instance, within the *Anopheles maculipennis* s.l. complex, which consists of more
77 than a dozen different species worldwide and eight for Europe, the members are indicated
78 as vectors for different *Plasmodium* species causing malaria in humans. The only
79 distinguishable characteristic is the pigmentation of the egg chorion of the different species.
80 Members of the *Culex pipiens* complex are distinguishable by the structure of the male
81 genitalia, whereas females of *Culex pipiens* and *Culex torrentium*, Martini 1925 are difficult
82 to distinguish by morphometric wing characters but the named characteristics require a lot
83 of experience to identify (Becker *et al.* 2010, Börstler *et al.* 2014). To enable an unequivocal

84 classification, several PCR-based assays have been developed using different molecular
85 genetic markers e.g., *ace-2* or *ITS2* (Smith and Fonseca, 2004; Vinogradova *et al.*, 2007).
86 Rudolf *et al.* (2013) established a multiplex real-time PCR for simultaneous detection and
87 differentiation of *Cx. pipiens* biotypes, *Cx. torrentium* and possible hybrids. In all cases a
88 time-consuming and cost-intensive DNA extraction is necessary. Thus, in this study we
89 introduce a direct PCR technique that allows PCR amplification as well as subsequent DNA-
90 sequencing without a prior DNA extraction for the identification of different mosquito
91 species (Figure 1). The relevant tissue can be used “directly” as template for amplification of
92 the target gene or gene fragment. Usually, DNA-extraction comes along with an overnight
93 lysis of the tissue samples and an additional extraction step afterwards to get the template
94 DNA for amplification. Using direct-PCR, the time required can be reduced to a few minutes.
95 The relevant tissue can be given to the prepared mastermix and amplified in a conventional
96 PCR-cycler. The establishment of cost-efficient and time effective methods for a clear
97 identification of the distinct mosquito species is crucial for e.g. surveillance programs and
98 the fast identification of new and invasive species as well as morphological similar native
99 species. This method was previously successfully performed to identify *Dirofilaria* species in
100 mosquitoes (Silbermayr *et al.*, 2013) and for malaria diagnosis (Fuehrer *et al.*, 2011). In
101 addition, direct PCR was carried out with different polymerases and primers by Wong *et al.*
102 (2014) for the identification of nonbiting midges and other arthropods including mosquitoes.
103 In this study we amplified a variety of native and invasive mosquito species using direct PCR
104 technique. We also analysed different amounts and storage conditions of tissue.

105

106 **Materials and Methods**

107 The analyses were carried out with 62 specimens from 28 different mosquito species of ten
108 genera. The method was applied to mosquitoes which have been stored either at -20°C, -
109 80°C or room temperature; preserved in 70% ethanol or as dry material stored between 1
110 month and 3 years. We also used different amounts of tissue to test the minimum amount
111 of tissue to produce positive PCR results in the gel-electrophoresis. Barcoding with direct
112 PCR was carried out with the Phusion® Blood direct PCR Kit (Thermo Fisher Scientific
113 Waltham, MA, USA). The reaction mixture (50µl) consisted of 25 µl direct PCR buffer, 1 µM
114 of each primer, 1 U Phusion® II DNA Polymerase, Millipore water was added to a total
115 volume of 50 µl as well as different tissue samples (see table 1, not homogenized) as DNA

116 template. The Phusion high-fidelity polymerase provided in the used kit has a 50-fold lower
117 error rate than commercial standard *Taq*-polymerases and is extremely high resistant to
118 inhibitors found in samples that are not extracted or purified before amplification (see
119 Thermo Scientific #F-547S and New England Biolabs #M0530S). The amplification of a
120 cytochrome c oxidase subunit 1 (*cox1*) gene fragment was performed in a thermocycler
121 (Eppendorf, Germany) using BC-Kumar forward/reverse primers (Kumar *et al.*, 2007). PCR
122 cycling parameters were the following: 1 cycle of 94°C, 2 min; 40 cycles of 94°C, 60 sec; 59°C,
123 60 sec and 72°C, 60 sec followed by terminal extension of 72°C, 5 min and a final ramping to
124 8°C. Quality and yield of DNA was analysed by Midori Green (Nippon Genetic EUROPE
125 GmbH) staining and agarose gel-electrophoresis. Positive samples were purified using the
126 peqGOLD Cycle-Pure Kit (Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen, Germany) and Illustra™
127 ExoStar™ 1-Step (GE Healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom). The subsequent Sanger
128 sequencing was done by SeqLab (SeqLab-Sequence Laboratories Göttingen GmbH, Göttingen,
129 Germany) and Microsynth (Microsynth AG, Balgach, Switzerland) using the BC-Kumar
130 forward and/or reverse primer. Each sequence was edited using BioEdit (Hall 1999) and
131 compared with sequences deposit in GenBank using the BLAST algorithm (Altschul *et al.*
132 1997).

133

134 **Results**

135 The direct PCR method was successfully performed for 55 individuals belonging to 27
136 different mosquito species indigenous and non-indigenous in Austria and Germany. Seven
137 samples of two species showed no positive result after amplification and gel-electrophoresis
138 (Table 1). In almost all cases, one leg (n=44) as DNA template was sufficient to generate PCR
139 products of an expected size of ≈700 bp. Furthermore, tissue samples like head (n=2), larva
140 (n=2) or imago (n=7) were successfully used as templates. Tissue stored under different
141 conditions (-20°C, -80°C, 70% ethanol or dry) also revealed positive results. The storage time
142 of the analysed specimens varied between one month and 3 years and does not seem to
143 have significant influence. Although, dried legs of *Aedes cinereus* Theobald, 1901 and
144 *Anopheles algeriensis* Theobald, 1903 stored for 18 months at room temperature did not
145 yield positive PCR results. Thus, the samples could not be sequenced. The genera
146 *Ochlerotatus* (n_{species}=9) and *Culex* (n_{species}=6) showed the best amplification results when
147 applying this method. To verify the correct amplification of the *cox1* gene fragments by

148 direct PCR and to subsequently differentiate the analysed species, most of the positive
149 samples were purified and sequenced. The obtained data are deposited at GenBank with
150 accession numbers KM243936-KM243960 (Germany) and KM280573-KM280597 (Austria)
151 (Table 1). Positive individuals of *Anopheles gambiae* s.s Giles, 1902, *Ochlerotatus cantans*
152 (Meigen, 1818) and *Ochlerotatus flavescens* (Müller, 1764) were not sequenced (Table 1).

153

154 **Discussion**

155 Since a variety of non-native mosquito species can be considered as competent vectors for
156 endemic but also introduced or emerging pathogens, their introduction is of increasing
157 public and political concern in numerous countries, like Austria and Germany (Avšič-Županc,
158 2013; Becker *et al.*, 2014). Not only introduced but also indigenous mosquito species like
159 members of the *Culex pipiens*- or the *Anopheles maculipennis*-complex, are able to transmit
160 a broad range of pathogens, and are hard to distinguish morphologically (Farajollahi *et al.*,
161 2011; Laboudi *et al.*, 2014). Nevertheless, a clear identification of mosquitoes is essential to
162 obtain information in regard to the distribution and potential risk estimation of diseases. The
163 proposed direct PCR method of this study offers a time and cost effective amplification
164 technique for mosquito specimen analysis. Based on the PCR results, a subsequent
165 sequencing and thus the identification of different mosquito species is possible. The biggest
166 advantage of this method compared to standard PCR techniques for species identification is
167 the amplification of DNA from tissue without a prior DNA extraction; the not homogenized
168 tissue is just simply mixed with PCR reagents and transferred to a thermal cycler for
169 amplification. Depending on the standard DNA extraction and amplification techniques used
170 in various labs, direct PCR can reduce the time to amplify target genes for species
171 identification. In the present study, sequencing of the samples was carried out after 5 hours
172 instead of one day, because of the elimination of an overnight lysis. Additionally, the method
173 was not directly affected by the specimens' morphological state of preservation. Frequently,
174 important morphological characters got lost during sampling, transportation or storage.
175 Without these characters it is extremely difficult to identify the different mosquito species.
176 One of the important parameters to produce positive PCR results is the amount of tissue
177 used, which can lead to PCR failures during the initial heating step (Wong *et al.*, 2014). Wong
178 *et al.* (2014) used two to three legs of each individual to get a positive amplification result. In
179 this study, a head or one leg was sufficient to produce positive results and important

180 structures for morphological reference collections can be preserved. The direct use of tissue
181 is a limitation of this method, as further analyses with the produced PCR-product are not
182 possible (e.g. amplification of different markers) and no extracted DNA for storage is
183 available. However, this method is useful for rapid species identification especially for new
184 vector species based on the fast amplification of the target gene. If further analyses are
185 needed, DNA extraction of the remaining tissue is still possible. Moreover, RNA-extraction
186 from the remaining tissue is possible which is important as many species are carriers of
187 disease agents like Flaviviruses (e.g. West-Nile virus), Alphaviruses (e.g. Sindbis-virus) or
188 Orthobunyaviruses (e.g. Batai-virus). In order to test how much tissue can be introduced into
189 direct PCR, whole larvae or adults were successfully used as templates although Wong *et al.*
190 (2014) mentioned that abdominal tissue should be avoided as too many inhibitors from
191 intestines may be present. In addition to the inquiry of different tissue amounts, variable
192 storage conditions and times were examined. DNA amplification from tissue stored at -20°C
193 (n=22), -80°C (n=3) and in 70% ethanol (n=13) is easy to process. However, amplification
194 from dried specimens (n=24) may be difficult. In total, 22 of 24 used dry samples were
195 stored for 18 months. Seven of these samples belonging to the species *Aedes cinereus* (n=3)
196 and *Anopheles algeriensis* (n=4) gave no positive PCR result and therefore could not be
197 sequenced. In order to avoid a failure of the direct PCR, we analysed legs of the two species
198 using conventional DNA extraction and amplification methods, which showed also negative
199 results. Additionally, direct PCR as well as a normal PCR with prior extracted DNA from whole
200 adults of both species revealed positive bands after gel-electrophoresis. The negative direct
201 PCR results using legs as templates could be attributed to the conservation of the specimens.
202 For the prevention of collection pests, dry preparations have often been treated with the
203 insecticide dichlorvos, which affects the DNA of insects negatively (Espeland *et al.*, 2010).
204 Other parameters that may influence the amplification are the used primer pairs as well as
205 the used polymerase. First, the standard barcoding primers by Folmer *et al.* (1994) which
206 were also successfully used by Wong *et al.* (2014) were used. However, the amplification
207 results showed great variances and a BLAST search revealed that the primers, due to their
208 low specificity, are unsuited for DNA barcoding of mosquitoes using direct PCR. To overcome
209 this issue, Kumar *et al.* (2007) designed the primer set which was then applied in this study.
210 The polymerase used in this study has an extremely high resistance to inhibitors and shows a
211 much lower error rate than standard *Taq*-polymerases. The cost-effectivity of this technique

212 for a normal sample work-off (single samples, not pooled) per reaction can be shown by the
213 price per sample analysed. Obviously, saving money depends on the currently used
214 techniques, kits or work questions in different labs, however, in the present study, using the
215 Phusion® Blood Direct PCR Kit, the analysis of one sample was estimated with 1.83 €. In
216 contrast, a conventional DNA-extraction and PCR costs about 3.36€/sample (extraction:
217 peqGOLD Tissue DNA Mini Kit (S-Line) – 2.05€/reaction and PCR: peqGOLD Hot Start Mix Y –
218 1.31€/reaction; both Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen, Germany).

219

220 **Conclusion**

221 Using direct PCR reveals a rapid method to amplify genes or gene fragments which can be
222 used for a clear identification of mosquito species after a subsequent sequencing reaction.
223 The method is ideal to analyse native and non-native mosquito species especially in case of
224 an uncertain morphological determination. Moreover, compared to standard DNA extraction
225 and amplification kits used, in the present study, direct PCR is much cheaper. Overall, saving
226 time is a benefit in modern laboratory work, especially in the identification of invasive
227 species, resulting in rapid monitoring and control in case of positive findings. Although, this
228 study is not the first one using direct PCR for the identification of mosquitoes, it presents the
229 results of different amounts of tissue as well as storage conditions and storage time of 29
230 different mosquito species.

231

232 **Acknowledgements**

233 We wish to thank Walpurga Wille-Piazzai and Barbara Eigner for their excellent technical
234 support and Dominik Berer for catching some of the Austrian mosquitoes.

235 This research was funded by the ERA-Net BiodivERsA, with the national funders FWF I-1437
236 and DFG BiodivERsA KL 2087/6-1 as part of the 2012-13 BiodivERsA call for research
237 proposals. This project was supported by the research funding programme “LOEWE –
238 Landes-Offensive zur Entwicklung Wissenschaftlich-ökonomischer Exzellenz” of Hesse's
239 Ministry of Higher Education, Research, and the Arts, by the SAW (Senate Competition
240 Committee) grant (SAW-2011-BNI-3; SAW-2014-SGN-3) of the Leibniz Association. The work
241 of Hans-Peter Fuehrer was done under the frame of EurNegVec COST Action TD1303.

242

243 |

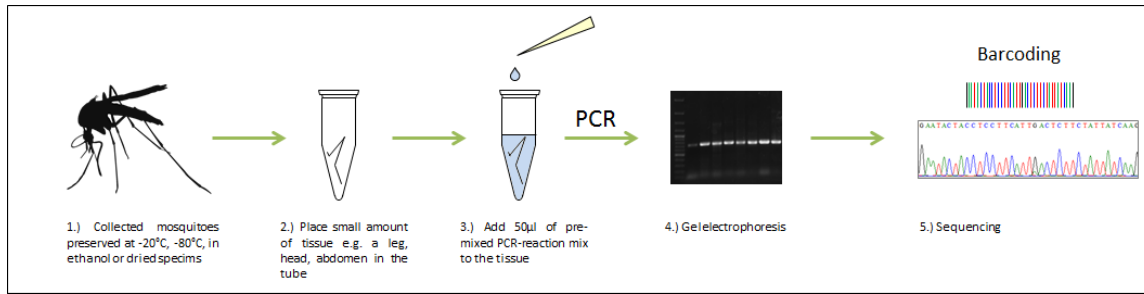
244 **References**

- 245 1. Almeida, A.P., Gonçalves, Y.M., Novo, M.T., Sousa, C.A., Melim, M. *et al.* (2007)
246 Vector monitoring of *Aedes aegypti* in the autonomous region of Madeira, Portugal.
247 *Eurosurveillance*, **12**, E071115.6.
- 248 2. Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z. *et al.* (1997) Gapped
249 BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search program. *Nucleic*
250 *Acids Research*, **25**, 3389-3402.
- 251 3. Avšič-Županc, T. (2013) Mosquito-borne diseases – a new threat to Europe? *Clinical*
252 *Microbiology and Infection*, **19**, 683-684.
- 253 4. Becker, N., Krüger, A., Kuhn, C., Plenge-Bönig, A., Thomas, S.M. *et al.* (2014)
254 Stechmücken als Überträger exotischer Krankheitserreger in Deutschland.
255 *Bundesgesundheitsblatt*, **57**, 531-540.
- 256 5. Beerntsen, B.T., James, A.A., Christensen, B.M. (2000) Genetics of mosquito vector
257 competence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **64**, 115-137.
- 258 6. Börstler, J., Lühken, R., Rudolf, M., Steinke, S., Melaun, C. *et al.* (2014) The use of
259 morphometric wing characters to discriminate female *Culex pipiens* and *Culex*
260 *torrentium*. *Journal of Vector Ecology*, **39**, 204-212.
- 261 7. Centers for Disease Control and Prevention (2012) *Dengue and the Aedes aegypti*
262 *mosquito*. <http://www.cdc.gov/dengue/resources/30jan2012/aegyptifactsheet.pdf>.
263 [Accessed 08 October 2014].
- 264 8. European Center for Disease Prevention and Control (2014) *Exotic mosquitoes:*
265 *Distribution maps*. [http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vectors/vector-](http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vectors/vector-maps/Pages/VBORNET_maps.aspx)
266 [maps/Pages/VBORNET_maps.aspx](http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vectors/vector-maps/Pages/VBORNET_maps.aspx) [Accessed 22 April 2014].
- 267 9. Farajollahi, A., Fonseca, D.M., Kramer, L.D., Marm Kilpatrick, A. (2011) “Bird-biting”
268 mosquitoes and human disease: a review of the role of the *Culex pipiens* complex
269 mosquitoes in epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution*, **11**, 1577-1585.
- 270 10. Fuehrer, H-P., Fally, M.A., Habler, V.E., Starzengruber, P., Swoboda, P. *et al.* (2011)
271 Novel nested direct PCR technique for Malaria diagnosis using filter paper samples.
272 *Journal of Clinical Microbiology*, **49**, 1628-1630.
- 273 11. Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and
274 analysis program for Windows 95/98/BT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, 95-98.

- 275 12. Hill, C.A., Kafatos, F.C., Stansfield, S.K., Collins, F.H. (2005) Arthropod-borne diseases:
276 vector control in the genomics era. *Nature Reviews Microbiology*, **3**, 262-268.
- 277 13. Jöst, H., Bialonski, A., Storch, V., Günther, S., Becker, N. et al. (2010) Isolation and
278 phylogenetic analysis of Sindbis viruses from mosquitoes in Germany. *Journal of*
279 *Clinical Microbiology*, **48**, 1900-1903.
- 280 14. Jöst, H., Bialonski, A., Maus, D., Sambri, V., Eiden, M. et al. (2011a) Isolation of Usutu
281 virus in Germany. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **85**, 551-
282 553.
- 283 15. Jöst, H., Bialonski, A., Schmetz, C., Günther, S., Becker, N. et al. (2011b) Isolation and
284 phylogenetic analysis of Batai virus, Germany. *The American Journal of Tropical*
285 *Medicine and Hygiene*, **84**, 241-243.
- 286 16. Keller, R.P., Geist, J., Jeschke, J.M., Kühn, I. (2011) Invasive species in Europe: ecology,
287 status, and policy. *Environmental Sciences Europe*, **23**, 23.
- 288 17. Kumar, N.P., Rajavel, A.R., Natarajan, R., Jambulingam, P. (2007) DNA barcodes can
289 distinguish species of Indian mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical*
290 *Entomology*, **44**, 1-7.
- 291 18. Laboudi, M., Sadak, A., Ouahabi, S., Boccolini, D., Faraj, C. (2014) Molecular
292 characterization of *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) in northern
293 Morocco. *Faunistic Entomology*, **67**, 37-42.
- 294 19. Petrić, D., Bellini, R., Scholte, E.-J., Rakotoarivony, L.M., Schaffner, F. (2014)
295 Monitoring population and environmental parameters of invasive mosquito species
296 in Europe. *Parasites and Vectors*, **7**, 187.
- 297 20. Rudolf, M., Czajka, C., Börstler, J., Melaun, C., Jöst, H. et al. (2013) First nationwide
298 surveillance of *Culex pipiens* complex and *Culex torrentium* mosquitoes
299 demonstrated the presence of *Culex pipiens* Biotype *pipiens/molestus* hybrids in
300 Germany. *PLoS ONE*, **8**, doi: 10.1371/journal.pone.0071832.
- 301 21. Schaffner, F., Thiéry, I., Kaufmann, C., Zettor, A., Lengeler, C. et al. (2012) *Anopheles*
302 *plumbeus* (Diptera: Culicidae) in Europe: a mere nuisance mosquito or potential
303 malaria vector? *Malaria Journal*, **11**, doi: 10.1186/1475-2875-11-383.
- 304 22. Silbermayr, K., Eigner, B., Duscher, G.G., Joachim, A., Fuehrer, H-P (2013) The
305 detection of different *Dirofilaria* species using direct PCR technique. *Parasitology*
306 *Research*, **113**, 513-517.

- 307 23. Smith, J.L., Fonseca, D.M. (2004) Rapid assays for identification of members of the
308 *Culex (Culex) pipiens* complex, their hybrids, and other sibling species (Diptera:
309 Culicidae). *The American Journal Tropical Medicine and Hygiene*, **70**, 339-345.
- 310 24. Vasuki, V., Subramanian, S., Hoti, S.L., Jambulingam, P. (2012) Use of a simple DNA
311 extraction method for high-throughput detection of filarial parasite *Wuchereria*
312 *bancrofti* in the vector mosquitoes. *Parasitology Research*, **111**, 2479-2481.
- 313 25. Ventim, R., Ramos, J.A., Osório, H., Lopes, R.J., Pérez-Tris, J. *et al.* (2012) Avian
314 malaria infections in western European mosquitoes. *Parasitology Research*, **111**, 637-
315 645.
- 316 26. Vinogradova, E.B., Shaikevich, E.V. (2007) Morphometric, physiological and molecular
317 characteristics of underground populations of the urban mosquito *Culex pipiens*
318 Linnaeus f. *molestus* Forskål (Diptera: Culicidae) from several areas of Russia.
319 *European Mosquito Bulletin*, **22**, 17-24.
- 320 27. Votýpka, J., Šeblová, V., Rádrová, J. (2008) Spread of the West Nile virus vector *Culex*
321 *modestus* and the potential malaria vector *Anopheles hyrcanus* in central Europe.
322 *Journal of Vector Ecology*, **33**, 269-277.
- 323 28. Wong, W.H., Tay, Y.C., Puniamoorthy, J., Balke, M., Cranston, P.S. *et al.* (2014) Direct
324 PCR optimization yields a rapid, cost effective, non-destructive and efficient method
325 for obtaining DNA barcodes without DNA extraction. *Molecular Ecology Resources*,
326 **14**, 1271-1280.
- 327 29. World Health Organisation (2014) A global brief on vector-borne diseases.
328 WHO_DCO_WHD_2014.eng.pdf [Accessed 10 October 2014].
- 329 30. Zittra, C., Waringer, J. (2013) Species inventory, ecology and seasonal distribution
330 patterns of Culicidae (Insecta: Diptera) in the national park Donau-Auen (Lower
331 Austria). Aquatic insects. doi: 10.1080/01650424.2014.1003946.
- 332 31 Zittra C., Waringer, J., Werblow, A., Melaun, C., Fuehrer, H-P. (2014) Reconfirmation
333 of *Culiseta (Allotheobaldia) longiareolata* (Marquardt 1838) (Diptera: Culicidae) in
334 Austria. The first sequence-confirmed findings in northeastern Austria. *Acta ZooBot*
335 *Austria*, **150/151**, 17-24.
- 336

337 **Figure 1:** Test procedure for the identification of mosquitoes using direct PCR.



338

339 **Table 1:** Culicidae used for species identification with direct PCR. The table shows the genus and species of the samples as well as storage

340 conditions, storage time, the amount of used tissue, the PCR results and GenBank accession numbers. (rt = room temperature)

serial no.	genus	species	storage conditions	storage time	used tissue	PCR result	GenBank accession no.
1		<i>Aedes cinereus</i> Meigen, 1818	70% EtOH rt	1 year	leg (♀)	positive	KM280590
2	Aedes	<i>Aedes cinereus</i> Meigen, 1818	dry	18 months	leg (♀)	negative	
3		<i>Aedes cinereus</i> Meigen, 1818	dry	18 months	leg (♀)	negative	
4		<i>Aedes cinereus</i> Meigen, 1818	dry	18 months	leg (♀)	negative	
5		<i>Aedimorphus vexans</i> (Meigen, 1830)	dry	18 months	imago (♀)	positive	KM280575
6	Aedimorphus	<i>Aedimorphus vexans</i> (Meigen, 1830)	dry	18 months	leg (♀)	positive	KM280576
7		<i>Aedimorphus vexans</i> (Meigen, 1830)	-20°C	2 years	leg (♀)	positive	KM243937
8		<i>Anopheles algeriensis</i> Theobald, 1903	dry	18 months	leg (♀)	negative	
9		<i>Anopheles algeriensis</i> Theobald, 1903	dry	18 months	leg (♀)	negative	
10		<i>Anopheles algeriensis</i> Theobald, 1903	dry	18 months	leg (♀)	negative	
11		<i>Anopheles algeriensis</i> Theobald, 1903	dry	18 months	leg (♀)	negative	
12		<i>Anopheles claviger</i> s.s (Meigen, 1804)	-20°C	2 years	leg (♀)	positive	KM243938
13		<i>Anopheles gambiae</i> s.s Giles, 1902	70% EtOH rt	6 months	imago (♀)	positive	not sequenced
14	Anopheles	<i>Anopheles gambiae</i> s.s Giles, 1902	70% EtOH rt	6 months	leg (♀)	positive	not sequenced
15		<i>Anopheles gambiae</i> s.s Giles, 1902	70% EtOH rt	6 months	larva	positive	not sequenced
16		<i>Anopheles hyrcanus</i> (Pallas, 1771)	dry	18 months	imago (♀)	positive	KM280592
17		<i>Anopheles hyrcanus</i> (Pallas, 1771)	dry	18 months	leg (♀)	positive	KM280591
18		<i>Anopheles messeae</i> Falleroni, 1926	-20°C	2 years	leg (♀)	positive	KM280597
19		<i>Anopheles plumbeus</i> Stephens, 1828	dry	18 months	leg (♀)	positive	KM280577
20		<i>Anopheles plumbeus</i> Stephens, 1828	-20°C	2 years	leg (♀)	positive	KM243939
21	Coquillettidia	<i>Coquillettidia richiardii</i> (Ficalbi, 1889)	-20°C	2 years	leg (♀)	positive	KM243940
22		<i>Coquillettidia richiardii</i> (Ficalbi, 1889)	-20°C	2 years	leg (♀)	positive	KM243941
23		<i>Culex modestus</i> Ficalbi, 1889	dry	18 months	leg (♀)	positive	KM280578
24	Culex	<i>Culex pipiens molestus</i> Forskal, 1775	-20°C	2 years	leg (♀)	positive	KM243942
25		<i>Culex pipiens molestus</i> Forskal, 1775	-20°C	2 years	leg (♀)	positive	KM243943

26	<i>Culex pipiens molestus</i> Forskal, 1775	-20°C	2 years	leg (♀)	positive	KM243944
27	<i>Culex pipiens molestus</i> Forskal, 1775	-20°C	2 years	leg (♀)	positive	KM243945
28	<i>Culex pipiens molestus</i> Forskal, 1775	-20°C	2 years	leg (♀)	positive	KM243946
29	<i>Culex pipiens molestus</i> Forskal, 1775	-20°C	2 years	leg (♀)	positive	KM243947
30	<i>Culex pipiens pipiens</i> Linnaeus, 1758	-80°C	6 months	imago (♀)	positive	KM280595
31	<i>Culex pipiens pipiens</i> Linnaeus, 1758	-80°C	6 months	imago (♀)	positive	KM280596
32	<i>Culex pipiens pipiens</i> Linnaeus, 1758	70% EtOH rt	18 months	leg (♀)	positive	KM280594
33	<i>Culex territans</i> Walker, 1856	dry	18 months	head (♀)	positive	KM280581
34	<i>Culex torrentium</i> Martini, 1925	-20°C	2 years	leg (♀)	positive	KM243948
35	<i>Culex quinquefasciatus</i> Say, 1832	70% EtOH rt	6 months	imago (♀)	positive	KM280579
36	<i>Culex quinquefasciatus</i> Say, 1832	70% EtOH rt	6 months	leg (♀)	positive	KM280580
37	<i>Culiseta annulata</i> (Schränk, 1776)	-80°C	1 month	leg (♀)	positive	KM280582
38	<i>Culiseta annulata</i> (Schränk, 1776)	70% EtOH rt	18 months	leg (♀)	positive	KM280593
39	<i>Hulecoeteomyia j. japonica</i> (Theobald, 1901)	-20°C	1 year	leg (♀)	positive	KM243953
40	<i>Hulecoeteomyia j. japonica</i> (Theobald, 1901)	-20°C	1 year	leg (♀)	positive	KM243954
41	<i>Ochlerotatus cantans</i> (Meigen, 1818)	70% EtOH rt	18 months	larva	positive	not sequenced
42	<i>Ochlerotatus caspius</i> (Pallas, 1771)	dry	18 months	head (♀)	positive	KM280583
43	<i>Ochlerotatus caspius</i> (Pallas, 1771)	-20°C	1 year	leg (♀)	positive	KM243949
44	<i>Ochlerotatus caspius</i> (Pallas, 1771)	-20°C	1 year	leg (♀)	positive	KM243950
45	<i>Ochlerotatus cataphylla</i> (Dyar, 1916)	-20°C	1 year	leg (♀)	positive	KM243951
46	<i>Ochlerotatus excrucians</i> (Walker, 1856)	-20°C	2 years	leg (♀)	positive	KM243952
47	<i>Ochlerotatus flavescens</i> (Müller, 1764)	dry	18 months	leg (♀)	positive	not sequenced
48	<i>Ochlerotatus geniculatus</i> (Olivier, 1791)	dry	18 months	leg (♀)	positive	KM280584
49	<i>Ochlerotatus punctor</i> (Kirby, 1837)	-20°C	1 year	leg (♀)	positive	KM243955
50	<i>Ochlerotatus rusticus</i> (Rossi, 1790)	dry	3 years	leg (♀)	positive	KM243956
51	<i>Ochlerotatus rusticus</i> (Rossi, 1790)	dry	3 months	leg (♀)	positive	KM243957
52	<i>Ochlerotatus sticticus</i> (Meigen, 1838)	dry	18 months	leg (♀)	positive	KM280585
53	<i>Ochlerotatus sticticus</i> (Meigen, 1838)	dry	18 months	leg (♀)	positive	KM280586
54	<i>Ochlerotatus sticticus</i> (Meigen, 1838)	dry	18 months	leg (♀)	positive	KM280587
55	<i>Ochlerotatus sticticus</i> (Meigen, 1838)	-20°C	2 years	leg (♀)	positive	KM243958

56		<i>Ochlerotatus sticticus</i> (Meigen, 1838)	70% EtOH rt	1 year	leg (♀)	positive	KM243959
57		<i>Ochlerotatus sticticus</i> (Meigen, 1838)	70% EtOH rt	1 year	leg (♀)	positive	KM243960
58	<i>Stegomyia</i>	<i>Stegomyia aegypti</i> (Linnaeus, 1762)	70% EtOH rt	6 months	imago (♀)	positive	KM280573
59		<i>Stegomyia aegypti</i> (Linnaeus, 1762)	70% EtOH rt	6 months	leg (♀)	positive	KM280574
60		<i>Stegomyia aegypti</i> (Linnaeus, 1762)	-20°C	1 year	leg (♀)	positive	KM243936
61	<i>Uranotaenia</i>	<i>Uranotaenia unguiculata</i> Edwards, 1913	dry	18 months	leg (♀)	positive	KM280588
62		<i>Uranotaenia unguiculata</i> Edwards, 1913	dry	18 months	leg (♀)	positive	KM280589