

Phylogeography of Austrian sand fly populations – where do they come from and where will they go?

Edwin Kniha

Einleitung

Weltweit wurden bisher über 850 Sandmückenarten (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) beschrieben (Abb. 1). Ihre Verbreitung erstreckt sich über tropische, subtropische, aride und gemäßigte Regionen, wobei Neuseeland und die pazifischen Inseln eine Ausnahme darstellen. Etwa 70 Arten sind von human- und veterinärmedizinischer Relevanz, da sie als Überträger von Protozoen, Bakterien und von Arthropoden-übertragenen (Arbo-) Viren fungieren [1].

Lange wurde angenommen, dass die Alpen eine Barriere für die nördliche Verbreitung der Sandmücken bilden, erst im Jahr 1999 wurden erstmals Sandmücken in Deutschland nachgewiesen und damit eine zentraleuropäische Verbreitung nördlich der Alpen. 2009 erfolgte der Erstdnachweis von *Ph. mascittii* in Österreich und seither wurde diese Art auch in der Slowakei nachgewiesen [2].

Temperatur stellt den wichtigsten Faktor für die Verbreitung von Sandmücken dar, allerdings dürften auch andere ökologische Faktoren einen Einfluss haben, deren Relevanz erst geklärt werden muss. **Im Rahmen meiner Dissertation** soll nun geklärt werden, ob weitere Arten und Populationen in Österreich vorkommen, woher diese kommen und welche medizinische Relevanz Sandmücken in Österreich haben.



Abbildung 1. *Ph. mascittii* Weibchen mit typisch behaarten Flügeln.

Ziele & Methodik

1. Aufklärung der Verbreitung von *Ph. mascittii* und möglichen anderen Arten in Österreich.
2. Einfluss von biologischen und ökologischen Aspekten von *Ph. mascittii* auf die Aktivität und Verbreitung.
3. Detaillierte phylogeographische Analyse von *Ph. mascittii*, um aufzuklären, woher Populationen in Österreich kommen und wohin sie sich ausbreiten können.
4. Aufklärung der medizinischen Relevanz von *Ph. mascittii* als Überträger der einzelligen Erreger *Leishmania* spp.

Sandmücken werden mit CDC Lichtfallen (Modell #512, John W. Hock Company, Gainesville, Florida) gefangen und sowohl morphologisch (Abb. 2) als auch molekular identifiziert.

Klimatische Parameter werden in die Analysen miteinbezogen, um deren Einfluss auf die Aktivität zu evaluieren. Die Detektierung von endosymbiontischen Bakterien *Wolbachia* spp. und von Pflanzen-DNA erfolgt mit PCR und Sequenzierung. Blutmahlzeiten werden mit MALDI-TOF Massenspektrometrie analysiert.

Phylogeographische Analysen werden durch den Vergleich von mehreren mitochondrialen und ribosomalen Genen mittels Maximum-Likelihood und Bayesian-Analysen durchgeführt.

Sandmückenweibchen werden auf das Vorhandensein von Leishmanien-DNA mit konventioneller und real-time PCR getestet, die Genotypisierung erfolgt durch Sequenzierung.

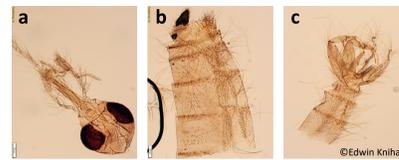


Abbildung 2. Kopf- (a) und Genital-Präparate von *Ph. mascittii* Weibchen (b) und Männchen (c).

Verbreitung

Ph. mascittii ist jene Sandmückenart, die in Europa am weitesten verbreitet ist (Abb. 3). Sandmücken brüten in feuchtem und organischem Substrat, das für die Larvalentwicklung notwendig ist. Wichtige Faktoren für die Verbreitung stellen das Klima, das Vorhandensein geeigneter Brutplätze und die Verfügbarkeit von geeigneten Wirtstieren für eine Blutmahlzeit dar. Mitteleuropäische Sandmückenpopulationen wurden hauptsächlich in klimatisch begünstigten Mikrohabitaten in unmittelbarer Nähe zu Wirtstieren (einschließlich des Menschen) nachgewiesen.

Basierend darauf werden intensive entomologische Beprobungen an geeigneten Standorten in ganz Österreich durchgeführt, um die Verbreitung von Sandmücken weiter aufzuklären.

Habitatpräferenzen und klimatische Faktoren werden genau evaluiert und basierend darauf geeignete Standorte für entomologische Beprobungen ausgewählt (Abb. 4).

Gefangene Exemplare werden morphologisch und molekular bestimmt und in Verbreitungskarten vermerkt.

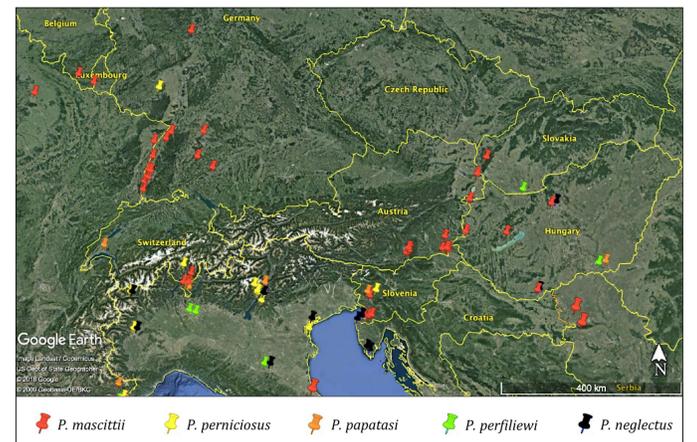


Abbildung 3. Verbreitungskarte der fünf wichtigsten europäischen Sandmückenarten.

Biologie & Ökologie

Erstmals wird für die in Österreich vorkommende Sandmückenart, *Ph. mascittii*, ein Langzeit-Monitoring durchgeführt. Standorte, an denen Sandmücken bereits nachgewiesen wurden, werden über die gesamte Aktivitätsperiode beprobt, um Aufschluss über die saisonale Aktivität und den Einfluss von klimatischen Parametern darauf zu evaluieren. Die Beprobung erfolgt an vier aufeinanderfolgenden Nächten pro Woche, in jeweils zwei verschiedenen Gebäuden an den jeweiligen Standorten, um Habitatpräferenzen von Sandmücken besser einschätzen zu können.

Exakte Daten zu Fangdatum, Geschlecht und Zustand der Weibchen (Blut gesaugt, gravid) werden erhoben. DNA wird individuell aus jedem Exemplar isoliert. Blutmahlzeit-Analysen werden mit zwei verschiedenen molekularen Techniken durchgeführt, nämlich PCR und Sequenzierung sowie MALDI-TOF Massenspektrometrie. Weibliche Sandmücken werden auf das Vorhandensein von Leishmanien-DNA untersucht. Zusätzlich erfolgen molekulare Untersuchungen zum Nachweis von bakteriellen Endosymbionten *Wolbachia* spp. sowie Pflanzen-DNA in allen gefangenen Exemplaren.

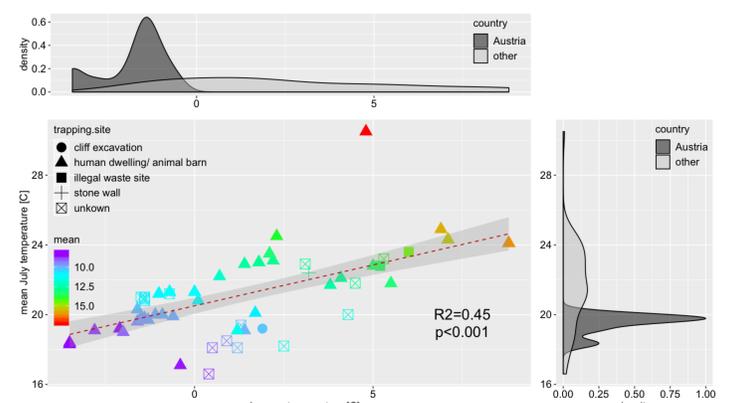


Abbildung 4. Evaluierung von Temperatur- und Habitat-Präferenzen der fünf medizinisch relevantesten Sandmückenarten in Europa, einschließlich *Ph. mascittii*.

Phylogeographie

Sandmückenpopulationen in Mitteleuropa sind aller Wahrscheinlichkeit nach bereits seit mehreren 1000 Jahren in klimatisch begünstigten Mikrohabitaten etabliert und ein Produkt post-glazialer Einwanderung aus mediterranen Teilen Europas. Mögliche Einwanderungsrouten sind aber nach wie vor unbekannt. Um diese Routen aufzuklären, werden detaillierte phylogenetische und geographische Analysen kombiniert. Dafür wird eine *Ph. mascittii*-Sammlung angelegt, die Exemplare verschiedener Populationen und Länder enthält.

Für die phylogeographische Analyse werden geeignete Marker-Gene evaluiert und Primer für die Amplifizierung mittels PCR selbst entworfen. Maximum-Likelihood- und Bayesian-Analysen werden angewendet, um Verwandtschaftsverhältnisse zwischen Sandmücken-Populationen aufzuklären. Die Ergebnisse der phylogenetischen Analysen werden als phylogeographische Verbreitungskarten dargestellt (Abb. 5). Diese Ergebnisse sollen potentielle Einwanderungsrouten und zukünftige Ausbreitungsrouten identifizieren, um Migrationsprozesse von Sandmücken besser einschätzen zu können.

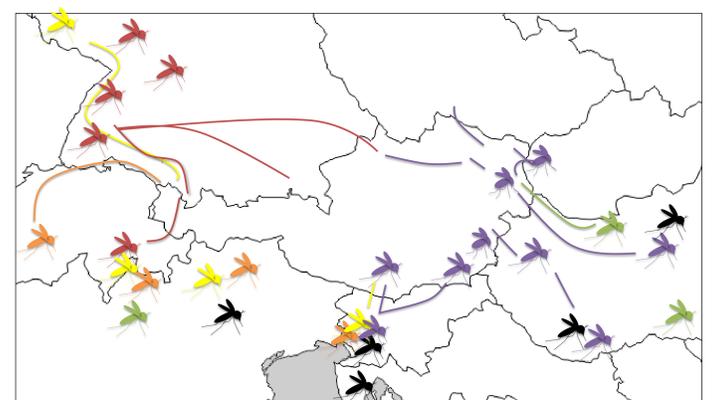


Abbildung 5. Schematische Verbreitungskarte und potentielle Ausbreitungsrouten von Sandmücken in Europa. Östliche (lila) und westliche (rot) *Ph. mascittii*-Populationen.

Referenzen

- [1] Akhoundi, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, 1–40 (2016).
- [2] Walochnik, J. & Aspöck, H. Sandmücken, Leishmanien und Leishmaniosen-neue Dimensionen alter Krankheiten. in *Krank durch Arthropoden* (ed. Aspöck, H.) **30**, 673–694 (Denisia, 2010).
- [3] Naucke, T. J. & Pesson, B. Presence of Phlebotomus (Transphlebotomus) mascittii Grassi, 1908 (Diptera : Psychodidae) in Germany. *Parasitol. Res.* **86**, 335–336 (2000).