

Adaptive Radiation und Zoogeographie anisakider Nematoden verschiedener
Klimazonen und Ozeane

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften
der Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Thomas Kuhn
aus Krefeld

Frankfurt am Main 2013
(D 30)

vom Fachbereich Biowissenschaften
der Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekanin: Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz

Gutachter: Prof. Dr. Sven Klimpel

Prof. Dr. Jörg Oehlmann

Datum der Disputation: 19.12.2013

Für meine Familie

Vorwort

Die vorliegende Dissertation ist in publikationsbasierter (kumulativer) Form angelegt und gibt einen zusammenfassenden Überblick über den Inhalt und wissenschaftlichen Kontext der von mir (und in Kollaboration) veröffentlichten, promotionsrelevanten Publikationen. Die Arbeit umfasst drei (ISI-) Publikationen, welche im Anhang (Gliederungspunkt 5) in chronologischer Reihenfolge angefügt sind und unter folgenden Titeln in den jeweiligen Fachzeitschriften veröffentlicht wurden:

- I Klimpel S, **Kuhn T**, Busch MW, Karl H, Palm HW (2011) Deep-water life cycle of *Anisakis paggiae* (Nematoda: Anisakidae) in the Irminger Sea indicates kogiid whale distribution in north Atlantic waters. *Polar Biology* 34: 899-906.
- II **Kuhn T**, García-Màrquez J, Klimpel S (2011) Adaptive radiation within marine anisakid nematodes: a zoogeographical modeling of cosmopolitan, zoonotic parasites. *PLoS ONE* 6: e28642.
- III **Kuhn T**, Hailer F, Palm HW, Klimpel S (2013) Global assessment of molecularly identified *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Anisakidae) in their teleost intermediate hosts. *Folia Parasitologica* 60: 123-134.

Im Ergebnisteil (Gliederungspunkt 2) sind die drei Einzelpublikationen separat zusammengefasst und anschließend aus übergeordneter Perspektive diskutiert (Gliederungspunkt 4). Die promotionsrelevanten Publikationen sind mit römischen Ziffern (s.o.) nummeriert und sollen an entsprechender Stelle als Querverweise dienen. Die in der Abhandlung zitierten Quellen sind im Literaturverzeichnis in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	V
Einführung	1
1 Einleitung	5
1.1 Kenntnisstand über anisakide Nematoden unter besonderer Berücksichtigung der Gattung <i>Anisakis</i>	9
1.1.1 Taxonomie, Systematik und Phylogenie	9
1.1.2 Wirt-Parasit Co-Phylogenie	15
1.1.3 Ontogenese und Wirtsspektrum	17
1.1.4 Artdiagnostik	22
1.1.5 Zoogeographie	26
1.1.6 Medizinische Relevanz (Pathogenität)	29
1.1.7 <i>Anisakis</i> in Tiefsee-Habitaten	31
1.2 Zielsetzung der Arbeit	34
2 Ergebnisse	35
2.1 Klimpel S, Kuhn T, Busch MW, Karl H, Palm HW (2011) Deep-water life cycle of <i>Anisakis paggiae</i> (Nematoda: Anisakidae) in the Irminger Sea indicates kogiid whale distribution in north Atlantic waters. Polar Biology 34: 899-906	35
2.1.1 Zusammenfassung	35
2.2 Kuhn T, García-Márquez J, Klimpel S (2011) Adaptive radiation within marine anisakid nematodes: a zoogeographical modeling of cosmopolitan, zoonotic parasites. PLoS ONE: e28642	37
2.2.1 Zusammenfassung	37
2.3 Kuhn T, Hailer F, Palm HW, Klimpel S (2013) Global assessment of molecularly identified <i>Anisakis</i> Dujardin, 1845 (Nematoda: Anisakidae) in their teleost intermediate hosts. Folia Parasitologica 60: 123-134	40

2.3.1	Zusammenfassung.....	40
3	Diskussion.....	42
3.1	Zoogeographie	42
3.2	Phylogenie und Artdiagnostik	48
3.3	Lebenszyklus-Ökologie.....	50
3.4	<i>Anisakis</i> als Bioindikator	53
3.5	Schlussfolgerungen und Ausblick	55
4	Zusammenfassung.....	57
5	Literaturverzeichnis	59
6	Anhang.....	77

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent	MAE	Multilocus-Allozym-Elektrophorese
&	Und	MAR	Mittelatlantischer Rücken
°C	Grad Celsius	ML	Maximum-Likelihood
°N	Grad Nord	MP	Maximum Parsimony
°S	Grad Süd	mtDNA	Mitochondriale Desoxyribonucleinacid
Abb.	Abbildung	Mya	Million years ago
AC	Ante Christum natum	N	Nukleotid, Nord
AD	Anno Domini	n	Anzahl, Stichprobe
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism	NCBI	National Center for Biotechnology Information
BSC	Biological species concept	ND	Norwegian Deep
bzw.	Beziehungsweise	NOAA	National Oceanic and Atmospheric Administration
ca.	Circa	Nr.	Nummer
cf.	lateinisch: Confer	NTS	Non Transcribed Spacer
CITES	Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora	Ord.	Ordnung
cox	Cytochrom-C-Oxidase	P	Prävalenz, Probability
d.h.	Das heißt	p.a.	Per anno
DNA	Desoxyribonucleinacid	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
EFSA	European Food Safety Authority	PCR	Polymerase Chain Reaction
ES	Exkretorisch/sekretorisch	rDNA	Ribosomal Desoxyribonucleinacid
et al.	Et alii	RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
etc.	Et cetera	RNA	Ribonucleinacid
ETS	Externer transkribierter Spacer	rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
Fam.	Familie	S	Sedimentationskoeffizient
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations	s.	Siehe
ggf.	Gegebenenfalls	s.o.	Siehe oben
griech.	Griechisch	s.s.	Sensu stricto
h	Stunde	s.u.	Siehe unten
Ig	Immunglobulin	sog.	Sogenannt
Infraord.	Infraordnung	sp.	Spezies
inkl.	Inklusive	spp.	Spezies pluralis
ISI	International Statistical Institute	SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
ITS	Internal Transcribed Spacer	SSU	Small Subunit
IWC	International Whaling Commission	Subord.	Subordnung
kg	Kilogramm	t	Tonne
km	Kilometer	Tab.	Tabelle
L (1-4)	Larvenstadium (1-4)		
m	Meter		

Abkürzungsverzeichnis

tRNA	Tranfer Ribonucleinacid	vgl.	Vergleiche
Unterord.	Unterordnung	vt.	Vielleicht
UPGMA	Unweighted Pair Group Method of Arithmetic Average	W	West
		WHO	World Health Organization
URL	Uniform resource locator	z.B.	Zum Beispiel
v	Version		

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Kladogramm des Phylum Nematoda basierend auf SSU-rDNA. Verändert nach Schmidt et al. (2009). Sterne markieren unabhängige Ursprünge von Zooparasitismus, Punkte markieren Pflanzenparasitismus. Römische Ziffern bezeichnen die Kladen (I-V). Parasitische Gruppen sind fett gedruckt..... 10

Abb. 2: Wirt-Parasit Co-Phylogenie der Gattung *Anisakis* und den Cetacea-Endwirten. Die Phylogenie der Cetacea basiert auf Nikaido et al. (2001). Die *Anisakis*-Phylogenie stellt den durch Sequenzanalysen des mtDNA *cox2*-Markers ermittelten Baum dar (verändert nach Mattiucci & Nascetti 2008). Abbildung verändert nach Mattiucci & Nascetti (2006, 2008). Verbindungslinien zwischen den Kladen markieren Wirtsnachweise, gestrichelte Linien markieren potentielle Wirtswechsel. 16

Abb. 3: Genereller Lebenszyklus der Gattung *Anisakis*. Der innere Kreis stellt die Lebensstadien von *Anisakis* innerhalb des jeweiligen Wirtes (äußerer Kreis) dar. Der Mensch dient als Fehlwirt. Gestrichelte Linien stellen potenzielle, aber unwahrscheinliche Infektionswege dar. Abbildung verändert nach Kuhn (2010), Klimpel & Palm (2011). 19

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Für Nematoden der Gattung *Anisakis* nachgewiesene Cetacea-Endwirte. Molekulare Nachweise. Quellen: Còlon-Llavina et al. 2009 (1), Iñiguez et al. 2009 (2), Klimpel et al. 2008a (3), Mattiucci & Nascetti 2008 (4), Mattiucci et al. 2009 (5), Iñiguez et al. 2011 (6). 21

Einführung

Das Zusammenleben artverschiedener Organismen ist geprägt durch ihre vielfältigen Wechselbeziehungen. Mehr als die Hälfte aller rezent vorkommenden Arten leben innerhalb oder auf den Körpern anderer Organismen, wobei der Nutzen zumeist sehr ungleich verteilt ist (Lucius & Loos-Frank 2008, Townsend et al. 2003). Der Begriff Parasitismus beschreibt in dieser Hinsicht eine besondere Form der Symbiose (griech. *Sym* = zusammen, *bíos* = Leben) und bezieht sich auf die Beziehung zwischen zwei artfremden Organismen, bei der sich der meist kleinere Partner (Parasit) aufgrund physiologischer und/oder morphologischer Adaptionen temporär oder permanent an oder in einem größeren Organismus (Wirt) aufhält und diesem Ressourcen entzieht (Lucius & Loos-Frank 2008, Mehlhorn & Piekarski 2002). Während mutualistische Wechselbeziehungen Interaktionen von beiderseitigem Vorteil bezeichnen (im deutschen Sprachgebrauch wird hier der Begriff *Symbiose* verwendet), kommt es bei antagonistischen Beziehungen wie dem Parasitismus zu einer einseitigen Ausnutzung, bei der ein Wirtsorganismus durch den Parasiten direkt (z.B. mechanische Zerstörung von Zellen/Organen) oder indirekt (z.B. Nahrungskonkurrenz, Intoxikation) geschädigt wird (Lucius & Loos-Frank 2008, Mehlhorn 2012, Townsend et al. 2003). Parasitismus gilt als eine der erfolgreichsten Lebensstrategien und hat sich unabhängig in vielen unterschiedlichen Organismenklassen entwickelt (Littlewood 2005, Marcogliese 2005, Poulin 2011, Price 1980). Parasiten sind ubiquitär und finden sich in nahezu jedem Nahrungsnetz entlang sämtlicher trophischer Stufen. Sie gelten damit als ein integraler Bestandteil der Ökosysteme und bilden einen beträchtlichen Teil der Biodiversität (Klimpel et al. 2009, Marcogliese 2005, Marcogliese & Price 1997). Die hohe Diversität und die Eigenschaft, sich durch die meist kurze Generationszeit und große Anzahl an Nachkommen schnell an veränderte Umweltbedingungen anzupassen, lässt sogar vermuten, dass jedes Lebewesen zumindest einmal während seiner Lebensspanne von einem Parasiten oder dessen Zwischenstadien als Wirt genutzt wird (Gandon & Michalakis 2002, Klimpel & Palm 2011, Marcogliese & Price 1997, Poulin 2011).

Als Begleiter des Menschen sind besonders humanpathogene, parasitische Infektionen ein seit Jahrtausenden bekanntes Phänomen. Erste Überlieferungen, die sehr wahrscheinlich parasitische Infektionen beschreiben, gab es bereits von 4000 bis 400 AC durch die Ägypter (Cox 2002). Auch wenn über ihre Biologie aus heutiger Sicht zum Teil skurrile Theorien aufgestellt wurden, wie etwa die Annahme Parasiten

würden durch „Urzeugung“ (*generatio aequivoca*) in den Gedärmen entstehen (Hippokrates 460-370 AC), so erkannten die Menschen schon sehr frühzeitig die Zusammenhänge zwischen dem Auftreten von parasitischen Infektionen und der Aufnahme bestimmter Nahrungsmittel (Enigk 1986). Das religiöse Gebot der Juden und Moslems, auf den Verzehr jeglichen Schweinefleischs zu verzichten, könnte möglicherweise durch den Befall mit helminthischen Parasiten wie Trichinen (*Trichinella spiralis*) oder dem Schweinebandwurm (*Taenia solium*) begründet sein (Hiepe et al. 2006). Obwohl bereits die alten Griechen und Römer mit Hippocrates (460-375 AC), Celsus (25 AC-50 AD) und Galen (Galenus von Pergamon, 120-200 AD) mit dem Vorkommen von Helminthen wie den Nematoden *Ascaris lumbricoides* und *Enterobius vermicularis* sowie den Bandwürmern der Gattung *Taenia* vertraut waren, sind die Anfänge des medizinischen und wissenschaftlichen Fortschritts auf diesem Gebiet, aufgrund der religiösen (und abergläubischen) Dogmen im Mittelalter, eher in den Zeiten der Renaissance zu finden (Cox 2002, Grove 1990). Wichtige Fortschritte wurden im 18. Jahrhundert durch Linneaus` Beschreibung der sechs wichtigsten Helminthen des Menschen (*Ascaris lumbricoides*, *Dracunculus medinensis*, *Enterobius vermicularis*, *Fasciola hepatica*, *T. saginata*, *Taenia solium*) gemacht (Linnaeus 1758) sowie durch den deutschen Pastor Johann Göze (1731-1793), welcher mit seinem Werk „Versuch einer Naturgeschichte der Eingeweidewürmer thierischer Körper“ einen wichtigen Beitrag zur Systematik helminthischer Parasiten leistete (Grove 1990). Johann Zeder, ein deutscher Naturalist, erstellte 1800 ein neues System zur Klassifizierung und legte damit den Grundstein für die heute gebräuchliche Einteilung helminthischer Parasiten in ihre Großgruppen (Grove 1990). Einen ersten Höhepunkt erreichte diese Teildisziplin während des 19. Jahrhunderts, u.a. durch den Franzosen Casimir Joseph Davaine (1812-1882) mit der Entdeckung parasitischer Eier als Überträger für Spulwurm-Infektionen und später durch den italienischen Wissenschaftler Giovanni Battista Grassi (1854-1925), der sich in einem Selbstversuch mit Eiern dieses Wurmes infizierte, um dann wiederum dessen Eier als Vermehrungsstadien in seinen Fäzes nachzuweisen (Enigk 1986, Cox 2002, Davaine 1862, Grassi 1881). Insbesondere die Wissenschaftler Carl Rudolphi (1771-1832), Felix Dujardin (1802-1860) und Carl Moritz Diesing (1800-1867) und nicht zuletzt Rudolf Leuckart (1822-1898) erweiterten mit ihren Forschungen das Wissen über metazoische Parasiten und trugen wesentlich zur Etablierung der Parasitologie als eigenständiger Wissenschaftszweig innerhalb der

Zoologie bei (Grove 1990). Die sukzessive Weiterentwicklung optischer Geräte bis hin zu modernen Bildgebungsverfahren, der erleichterte Zugang zu extremen Habitaten (z.B. Arktis/Antarktis, Tiefsee), die Entwicklung moderner Analysemethoden und besonders die Entdeckung der DNA als Träger der Erbinformation und der Etablierung molekularbiologischer Methoden, sind Faktoren, welche maßgeblich dazu beigetragen haben, das Wissen über die Biologie parasitischer Organismen stetig zu erweitern.

Infolge der fließenden Übergänge in andere Wissenschaftsbereiche stellt die Parasitologie als sog. *life science* heute eine Forschungsrichtung innerhalb der Ökologie dar, die übergreifend in einer Schnittmenge aus Biologie, Veterinär- und Humanmedizin liegt, und sich entsprechend der vielfältigen parasitären Lebensweisen aus dem Methodenspektrum verschiedener biologischer Teildisziplinen (z.B. Immunologie, Genetik, Molekularbiologie, Verhaltensbiologie, Mikrobiologie, Physiologie, Evolutionsbiologie) bedient (Littlewood 2005).

Ganz allgemein wird zwischen protozoischen und metazoischen sowie Endo- und Ektoparasiten aus terrestrischen und aquatischen Habitaten unterschieden. Aufgrund der erhöhten (größenbedingten) Wahrnehmbarkeit mancher ihrer Vertreter und der Bedeutung als Krankheitserreger für den Menschen, sind terrestrische, metazoische Parasiten bereits sehr früh in der Geschichte Gegenstand intensiver Forschung gewesen. Obwohl die aquatischen Parasiten teilweise schon im frühen Mittelalter vereinzelt beschrieben wurden, gewannen die limnische und insbesondere die marine Parasitologie erst ab dem späten 18. Jahrhundert zunehmend an Bedeutung (Eunigk 1986). Neben den Arbeiten von Bruno Hofer (1906) und Marianne Plehn (1924), welche vor allem Fischkrankheiten in limnischen Ökosystemen untersuchten, wurde im marinen Bereich durch die Erforschung des Vorkommens von Nematoden und deren Larven, besonders die Helminthologie (z.B. Kahl 1936, Möller 1977, 1981, Möller & Anders 1983) vorangetrieben (Enigk 1986, Möller & Anders 1983).

Die Frage nach dem Gefährdungspotential von Fischparasiten als Krankheitserreger für den Wirt bzw. den Menschen stellt bis heute eine der sich am schnellsten entwickelnden Fachrichtungen in diesem Forschungsgebiet dar. Obwohl sämtliche bekannten, marinen Parasiten ihre Lebenszyklen auch ohne die Beteiligung eines menschlichen Wirtes durchlaufen können, haben sie als Auslöser diverser zoonotischer Erkrankungen (Pathogene, die vom Wirbeltier auf den Menschen übertragen werden) eine bedeutende medizinische Relevanz (Blair 2005). Neben einigen Cestoden (z.B. *Diphyllobothrium* sp.), Trematoden (z.B. *Heterophyes* sp.,

Cryptocotyle sp.) und Protisten (Microsporidia: *Enterocytozoon* sp.; Apicomplexa: *Cryptosporidium* sp.) sind insbesondere die anisakiden Nematoden (Fam. Anisakidae) der Gattungen *Anisakis*, *Contracaecum* und *Pseudoterranova* die Ursache zoonotischer Erkrankungen marinen Ursprungs (Audicana & Kennedy 2008, Blair 2005, Freeman 2005).

1 Einleitung

Die Meere und Ozeane stellen mit einer Gesamtfläche von ca. 361 Millionen km² und einem Volumen von geschätzten 1.375 Milliarden km³ das größte zusammenhängende Ökosystem unseres Planeten dar (Hempel et al. 2006, Sommer 2005, Tardent 2005). In ihrer Funktion als Kohlenstoff- und Wärmespeicher nehmen sie erhebliche Mengen Kohlendioxid auf und spielen eine Schlüsselrolle bei der Regulation des Erdklimas (Hoegh-Guldberg & Bruno 2010). Darüber hinaus bieten sie Lebensraum für eine Vielzahl von Organismen und stellen damit die bedeutendste biogene Ressource für den Menschen dar.

Neben der Nutzung verschiedener Mikro- und Makrophyta beispielsweise als Nahrungszusatz in vielen Lebensmitteln (z.B. Agarose als Geliermittel), bieten insbesondere Fisch und Fischereiprodukte eine wertvolle und vor allem günstige Quelle für qualitativ hochwertige, tierische Proteine und sind Lebensgrundlage für viele Menschen, besonders in den als „Entwicklungsländer“ bezeichneten Regionen der Welt. Der Bedarf an derartigen Erzeugnissen hat in den letzten Jahrzehnten drastisch zugenommen. Fast 65% der gesamten Erdbevölkerung - das entspricht etwa 3,6 Milliarden Menschen - leben in einer Entfernung von nicht mehr als 150 km zu den Küstenlinien der jeweiligen Kontinente. Dabei verdienen geschätzte 54,8 Millionen ihren Lebensunterhalt in der Primärproduktion von Fischereierzeugnissen (Hewitt & Campbell 2007, FAO 2011). Im Jahr 2009 deckten 3,0 Milliarden Menschen durch Fisch 20% ihres Bedarfs an tierischen Protein (FAO 2011). Mehr als 128 Millionen Tonnen sind alleine im Jahr 2010 als Nahrungsfisch für den Menschen angelandet und verarbeitet worden. Mit etwa 49% stammt der größte Anteil (2010: 79.500.000 t) dabei aus dem marinen Milieu. Aktuellen Berechnungen der Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) zufolge, ist der durchschnittliche Bedarf an Fischereiprodukten von ca. 9,9 kg (Lebendgewicht äquivalent) pro Kopf und Jahr auf einen Wert von 18,6 kg (Durchschnittswert im Zeitraum 1961-2009) gestiegen (FAO 2012). Mit einer durchschnittlichen Zuwachsrate von ca. 3.2% steigt er damit schneller als das weltweite Bevölkerungswachstum (1,7%/p.a.). Bei einem Gesamtwert von geschätzten 217,5 Milliarden US\$ wird deutlich, dass Fisch und Fischereiprodukte nicht nur die primäre Ressource für Protein und Mikronährstoffe darstellen, sondern besonders für die führenden Fisch-Exportländer von enormer wirtschaftlicher Bedeutung sind (FAO 2011, 2012, Woo 2006). Weltweit führend ist dabei China mit einer Produktion von 49.699.466 t bei einem Export von 6.168.397 t (FAO).

Im Zuge der steigenden Relevanz von Fischereierzeugnissen als Bestandteil der täglichen menschlichen Ernährung, wurde auch der Erforschung ihrer Schadorganismen eine immer größere Bedeutung beigemessen. Neben einer Reihe verschiedener Viren (z.B. Birnavirus, Paramyxovirus), Bakterien (z.B. *Vibrio* spp., *Flexibacter* sp.) und Pilzen (z.B. *Ichthyophonus hoferi*, *Exophiala* sp.), sind vor allem einzellige (protozoische) und mehrzellige (metazoische) Parasiten zunehmend in das öffentliche Interesse gerückt (Möller & Anders 1983, Muroga 2001, Woo 2006). Als bekanntestes Beispiel ist hier der sog. Nematoden-Skandal aus dem Jahr 1987 zu nennen. Dieser wurde ausgelöst, als Reporter des Fernsehmagazins Monitor in einem spektakulär aufgemachten Beitrag von lebendigen, larvalen Fadenwürmern (Nematoden) in den Eingeweiden von verzehrfähigen Seefischen berichteten, in dessen Verlauf massive Umsatzeinbußen entstanden. Der Zusammenbruch der deutschen Fischindustrie konnte nur durch eine Millionenförderung durch die damalige Bundesregierung verhindert werden (Kepplinger 2008). Zwischenfälle solcher Art dokumentieren die unzureichenden Grundlagen und den lückenhaften Wissensstand über das Vorkommen und die Verbreitung potentiell humanpathogener Parasiten in kommerziell genutzten Fischarten. Besonders im aquatischen Bereich ist der Kenntnisstand über die globale Diversität medizinisch wichtiger Arten sehr unterschiedlich.

Fische stellen die artenreichste Wirbeltierklasse im Meer dar. Von den weltweit 32.568 rezenten Fischarten leben etwa die Hälfte (14.952) überwiegend im marinen Milieu (Froese & Pauly 2013). Eine derart hohe Diversität potentieller Zwischen- und Endwirte spiegelt sich auch in der Vielfalt ihrer Parasiten wieder. Dies wurde in zahlreichen Wirt-Parasiten- bzw. Parasiten-Wirt-Checklisten für unterschiedliche aquatische Ökosysteme dargestellt, was einen Vergleich der jeweiligen Befalls-Parameter untereinander ermöglicht. Ausgehend von aktuellen Listen, liegt die durchschnittliche Diversität bei ca. 3-4 Parasitenarten pro untersuchter Fischart (Klimpel et al. 2009). Abhängig von betrachtetem Habitat, geographischer Region und wissenschaftlichem Einsatz können diese Werte allerdings variieren. So wiesen Margolis und Arthur (1979) sowie McDonald und Margolis (1995) durchschnittlich 3,2 Parasitenarten je Fischart in kanadischen Gewässern (marin/limnisch) nach. Für deutsche Küstengewässer der Nord- und Ostsee lag dieser Wert mit durchschnittlich 3,1 Parasitenarten pro Fischart in einem ähnlichen Bereich (Palm et al. 1999, Klimpel et al. 2009). In beiden Listen spiegelt sich der erhöhte Forschungsaufwand wieder, der in der gesteigerten

wirtschaftlichen Bedeutung dieser Gewässer für die Fischindustrie begründet ist. Mit Werten zwischen 1,2 und 1,7 Parasitenarten pro Fischart fallen die Schätzungen für tropische Gewässer (z.B. Philippinen, Bangladesch) bedeutend geringer aus (Arthur & Lumanlan-Mayo 1997, Arthur & Ahmed 2002, Klimpel et al. 2009). Ausgehend von der bis dato beschriebenen Anzahl an Fischarten aus Salz- und Brackwasser (13.500), berechneten Klimpel et al. (2001) die weltweite Biodiversität der marinen metazoischen Parasiten insgesamt auf 20.000-43.200 verschiedene Arten. Rohde (2002) legte eine Fischfauna von 30.000 Arten (limnisch und marin) zugrunde und schätzte die Parasiten-Diversität auf ca. 100.000 Arten, was einem Durchschnitt von etwa 3,3 Parasiten je Fischart entspricht. Obwohl die Schätzungen über ihre Biodiversität teilweise unterschiedlich ausfallen, gibt es heute keinen Zweifel mehr daran, dass Fischparasiten einen bedeutenden Teil der marinen Biodiversität ausmachen.

Das Vorkommen mariner Fischparasiten unterscheidet sich deutlich in den jeweiligen Fischarten und ist neben biotischen Wechselwirkungen ebenso abhängig von abiotischen Faktoren. Wasserbewegungen, hydrostatischer Druck, Salinität, Temperatur und Lichtverhältnisse prägen die Artenzusammensetzung aquatischer Parasiten genauso wie Nahrungsgefüge, Wanderungen und Räuber-Beute-Beziehungen. Verschiedene Studien in der Vergangenheit haben gezeigt, dass sich Parasiten als biologische Indikatoren nutzen lassen, um unterschiedlichste ökologische Fragestellungen zu bewerten und sogar anthropogene Einflüsse auf Gewässer zu untersuchen und zu bewerten (Lafferty 1997, MacKenzie et al. 1995, Sasal et al. 2007). Zu diesem Zweck lassen sich Parasiten zum Beispiel als biologische Marker zur Differenzierung lokaler Fischbestände (z.B. Baldwin et al. 2012, Kijewska et al. 2009, MacKenzie 2002, Mattiucci et al. 2005a, 2007a, 2008), zur Beschreibung der Populationsdynamik ihrer Wirte (z.B. Arthur & Albert 1993, Mattiucci 2006, Williams et al. 1992) oder zum Monitoring von Umweltstressoren wie Eutrophierung (z.B. Reimer 1995, Valtonen et al. 1997), Schwermetalleintrag (z.B. Sures et al. 1999, Sures 2003, Sures & Siddall 1999) oder Industrieschadstoffen (z.B. Madanire-Moyo et al. 2012) nutzen.

Aufgrund ihrer Langlebigkeit und der Tatsache, dass sie in nahezu allen marinen Nahrungsnetzen sämtlicher trophischer Stufen zu finden sind, werden sie außerdem dazu verwendet, die Rolle ihrer Wirte im Nahrungsgefüge zu bestimmen (Klimpel et al. 2003a,b, Marcogliese 2005). Die Übertragung der Parasiten durch trophische

Interaktionen und die zum Teil lange Verweildauer ihrer Zwischenstadien in den Wirten ermöglicht es dabei, durch eine Kombination von Mageninhalts- und parasitologischen Analysen, wichtige ökologische Informationen zu sammeln. Dazu gehören zum Beispiel die Art und Herkunft der einzelnen Nahrungsorganismen, oder kurzfristige ontogenetische Veränderungen in der Ernährungsweise des Wirtes (z.B. Klimpel et al. 2003b, Klimpel & Rückert 2005). Diese Methode ist ebenfalls unerlässlich, um Organismen zu untersuchen, die aufgrund ihrer schwer zugänglichen Habitate keine *in vivo* Analyse zulassen (Klimpel & Palm 2011, Lafferty et al. 2008, Palm 2011,).

Die Anpassung mariner Fischparasiten an die Lebens- und Ernährungsweise ihrer Wirte lässt sich durch verschiedene Methoden für ökologische Fragestellungen nutzbar machen. In Abhängigkeit der Art und Anzahl verschiedener Wirte, die zur Vollendung des Lebenszyklus eines Parasiten notwendig sind, unterscheidet man in der Parasitologie zwischen monoxenen (einwirtigen) und heteroxenen (mehrwirtigen) Parasiten (Mehlhorn & Piekarski 2002). Die Wirtsspezifität eines Parasiten, also der Grad der Spezialisierung auf ein bestimmtes Wirtsspektrum, kann dabei streng (stenoxen) oder locker (euryxen) sein. Ist das Wirtsspektrum eines bestimmten Parasiten bekannt, so kann man durch dessen Nachweis prinzipiell auch auf das Vorkommen der jeweiligen Zwischen- und Endwirte in einem bestimmten Gebiet schließen, da sie für die Vollendung des Lebenszyklus zwingend notwendig sind.

Der Verzehr von parasitierten Fischereierzeugnissen kann beim Menschen zu ernsthaften Erkrankungen führen (z.B. Audicana & Kennedy 2008, Klimpel & Palm 2011, Mattiucci & Nascetti 2008). In Zeiten der weltweiten Vernetzung des Handels im Zuge der Globalisierung, des gesteigerten Reiseaufkommens und des kulturellen und demographischen Wandels, hat die Frage nach dem Gefährdungspotential von Fischparasiten als Krankheitserreger für den Wirt bzw. Menschen daher eine besondere Notwendigkeit. Die Familie der Anisakidae (Railliet & Henry, 1912) Skrjabin & Karohkin, 1945 nimmt in diesem Zusammenhang eine Sonderstellung ein. Zum Einen gehören ihre Vertreter zu den abundantesten marinen Fischparasiten überhaupt, und zum Anderen gelten sie als Auslöser der weltweit auftretenden gastrointestinalen Anisakiasis des Menschen. Zu dieser als Zoonose bezeichneten Übertragung von Parasiten-(Zwischen)-Stadien auf den Menschen, kommt es durch die Aufnahme lebender Nematoden in rohem oder unzureichend gegartem bzw. verarbeitetem Fisch (Farjallah 2008a,b, Nadler et al. 2005). Neben den Gattungen *Pseudoterranova* und *Contracaecum* sind Arten der Gattung *Anisakis* durch die hohen

Prävalenzen in ihren Zwischen- und Endwirten die häufigsten Verursacher (Kellermanns et al. 2007, Mattiucci & Nascetti 2008). Als besonders gefährdet gelten dabei Länder und Gegenden, in denen der Verzehr roher oder halbgegartter Fischereiprodukte (z.B. Sushi, Sashimi, Matjes) kulturell bedingt ist. Die Infektion geht mit klinischen Symptomen wie starken Bauchschmerzen, Übelkeit, Durchfall, Erbrechen und Fieber einher und kann bei manchen Patienten sogar die Ursache schwerer allergischer Reaktionen sein (Audicana & Kennedy 2008). Die Zahl der weltweit gemeldeten Infektionen ist ansteigend und beläuft sich auf ca. 20.000-25.000 Fälle jährlich, wobei vermutet wird, dass die Dunkelziffer aufgrund der ähnlichen Symptomatik zu üblichen Magen-Darm-Erkrankungen um ein Vielfaches höher ist (Hochberg & Hamer 2010, Klimpel & Palm 2011). Neben Japan und den USA sind vor allem Menschen entlang der Küstenstaaten Europas (Deutschland, Frankreich, Niederlande, Spanien) und Bevölkerungsgruppen, welche auf Fische und Meeresfrüchte als wichtige Proteinquelle angewiesen sind, besonders betroffen (Hochberg & Hamer 2010).

Durch die verbesserte Diagnostik und die stetige Entwicklung der Molekularbiologie ist es in den letzten zwei Dekaden gelungen, die bestehende Taxonomie und Systematik der Gattung *Anisakis* zu erweitern bzw. zu revidieren. Aktuelle molekulare Analysen weisen auf die Existenz von insgesamt neun distinkten Arten hin, welche eine hohe genetische Heterogenität und (End-) Wirtsspezifität aufweisen, äußerlich jedoch nahezu identisch sind (sog. kryptische Arten). Unklar ist weiterhin, ob jede dieser Arten klinische Anisakiasis-Symptome beim Konsumenten auslösen kann.

1.1 Kenntnisstand über anisakide Nematoden unter besonderer Berücksichtigung der Gattung *Anisakis*

1.1.1 Taxonomie, Systematik und Phylogenie

Nematoden (Rund-/Fadenwürmer) sind bilateralsymmetrische, zylindrisch bis fadenartig gestaltete Helminthen, die mit derzeit 256 bekannten Familien und geschätzten 40.000 Arten einen der arten- und individuenreichsten Stämme innerhalb der Metazoa darstellen (Anderson 2000, McClelland 2005). Sie sind getrenntgeschlechtlich, wobei die Männchen typischerweise kleiner sind als die Weibchen und artspezifische Kopulationsorgane (z.B. sog. Spiculae) besitzen. Die Phylogenie der Nematoden ist äußerst umstritten und auch in der Literatur sehr

heterogen dargestellt. Die ursprüngliche Systematik des Phylums basiert hauptsächlich auf den Arbeiten von Chitwood (1933) bzw. Chitwood & Chitwood (1937) und sieht, aufgrund des Vorhandenseins paariger Sinnesorgane am Hinterende der Individuen (sog. Phasmiden), eine Einteilung der Nematoda in die Klassen Phasmidea und Aphasmidea vor (Meldal et al. 2007). Chitwood (1958) revidierte diese Bezeichnung jedoch und ersetzte sie durch Adenophorea (=Aphasmidea = Enoplea) und Secernentea (=Phasmida = Rhabditea) (z.B. Holterman et al. 2006). Blaxter et al. (1998) und Aleshin et al. (1998) führten die erste Phylum umfassende, molekularbiologische Untersuchung durch. Trotz einiger Datenlücken aus marinen Habitaten teilten sie das Phylum Nematoda dabei in 5 Klassen auf. Sie lieferten darüber hinaus Indizien für einen paraphyletischen Ursprung von Tier- und Pflanzenparasitismus (Blaxter et al. 1998). Die Einteilung in die Klassen Adenophorea und Secernentea wurde durch die molekulargenetischen Analysen jedoch widerlegt.

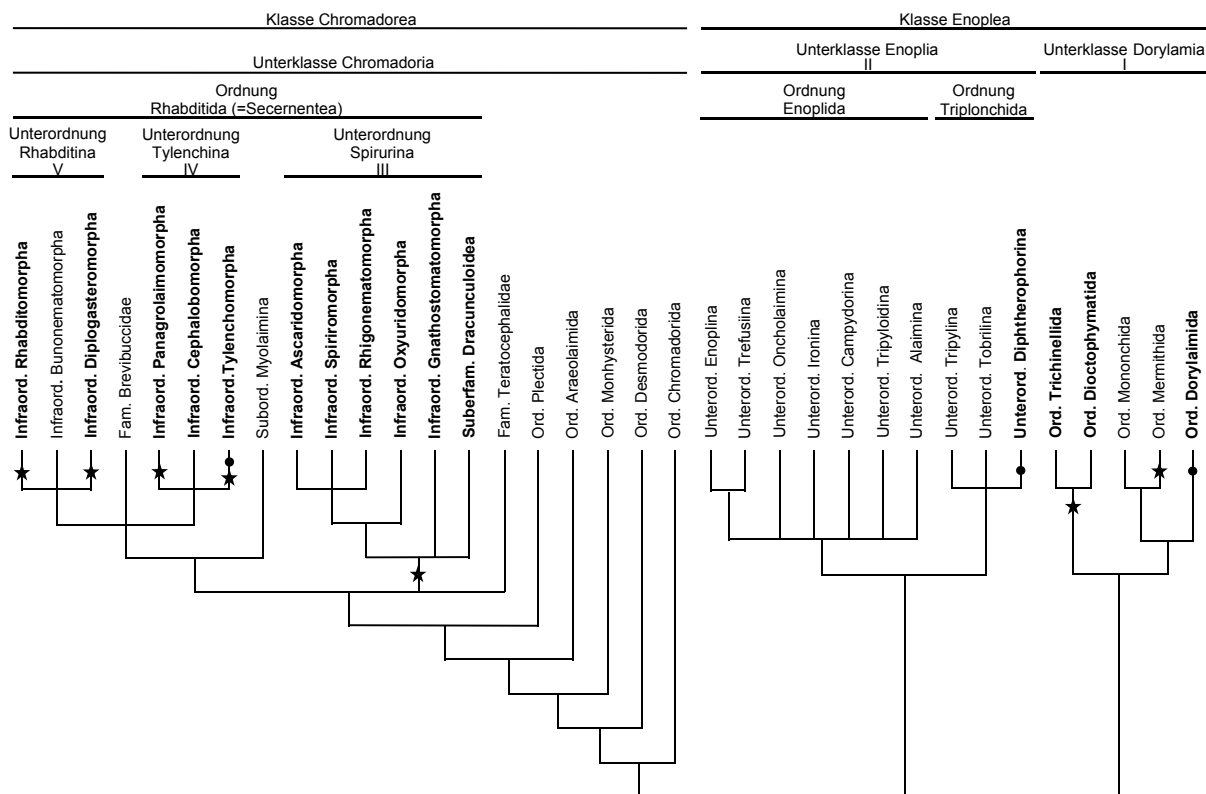


Abb. 1: Kladogramm des Phylum Nematoda basierend auf SSU-rDNA. Verändert nach Schmidt et al. (2009). Sterne markieren unabhängige Ursprünge von Zooparasitismus, Punkte markieren Pflanzenparasitismus. Römische Ziffern bezeichnen die Klade (I-V). Parasitische Gruppen sind fett gedruckt.

Basierend auf den Analysen der ribosomalen SSU DNA werden die Nematoda nunmehr in die zwei Klassen Chromadorea und Enoplea und die drei Unterklassen Chromadoria, Enoplia und Dorylaimia unterteilt (De Ley 2006, De Ley & Blaxter 2002, Lorenzen 1981, Schmidt et al. 2009). Die Klasse der Chromadorea (=Chromadoria)

enthält dabei einen Großteil der parasitischen Arten (Rhabditida). Die Infraordnung der Ascaridomorpha ist nach dieser Systematik Teil der Unterordnung Spirurina (De Ley 2006, Meldal et al. 2007, Schmidt et al. 2009).

Die Ordnung der Ascaridida umfasst Parasiten des Gastrointestinaltraktes aller Vertebratenklassen (Anderson 2000). Sie setzt sich aus 12 Familien zusammen, welche in die Überfamilien Ascaridoidea, Cosmocercioidea, Seuratoidea, Heterakoidea und Subuluridea eingeordnet sind (Anderson 2000, Chabaud 1974, Fagerholm 1991). Die Systematik der Ascaridoidea ist bis heute Gegenstand intensiver Forschung und wird unter Genetikern und Morphologen durchaus kontrovers diskutiert. Anderson (2000) richtet sich in seiner Monografie „Nematode parasites of vertebrates“ nach der Systematik von Hartwich (1974) bzw. Gibson (1983), welche fünf Familien innerhalb der Überfamilie Ascaridoidea (Acanthocheilidae, Anisakidae, Ascarididae, Crossophoridae, Heterocheilidae) anhand morphologischer Unterschiede im Exkretionssystem der Nematoden unterschieden. Molekulare Analysen ribosomaler und mitochondrialer Marker von Vertretern aus mehr als 50 Gattungen durch Nadler & Hudspeth (2000) bestätigten allerdings weitestgehend die Klassifikation nach Fagerholm (1991). Dieser legt diverse morphologische Vorarbeiten zugrunde (z.B. Gibson 1983, Hartwich 1974, Jägerskiöld 1893, Sprent 1983) und sieht letztendlich eine Einteilung in die Familien Ascarididae, Anisakidae, Heterocheilidae und Raphidascriidae vor. Der Verbleib der Crossophoridae und Acanthocheilidae bleibt dabei allerdings ungeklärt.

Die Familie der Anisakidae stellt innerhalb der Ascaridoidea die größte Gruppe dar (Anderson 2000). Nach Hartwich (1974) wird diese weiter in die Unterfamilien Anisakinae, Goeziinae und Raphidascaridinae unterteilt. Die Unterfamilie Anisakinae spaltet sich in den Tribus Anisakinea und Contraecinea auf, wobei die Anisakinea wiederum aus den vier Gattungen *Anisakis* Dujardin, 1945, *Phocanema* Myers, 1959, *Terranova* Leiper & Atkinson 1914 und *Sulcascaaris* Hartwich, 1957 bestehen (Anderson 2000, Hartwich 1974, 2009). Fagerholm (1991) teilt die Anisakiden dagegen lediglich in die zwei Unterfamilien Anisakinae und Contraecinae auf. Die Raphidascarididae (*Goezia*, *Hysterothylacium*) verbleiben dabei als eigenständige Familie (Nadler & Hudspeth 2000).

Die Gattung *Anisakis* wurde durch Dujardin (1845) ursprünglich anhand von Längenunterschieden ihrer Spiculae als eine Untergattung von *Ascaris* Linnaeus, 1758 beschrieben. Die bis dato 21 bekannten Arten innerhalb dieser Gattung konnten durch

Davey (1971) aufgrund der mehr als unzureichenden Beschreibungen allerdings auf drei valide Arten reduziert werden. So beschrieb der Autor lediglich *A. physeteris*, *A. simplex* sowie *A. typica* als gültig. *Anisakis alexandri*, *A. dussumieri*, *A. insignis* und *A. schupakovi* und bezeichnete er zusätzlich als *species inquirendae*.

Diese auf der Morphologie der Nematoden basierende Systematik hatte so lange Bestand, bis in den letzten 20 Jahren der Mangel an morphologischen Unterscheidungskriterien durch den zunehmenden Einsatz molekularer Marker kompensiert werden konnte. Durch die molekularbiologischen Analysen (siehe 1.1.4) konnte gezeigt werden, dass die ursprünglich aus drei Arten bestehende Gattung teilweise ein Cluster von morphologisch nahezu identischen "sibling species" (Zwillingsarten) darstellt und sich in (derzeit) neun distinkte Arten aufteilt (z.B. Klimpel et al. 2008a, 2010a, Mattiucci & Nascetti 2008). Die Arten sind einer Larven-Typisierung nach Berland zufolge (1961) in zwei Kladen aufgeteilt. Die erste Klade umfasst dabei ausschließlich Arten mit dem Larven-Typ I (sensu Berland 1961) und beinhaltet den sog. *Anisakis simplex*-Komplex [*A. simplex* (Rudolphi, 1809) sensu stricto s.s., *A. pegreffii* Campana-Rouget et Biocca, 1955, *A. simplex* C nach Nascetti, Paggi, Orecchia, Smith, Mattiucci et Bullini, 1986] sowie *A. typica* (Diesing, 1860) und die beiden Schwesterarten *A. nascettii* Mattiucci, Paoletti et Webb, 2009 und *A. ziphidarum* Paggi, Nascetti, Webb, Mattiucci, Cianchi et Bullini, 1998. Die zweite Klade umfasst Arten des Larven-Typs II und besteht ausschließlich aus dem sog. *A. physeteris*-Komplex, welcher *A. brevispiculata* Dollfus, 1968, *A. paggiae* Mattiucci, Nascetti, Dailey, Webb, Barros, Cianchi et Bullini, 2005 und *A. physeteris* (Baylis, 1923) umfasst. Einen vollständigen Bestimmungsschlüssel zur morphologischen Unterscheidung gibt es bislang nicht. Obwohl die Adulten noch anhand marginaler Unterschiede in den Längen- und Breitenverhältnissen der Vorderdarmstrukturen (Ventrikel) und der Spiculae zumindest in die jeweiligen Kladen eingeordnet werden können, ist eine Identifizierung bis zur Artebene nicht ohne weiteres möglich. So besitzen die Arten der Klade I oftmals ungleich gestaltete Spiculae und sigmoide Ventrikel die meist länger sind als breit, während die Spiculae der Klade II Anisakiden kurz und von gleicher Länge sind. Die Ventrikel sind nie sigmoid und eher breit als lang sind (Mattiucci & Nascetti 2008).

Neben den bislang neun gültigen Arten gibt es noch zahlreiche weitere Typen, deren Status bislang noch nicht vollständig geklärt ist. Mattiucci & Nascetti (2008) verweisen in ihrem umfassenden Review-Artikel auf bislang nicht publizierte Daten die auf die

mögliche Existenz einer Schwesternart zu *A. typica* aus dem zentral Atlantischen Ozean hinweisen. Dieser als *Anisakis* sp. 1 bezeichnete Genotyp wurde durch Berland und Nascetti (unpubliziert) in dem barschartigen *Nemipterus japonicus* entlang der Malaysischen Küste nachgewiesen und sei nach Angaben der Autoren des Larven-Typs I. Weitere Belege konnten dazu bislang nicht erbracht werden.

Umehara et al. (2008) bzw. Palm et al. (2008) wiesen durch molekulare Analysen abweichende Genotypen von *A. typica* nach, wobei letzterer die Bezeichnung *A. typica* cf. 1 HWP 2008, bzw. *A. typica* cf. 2 HWP 2008 vorschlug. Der mögliche Status als Schwesternart zu *A. typica* ist auch in diesem Fall bislang ungeklärt.

Anisakis sp. 2, ebenfalls ein neuer möglicher Genpool nach Mattiucci & Nascetti (2008), konnte bislang nur als Larve im Schwertfisch *Xiphias gladius* nachgewiesen werden. Dieser Genotyp ist nach Angaben der Autoren (genetisch) unterschiedlich zu allen anderen *Anisakis*-Arten, sei aber am nächsten mit *A. physeteris* verwandt (Mattiucci & Nascetti 2008, Quiazon et al. 2009). Darüber hinaus gibt es weitere larvale Nachweise (z.B. *Anisakis* sp. HC2005, *Anisakis* sp. SAN2004) bei denen der taxonomische Status noch völlig ungeklärt ist (siehe z.B. Kijewska et al. 2009).

Die Phylogenie von *Anisakis* spp. wird abhängig von der jeweils verwendeten Datengrundlage, der Berechnungsmethode sowie dem sequenzierten Marker entlang der verschiedenen Literaturquellen sehr heterogen dargestellt. Zwar scheint sich die postulierte Zweiteilung der Gattung in die Klade I und II sowie die Verzweigung innerhalb des *Anisakis simplex*-Komplexes in den allermeisten phylogenetischen Untersuchungen zu bestätigen (vgl. I), jedoch gibt es insbesondere in den Verzweigungsmustern innerhalb der beiden Klade unterschiedliche Ergebnisse. So berechneten Colón-Llavina et al. (2009) die Phylogenie von *Anisakis* anhand des mitochondrialen *cox2*-Markers mit der Maximum Parsimony-Methode. Dieser Berechnung zufolge wurden *A. physeteris* und *A. brevispiculata* jeweils als Schwesterarten und *A. paggiae* als Monophylum innerhalb des *A. physeteris*-Komplexes platziert. *Anisakis typica* wurde hier zusammen mit *A. ziphidarum* und *A. nascetti* (*Anisakis* sp.) in eine gemeinsame Klade gruppiert. Kijewska et al. (2009) konnten die zugrunde liegenden Sequenzdaten in ihrer Maximum Parsimony-Analyse des ribosomalen ITS-Markers nicht vollständig auflösen. Zwar kamen sie bezüglich des *A. physeteris*-Komplexes zu dem gleichen Verzweigungsmuster, jedoch klassifizierten sie *A. typica* hier als monophyletische Art innerhalb der Klade I. Mattiucci

& Nascetti (2006) stellten die Ergebnisse der distanzbasierten UPGMA-Methode (Allozym-Daten) einer Maximum parsimony basierten Analyse des *cox2*-Markers (nach Valentini et al. 2006) gegenüber. Während die Topologie des *A. simplex*-Komplexes sowie des *A. physeteris*-Komplexes auch in diesem Fall deckungsgleich war, unterschieden sich die beiden Bäume bezüglich der Lage von *A. typica*. Einmal als Monophylum in einer gemeinsamen Klade mit dem *A. simplex*-Komplex und einmal als Monophylum in einer Klade, welche neben dem *A. simplex* Komplex zusätzlich noch die beiden Schwesterarten *A. ziphidarum* und *A. nascettii* (hier noch *Anisakis* sp.) enthielt. Letzteres Verzweigungsmuster wurde durch Mattiucci et al. (2009) erneut anhand des *cox2*-Markers sowie bereits von Nadler et al. (2005) anhand des ITS-Markers (beide Maximum Parsimony) nachgewiesen. In der gleichen Publikation veröffentlichten Mattiucci et al. (2009) allerdings auch einen distanzbasierten Neighbor-Joining-Baum, bei welchem die Topologie des *A. physeteris*-Komplexes von den anderen Darstellungen abweicht. Mattiucci et al. (2009) fasst die Arten *A. paggiae* und *A. brevispiculata* als Schwesterarten zusammen, während *A. physeteris* (als Monophylum) den direkten Nachbarn dieser Klade bildet. Allen bisherigen Studien gemeinsam ist jedoch die basale Klassifizierung des *A. physeteris*-Komplexes sowie die abgeleitete Lage des *A. simplex*-Komplexes. Eine aktuelle phylogenetische Analyse des ribosomalen ITS-Markers unter Einbeziehung aller beschriebenen *Anisakis*-Arten liegt bislang nicht vor.

Ein weiterer Aspekt, welcher Gegenstand anhaltender Diskussionen ist, ist die Frage nach der Existenz von Hybriden zwischen den beiden Zwillingsarten *Anisakis simplex* s.s. und *A. pegreffii*. Abollo et al. (2003) wiesen durch RFLP- und direkte Sequenz-Analysen kernkodierter und mitochondrialer Marker zum ersten Mal in Sympatrie vorkommende Genotypen nach, welche die genetischen Merkmale sowohl von *A. simplex* s.s. als auch *A. pegreffii* ineinander vereinten. Die Autoren schlossen zufällige Polymorphismen sowie unvollständig konzertierte Evolution innerhalb der Multi-Copy-Gene als mögliche Erklärung aus und gaben Hybridisierung als wahrscheinlichste Ursache für dieses Phänomen an. Obwohl es seit 2003 vermehrt zum Nachweis dieser vermeintlichen Hybridgenotypen gekommen ist (Hermida et al. 2012, Quiazon et al. 2011, Suzuki et al. 2010, Umehara et al. 2006), bleibt der Status dieser „Rekombinanten“ bislang ungeklärt.

1.1.2 Wirt-Parasit Co-Phylogenie

Der Begriff Co-Speziation bezeichnet den Prozess gemeinsamer (konzertierter) Artbildung entlang ökologisch assoziierter Organismengruppen (z.B. Hoberg 2005, Hoberg & Klassen 2002, Page 2003). Obwohl oft als Musterbeispiel angegeben, muss diese Beziehung nicht immer zwischen einem Parasiten und dessen Wirt bestehen, sondern kann ebenso mutualistischer, symbiotischer oder anders garteter Natur sein (Page 2003).

Betrachtet man Assoziationen zwischen Parasiten und ihren jeweiligen Wirten, so muss man den Begriff Co-Speziation allerdings von jenem der Co-Evolution abgrenzen. Die Bezeichnung Co-Evolution unterliegt aufgrund unterschiedlicher Grundannahmen einem terminologischen Pluralismus. Definiert man Co-Evolution in diesem Zusammenhang als eine wechselseitige (reziproke) Anpassung von Wirt und Parasit, so könnte Co-Evolution auch ohne eine Co-Speziation stattfinden. Im Gegenzug ist es schwierig zu belegen, dass der Vorgang einer Co-Speziation auch ohne einen (zumindest geringen) Grad von Co-Evolution einhergeht, also wechselseitiger Anpassung, und stattdessen vielmehr durch andere (vlt. zufällige) Vorgänge begründet ist (Page 2003). Eine etwas restriktivere Terminologie bezeichnet Co-Evolution daher ausschließlich als die (selektionsbedingte) wechselseitige Anpassung zwischen Wirt und Parasit und sieht die Co-Speziation als einen separaten Prozess an (Page 2003). Brooks & McLennan (1991) bezeichnen dagegen die Co-Speziation als Co-Evolution auf makro-evolutionärer (Zeit-) Ebene, und wechselseitige Adaptation (z.B. physiologische Anpassungen) als Co-Evolution in mikro-evolutionärer (Zeit-) Ebene (sog. Co-Adaptation). Die eher neutralen Bezeichnungen Co-Phylogeny oder parallele Kladogenese sind ebenfalls gebräuchlich und umgehen dabei die eher prozessorientierte Co-Speziation (Page 2003).

Den meisten Studien zur Co-Speziation liegt die Annahme zugrunde, dass die Abstammung der Parasiten jene ihrer Wirte widerspiegelt. Eichler (1948) fasste die Beobachtungen, welche er auf der Basis von Analysen terrestrischer Parasiten machte, in drei parasitologischen Regeln zusammen: Die sog. Fahrenholz-Regel besagt dabei, dass die Evolution vieler Parasiten parallel zu der ihrer Wirte verläuft. Die Vorfahren der betreffenden Parasiten müssten demnach auch auf den Vorfahren der Wirte parasitiert haben (Prinzip „association by descend“, siehe Page 2003). Die Szidat-Regel sagt aus, dass ursprüngliche Wirte auch von ursprünglichen Parasiten und spezialisierte von spezialisierten Parasiten befallen werden. Die Eichler-Regel

besagt, dass größere Wirtsgruppen mehr Gattungen von Parasiten aufweisen als kleine. Bei Gruppen von Wirten mit vielen Arten, oder bei Beziehungen zu anderen Wirtsgruppen, würden nicht nur mehr Parasitenarten auftreten, sondern sich auch mehrere Gattungen entwickeln, welche zusammen auf der gleichen Wirtsart co-existieren können (vgl. Zander 1998).

Das Konzept, die phylogenetische Vergangenheit der Parasiten jener der Wirte gegenüberzustellen, hat stark von den molekularbiologischen Entwicklungen der letzten Dekaden profitiert und wurde auch in marinen Systemen angewendet (z.B. Hoberg 2005, Hoberg & Klassen 2002, Mattiucci & Nascetti 2006, 2008). Mattiucci & Nascetti (2006, 2008) diskutierten die Co-Speziation und Parasit-Wirt-Beziehungen zwischen den Vertretern der Gattung *Anisakis* und ihren jeweiligen Cetacea-Endwirten. Dabei stellten sie die Phylogenie (mtDNA) der neun *Anisakis*-Spezies den phylogenetischen Analysen rezenter Cetacea gegenüber (Mattiucci & Nascetti 2006, 2008, Nikaido et al. 2001, Valentini et al. 2006). Die Autoren zeigten, dass sich die Verzweigungsmuster und Arten-Gruppierungen der Parasiten in jener ihrer Endwirte (statistisch signifikant; Parafit: $P < 0,05$) widerspiegeln (Mattiucci & Nascetti 2008).

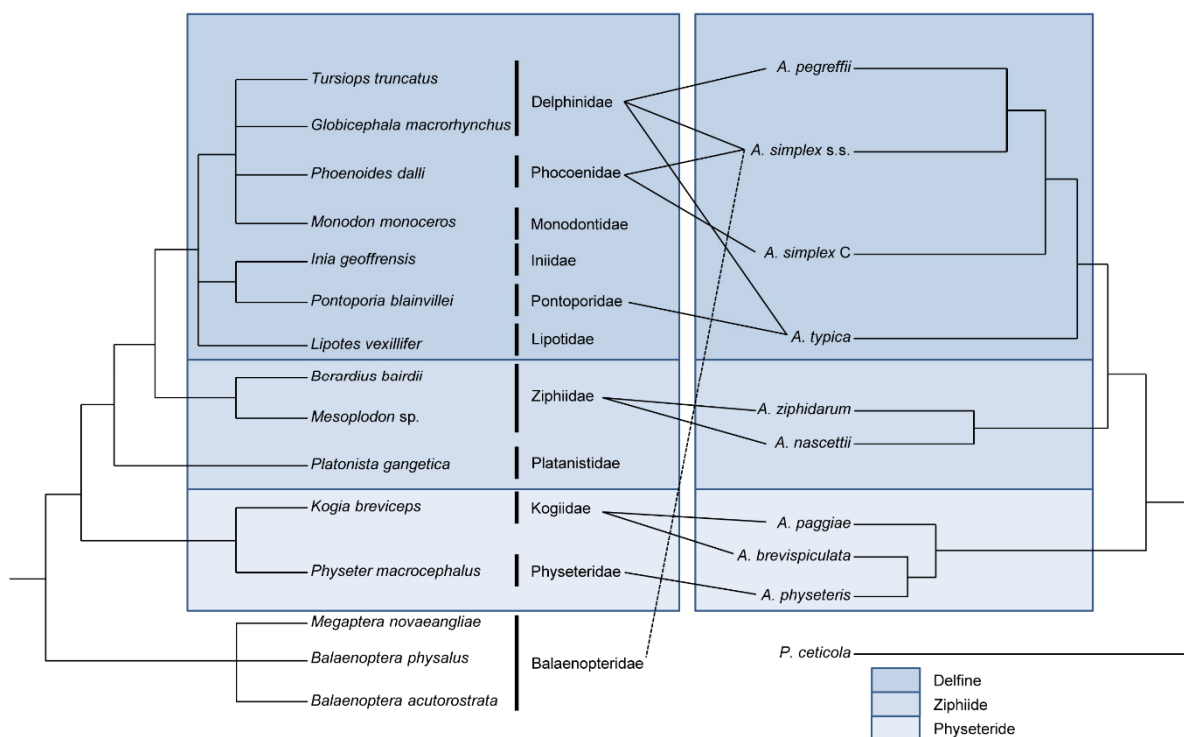


Abb. 2: Wirt-Parasit Co-Phylogenie der Gattung *Anisakis* und den Cetacea-Endwirten. Die Phylogenie der Cetacea basiert auf Nikaido et al. (2001). Die *Anisakis*-Phylogenie stellt den durch Sequenzanalysen des mtDNA *cox2*-Markers ermittelten Baum dar (verändert nach Mattiucci & Nascetti 2008). Abbildung verändert nach Mattiucci & Nascetti (2006, 2008). Verbindungslinien zwischen den Kladen markieren Wirtsnachweise, gestrichelte Linien markieren potentielle Wirtswechsel.

Den co-phylogenetischen Analysen zufolge stellen die Pottwale (Physeteridae) sowie der Zwerg- und Kleine Pottwal (Kogiidae) (siehe 1.1.2) basale Taxa dar, gefolgt von Schnabelwalen (Ziphiidae) sowie den limnischen und marinen Delphinidae als abgeleitete Gruppen. Im direkten Vergleich dazu zeigt die Phylogenie von *Anisakis*, dass die Vertreter des *Anisakis physeteris*-Komplexes, welche hauptsächlich in Physeteridae und Kogiidae parasitieren (siehe 1.1.2) ebenfalls eine basale Linie darstellen. Diese ist gefolgt von Anisakiden der Ziphiidae (*A. ziphidarum*, *A. nascettii*) sowie den abgeleiteten Arten des *A. simplex*-Komplexes, welche vorwiegend Parasiten der ozeanischen Delphinidae sind (Mattiucci & Nascetti 2006, 2008).

Die co-phylogenetischen Analysen legen nahe, dass die Speziation der Anisakiden auf geographischer Isolation basiert und daher als allopatrisch (genauer peripatrisch sensu Mayr 1963, 1975) zu bezeichnen ist (Bullini 1997, Mattiucci & Nascetti 2006, 2008, Mattiucci et al. 1997). Die geographische Isolation der Wirte erfolgte vermutlich mehrfach in der Erdgeschichte vom frühen Miozän (23,03-5,333 Mya) bis zum Pliozän-Pleistozän (Pliozän: 5,333-2,588 Mya; Pleistozän: 2,588-0,0117 Mya) während extremer klimatischer Schwankungen. Die Erhöhung der globalen Durchschnittstemperatur während des Miozäns hatte ein Schmelzen der Polkappen zur Folge, wodurch sich der Meeresspiegel an hob und viele Landabschnitte mit Flachmeeren bedeckte. Im Zuge glazialer Maxima im Pleistozän, den Perioden mit dem geringsten Meeresspiegel, entstanden marine Refugien, in denen kleine Populationen mariner Wirte (und ihre Parasiten) isoliert wurden, was vermutlich Co-Adaptionen und Diversifikationen von Wirt und Parasit zur Folge hatte. Während interglazialer Perioden könnte es dann zur geographischen Ausbreitung und, damit einhergehend, potentiellen Wirtswechseln (host-switching) gekommen sein, wie etwa im Falle von *Anisakis simplex* s.s. und dem Buckelwal *Megaptera novaeangliae* (siehe Abb. 2) (Bullini 1997, Mattiucci et al. 1997, Mattiucci & Nascetti 2006, 2008). Aufgrund fehlender fossiler Parasiten, durch deren molekulare Analyse eine ungefähre Datierung von Abspaltungseignisse möglich wäre („molecular clock“), ist die Analyse und Bewertung co-evolutionärer Prozesse in diesem Fall deutlich erschwert.

1.1.3 Ontogenese und Wirtsspektrum

Der Parasitismus als Lebensstrategie hat sich im Stamm der Nematoda vermutlich erst nach der Besiedelung des Festlandes durch aquatische Vertebraten entwickelt

(Anderson 1984). Durch die spätere Etablierung mehrwirtiger (heteroxener) Lebenszyklen und eine sukzessive Integration von (paratenischen) Zwischenwirten dehnte sich der potentielle Lebensraum parasitischer Nematoden in den marinen Lebensraum, und damit auch auf Fische und andere aquatische Organismen aus (Anderson 1984, 2000, Klimpel & Palm 2011). Entsprechend der Definition werden als Zwischenwirt solche Wirte bezeichnet, in denen (bei geschlechtlich differenzierten heteroxenen Endoparasiten) Reifungsprozesse oder ungeschlechtliche Vermehrung stattfinden. Bei den sog. Transport-Wirten handelt es sich um Zwischenwirte, in denen keine Vermehrung, sondern lediglich eine Reifung zum infektiösen Stadium stattfindet. Transport-Wirte fungieren zudem häufig als sog. Stapel- oder paratenische Wirte, da sich in ihnen Entwicklungsstadien der Parasiten anreichern (Mehlhorn & Piekarski 2002). Der Endwirt bezeichnet Wirte, in denen der Parasit die Geschlechtsreife erreicht.

Der typische Entwicklungsweg eines Nematoden ist charakterisiert durch vier Häutungen und Larvenstadien: Ei – (Schlupf) – L1 – (1. Häutung) – L2 – (2. Häutung) – L3 – (3. Häutung) – L4 – (4. Häutung) – Adultus. Die allgemein gebräuchliche Terminologie „Larve“, für die Zwischenstadien der Nematoden, ist in diesem Zusammenhang zwar streng genommen nicht ganz zutreffend (vgl.: Juvenile, Nymphe), hat sich jedoch in der Literatur weitestgehend durchgesetzt und wird daher auch im Folgenden verwendet (Smith & Wootton 1978). Anisakide Nematoden folgen in ihrer Entwicklung dem für Nematoden typischen Muster und durchlaufen einen heteroxenen, indirekten Lebenszyklus im aquatischen Milieu. Ihre Übertragungswege sind eng in den jeweiligen Nahrungsnetzen der Habitate verwoben und schließen Invertebraten (z.B. Gastropoda, Cephalopoda, Crustacea, Polychaeta) und Vertebraten (Teleostei) als Zwischenwirte ein (Anderson 2000, Busch et al. 2012, Klimpel & Palm 2011, Marcogliese 1995, Mattiucci & Nascetti 2008). Als Endwirte fungieren insbesondere marine Säuger wie Cetacea (*Anisakis*) und Pinnipedia (*Contracaecum*, *Pseudoterranova*) aber auch piscivore Vögel (*Contracaecum*) (z.B. Klimpel et al. 2008a, 2010a, Køie et al. 1995, Køie & Fagerholm 1993, Mattiucci & Nascetti 2008, McClelland 2005).

Der Lebenszyklus des „Walwurms“ *Anisakis* wurde erst in den letzten 40 Jahren in seinen Grundzügen erkannt und beschrieben (z.B. Davey 1971, Køie et al. 1995, Køie 2001, Smith & Snyder 2005, Smith & Wootton 1978, Van Benning 1971). Adulte *Anisakis* parasitieren im Verdauungstrakt mariner Säuger (Colòn-Llavina et al. 2009,

Davey 1971). Als typische Endwirte gelten Zahn- und Bartenwale (Cetacea) der Familien Delphinidae, Ziphiidae, Physeteridae und Kogiidae. Es konnten aber auch Vertreter der Balaenopteridae, Pontoporidae, Monodontidae, Phocoenidae, Neobalaenidae und sogar der Otariidae nachgewiesen werden (Tab. 1) (z.B. Colòn-Llavina et al. 2009, Iñiguez et al. 2009, Klimpel et al. 2008a, 2010a, Klimpel & Palm 2011, Mattiucci et al. 2009, Mattiucci & Nascetti 2008). In diesen entwickeln sich die Larven zum adulten Nematoden (L4-Adult).

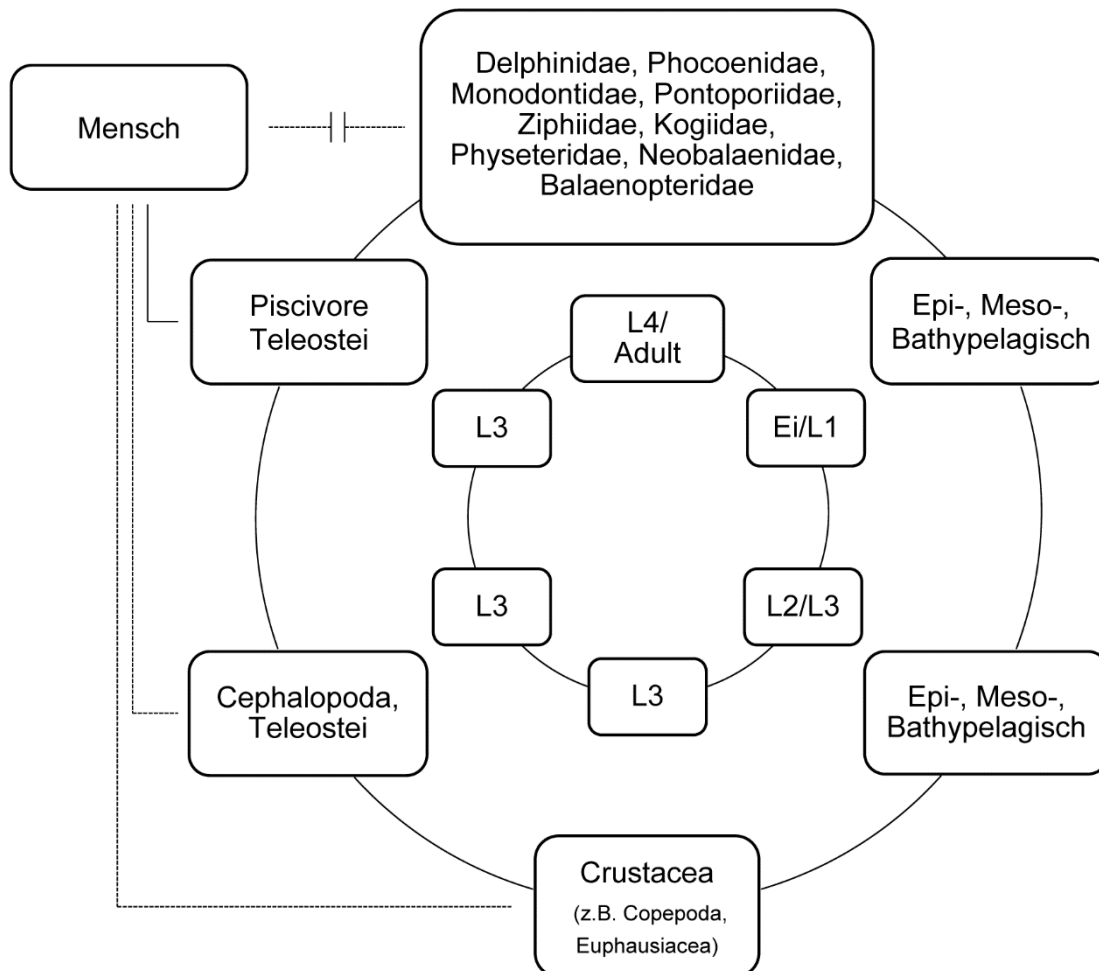


Abb. 3: Genereller Lebenszyklus der Gattung *Anisakis*. Der innere Kreis stellt die Lebensstadien von *Anisakis* innerhalb des jeweiligen Wirtes (äußerer Kreis) dar. Der Mensch dient als Fehlwirt. Gestrichelte Linien stellen potenzielle, aber unwahrscheinliche Infektionswege dar. Abbildung verändert nach Kuhn (2010), Klimpel & Palm (2011).

Die Eier der Adulten gelangen mit den Ausscheidungen der Endwirte in das umgebende Meerwasser, wo sie nach einigen Tagen (temperaturabhängig) embryonieren und schlüpfen (L1) (Anderson 2000, Køie 2001). Als „gescheidete“ L3-Larve, d.h. mit doppelter Cuticula (L2 und L3), verweilen sie in der freien Wassersäule bis sie vom ersten invertebraten Zwischenwirt (Crustacea) aufgenommen werden (Klompel et al. 2004, Køie et al. 1995). Die aktuellste Zusammenstellung dazu lieferten Busch et al. (2012) in einem umfassenden Literatur-Review. Infestationen durch

verschiedene Larvenstadien (L2, L3) wurden dabei hauptsächlich in Euphausiacea (z.B. *Euphausia similis*, *Nyctiphanes australis*, *Thysanoessa inermis*), Copepoda (z.B. Harpacticoidae) sowie in Decapoda, Amphipoda und calanoiden Copepoda nachgewiesen. Nach Køie (2001) stellen Euphausiacea vermutlich obligate Zwischenwirte dar, in denen die Larven das für die Endwirte infektiöse L3-Stadium erreichen. Die Nematoden werden vermutlich durch die Mundbewegungen des Wirtes von der L2-Hülle befreit, penetrieren die Darmwand und persistieren als L3-Larven im Haemocoel des Wirtes (Køie et al. 1995). In diesem Stadium sind sie für marine Teleostei und Cephalopoda, welche als nächste (paratenische) Zwischenwirte fungieren sowie für die Endwirte infektiös (Anderson 2000, Klimpel & Palm 2011, Køie et al. 1995). Durch die Fähigkeit, ohne weitere Häutung zusätzliche, piscivore Fische entlang der Nahrungskette zu infizieren, kann es mitunter zu enormen Nematodenakkumulationen in den Zwischenwirten kommen (Lile 1998, Palm & Klimpel 2011). Es wird vermutet, dass auf diese Weise die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Infektion des potentiellen Endwirtes erhöht wird (Hammerschmidt et al. 2009).

Der stetig steigende Forschungsaufwand bezüglich der anisakiden Nematoden hat zu einer teilweise unübersichtlichen Fülle verschiedener Zwischen- und Endwirtsnachweise in der wissenschaftlichen Literatur geführt. Auf Basis der vorwiegend morphologischen Arbeiten war eine Zuordnung bis zur taxonomischen Ebene der Art in den meisten Fällen jedoch nicht möglich, und die Nomenklatur war nicht einheitlich. Für die neun, mit molekularen Methoden unterscheidbaren, *Anisakis* Arten sind aktuell insgesamt 35 marine Säugerarten als Endwirte für *Anisakis* spp. nachgewiesen (Còlon-Llavina 2009, Iñiguez et al. 2009, 2011, Klimpel et al. 2008a, Mattiucci & Nascetti 2008, Mattiucci et al. 2009). Am häufigsten treten dabei Vertreter der Familien Delphinidae und Ziphiidae auf (Tab. 1).

Während die Wirtsspektren bei den Endwirten noch anhand einer relativ begrenzten Anzahl wissenschaftlicher Original-Studien und Review-Artikeln ohne besonderen Aufwand eruiert werden können, sind die Nachweise der Fisch-Zwischenwirte, aufgrund des hohen Forschungsaufwandes und der daraus resultierenden großen Menge unterschiedlicher Studien, nur grob abzuschätzen. Während Mattiucci & Nascetti (2008) in ihrem Review eine Anzahl von 68 molekular nachgewiesenen Fisch- sowie 5 Cephalopoden-Zwischenwirte angaben, schätzten Abollo et al. (2001) das Wirtsspektrum auf 200 Fisch- und 25 Cephalopodenarten. Marcogliese (2005) gab

eine Anzahl von mehr als 75 Fischarten allein aus kanadischen Gewässern an (siehe auch Margolis & Arthur 1979, McDonald & Margolis 1995). Eine aktuelle Zusammenstellung, basierend auf dem heutigen Wissen über die Diversität von *Anisakis* und unter Berücksichtigung molekular geführter Nachweise, gibt es bislang noch nicht.

Tab. 1: Für Nematoden der Gattung *Anisakis* nachgewiesene Cetacea-Endwirte. Molekulare Nachweise. Quellen: Còlon-Llavina et al. 2009 (1), Iñiguez et al. 2009 (2), Klimpel et al. 2008a (3), Mattiucci & Nascetti 2008 (4), Mattiucci et al. 2009 (5), Iñiguez et al. 2011 (6).

Familie	Endwirt	Parasit								
		<i>A. simplex</i> s. s.	<i>A. pegreffii</i>	<i>A. simplex</i> C	<i>A. typica</i>	<i>A. ziphidarum</i>	<i>A. brevispiculata</i>	<i>A. paggiae</i>	<i>A. physeteris</i>	<i>A. nascetti</i>
Delphinidae	<i>Delphinus delphis</i>	3	3		3					
	<i>Feresa attenuata</i>				3					
	<i>Globicephala macrorhynchus</i>				3					
	<i>Globicephala melas</i>	3		3	3					
	<i>Lagenodelphis hosei</i>									3
	<i>Lagenorhynchus albirostris</i>	3								
	<i>Lagenorhynchus obscurus</i>				3					
	<i>Lissodelphis borealis</i>			3						
	<i>Orcinus orca</i>	3								
	<i>Peponocephala electra</i>					3				
	<i>Pseudorca crassidens</i>	3		3						
	<i>Stenella attenuata</i>					3				
	<i>Stenella clymene</i>					6				
	<i>Stenella coeruleoalba</i>	3	4		3					
	<i>Stenella frontalis</i>				3					
	<i>Stenella longirostris</i>				3					1
	<i>Sotalia fluviatilis</i>				3					
<i>Sotalia guianensis</i>				2						
<i>Steno bredanensis</i>				3						
<i>Tursiops truncatus</i>		3		3						
Phocoenidae	<i>Phocoena phocoena</i>	3								
Monodontidae	<i>Delphinapterus leucas</i>	3								
Pontoporiidae	<i>Pontoporia blainvillei</i>				3					
Ziphiidae	<i>Mesoplodon bowdoini</i>					5			5	
	<i>Mesoplodon densirostris</i>					3			1	
	<i>Mesoplodon europaeus</i>					3				
	<i>Mesoplodon grayi</i>								4	
	<i>Mesoplodon layardii</i>			3		3				
	<i>Mesoplodon mirus</i>								4	
	<i>Ziphius cavirostris</i>		3			3				
Kogiidae	<i>Kogia breviceps</i>				6		3	3	3	
	<i>Kogia sima</i>						1	3		
Physeteridae	<i>Physeter macrocephalus</i>		3						3	
Balaenopteridae	<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	3								
Neobalaenidae	<i>Caperea marginata</i>		3							

Widersprüchliche Angaben finden sich in der Literatur über die Fragestellung, ob *Anisakis* einen pelagischen oder benthischen Lebenszyklus durchläuft. Während für die nahe verwandte Gattung *Pseudoterranova* relativ einheitlich ein benthischer Lebenszyklus postuliert wird, gehen die Meinungen über diese Frage bei den Vertretern der Gattung *Anisakis* auseinander. Mattiucci et al. (1997) postulieren einen benthisch/demersalen Lebenszyklus für *A. simplex* s.s. sowie einen pelagischen für *A. pegreffii*. Abollo et al. (2001) zeigten in einer Studie über den Befall mariner Fische und Cephalopoden, dass zwar 80% der Fischwirte von *A. simplex* s.s. nektobenthisch bzw. demersal leben, konnten allerdings keine *A. pegreffii* Nachweise in großen pelagischen Cephalopoden erbringen. Im Gegensatz dazu wiesen Klimpel et al. (2004) *A. simplex* in pelagischen Copepoda (*Paraeuchaeta norvegica*) und Fischen (*Maurolicus muelleri*, *Pollachius virens*) der Norwegischen Rinne nach und schlossen auf einen pelagischen Lebenszyklus. Dies konnte allerdings nicht durch molekulare Methoden unterstützt werden. Nachfolgende Studien der pelagischen *M. muelleri* und mesopelagischen Myctophidae (*Myctophum punctatum*, *Notoscopelus kroyeri*) entlang des Mittel-Atlantischen Rückens (MAR) durch Klimpel et al. (2007a, 2008a) bestätigten jedoch das Vorkommen von *A. simplex* s.s. im Pelagial und unterstützen damit diese Theorie. Darüber hinaus sollen spezielle morphologische Ausprägungen der larvalen Stadien (laterale Ausstülpungen der Hülle) den Larven eine hohe Verweildauer im Pelagial ermöglichen, was ebenfalls auf einen eher pelagischen Lebenszyklus schließen lässt (Klimpel & Palm 2011, Kjøie et al. 1995).

1.1.4 Artdiagnostik

Der Einsatz molekularbiologischer Techniken in den letzten 2-3 Dekaden hat unser Verständnis von der Biodiversität der Arten grundlegend verändert. Dies gilt besonders für Organismengruppen (z.B. Nematoden), in denen aufgrund eines stark konservierten Bauplans phänotypische Merkmale mit taxonomischer Signifikanz nicht in ausreichendem Maße vorhanden sind. Die morphologische Klassifikation adulter Anisakiden basiert weitestgehend auf marginalen Unterschieden in der Ausrichtung und Morphometrie interner Strukturen wie zum Beispiel dem Verdauungskanal, der Position und Orientierung des Exkretionsporus oder der Anzahl und Anordnung der männlichen Caudalpapillen (z.B. Klimpel & Palm 2011, Mattiucci & Nascetti 2008).

Eine Identifizierung larvaler Stadien ist nahezu unmöglich und insbesondere bei Stichproben mit großem Umfang nicht praktikabel.

Durch die Entwicklung und Anwendung geeigneter molekularer Marker aus kodierender und nicht kodierender DNA konnte der taxonomische Status der anisakiden Gattungen *Contraecum*, *Pseudoterranova* und insbesondere auch *Anisakis* revidiert bzw. erweitert werden (siehe 1.1.1). Die molekularen Analysen wiesen auf die Existenz von „sibling species“ innerhalb der Kosmopoliten Arten-Komplexe (*sensu lato*) hin, welche sich neben der erwähnten morphologischen Ähnlichkeit durch eine enorme genetische und ökologische Heterogenität (z.B. Wirtspräferenz, Zoogeographie) auszeichnen, und zudem das Kriterium der biologischen Art (biological species concept = BSC; nach Mayr 1963) erfüllen, d.h. potentiell fortpflanzungsfähige Nachkommen miteinander zeugen können (z.B. Klimpel & Palm 2011, Mattiucci & Nascetti 2008, Mattiucci et al. 2005b, 2007b, 2009, Nascetti et al. 1986, Valentini et al. 2006). Der Begriff „sibling species“ (=Zwillingsart) wurde 1942 durch den Zoologen Ernst Mayr geprägt und beschreibt Artenpaare oder auch Gruppen nahe verwandter Arten, die zwar voneinander reproduktiv isoliert sind, sich jedoch morphologisch nicht oder fast nicht unterscheiden (Mayr 1975). Der Begriff „cryptic species“ (= kryptische Art) wird häufig synonym verwendet und bezeichnet aus taxonomischer Sicht (vgl. ökologisch) das gleiche Phänomen (Knowlton 1986).

Zur genetischen Artidentifizierung larvaler, anisakider Nematoden bedient man sich einer Reihe verschiedener genetischer und/oder biochemischer Methoden. Die ursprünglichste Methode stellt dabei die sog. „Multilocus Allozyme Electrophoresis (MAE)“ dar. Bei dieser Methode werden Punktmutationen in der Aminosäure-Sequenz von einer Reihe (meist 19-24) Enzym-loci nachgewiesen. Die Mutationen können sich auf die Ladung und damit letztendlich auch auf die Faltung der Proteine auswirken, was ihre Mobilität im elektrischen Feld einer Gel-Elektrophorese verändert und eine Unterscheidung der Genotypen zulässt (z.B. Mattiucci & Nascetti 2008, Mattiucci et al. 1997, 2001, 2005b, Paggi et al. 1998). Durch Bestimmung populationsgenetischer Parameter wie der Allelfrequenz, Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht oder des Polymorphie- und Heterozygotiegrades ist es möglich, Aussagen über die genetische Variabilität, die genetische Distanz, den Genfluss und die Wirkung von Isolationsmechanismen zu treffen. Ein Mangel oder sogar das Fehlen von Heterozygoten weist dabei auf distinkte Genpools hin und ist ein Indiz für reproduktive

Isolation und dient als Grundlage für das Beschreiben einer neuen Art nach dem BSC (Mattiucci & Nascetti 2008, Storch et al. 2007).

Aufgrund des Nachteils, dass eben nur solche Mutationen nachgewiesen werden können, die sich auch auf die Mobilität des Polypeptids auswirken und sog. stumme Mutationen nicht erkannt werden, wurden die populationsbasierten Allozym-Analysen zunehmend durch PCR-basierte Methoden abgelöst bzw. erweitert (z.B. Iñiguez et al. 2009, Klimpel et al. 2007a,b, 2008a,b, 2010a, Palm et al. 2008, Umehara et al. 2008, Zhu et al. 2000a,b, 2007). Diesen Methoden ist gemeinsam, dass hier ein bestimmter DNA-Bereich unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide (Primer) zunächst amplifiziert, und anschließend mit Hilfe verschiedener Methoden (z.B. Restriktionsanalyse) analysiert wird.

Obwohl sie aufgrund der beschränkten Auflösung (vgl.: MAE) zunehmend durch die direkte Sequenzierung verschiedener molekularer Marker ersetzt wird, findet die sog. RFLP- Methode (Restriction-Fragment-Length-Polymorphism), nicht nur wegen des geringen (Kosten-) Aufwands in vielen Studien Verwendung (z.B. Abollo et al. 2001, 2003, D'Amelio et al. 2000, Noguera et al. 2009, Pontes et al. 2005, Umehara et al. 2008, 2010, Quiazon et al. 2009, 2011). Der amplifizierte DNA-Bereich (z.B. *cox1*, *cox2*, ITS1/5.8S/ITS2) wird dabei mit bestimmten Restriktionsenzymen (*Hinfl*, *HhaI*, *TaqI*) verdaut und anschließend durch eine Gelelektrophorese entlang eines elektrischen Feldes aufgetrennt. Das Vorhandensein oder die Abwesenheit spezifischer Restriktionsschnittstellen in den amplifizierten Markern ergeben abweichende Bandenmuster, anhand derer die entsprechenden (Zwillings-) Arten zugeordnet werden können. So zeichnet sich der ribosomale ITS-Marker, verdaut durch *Hinfl* bei *Anisakis pegreffii* zum Beispiel durch ein charakteristisches 3-Banden-Muster aus, während das von *A. simplex* s.s. aus nur 2 Banden besteht (siehe z.B. Abollo et al. 2003). Abollo et al. (2003) wies auf diese Weise heterozygote Genotypen nach und schloss auf ein mögliches Vorkommen von Rekombinanten zwischen diesen beiden Arten.

Zhu & Gasser (1998) und Zhu et al. (2000b, 2007) zeigten, dass einfache PCR-SSCP (PCR-Single-Strand-Conformation-Polymorphism) Anwendungen eine ausreichende Auflösung haben, um anisakide Nematoden anhand kurzer Stücke des ITS-Markers zu identifizieren. Hierbei werden Einzelstrang (single strand) DNA Moleküle de- und wieder renaturiert, um anschließend in einem nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Elektrophoresegele (PAGE) aufgetrennt zu werden. Die Laufeigenschaften der

Moleküle im Gel sind dabei, neben der Temperatur, der Art der Matrix und Puffer, abhängig von der Konformation, welche bei einzelsträngiger DNA durch intramolekulare Basenpaarungen bestimmt wird (Mülhardt 2009, Zhu & Gasser 1998,). Wenige Punktmutationen können bei gleichen Bedingungen die elektrophoretische Mobilität eines Fragments verändern und es so nachweisbar machen. Ein Nachteil dieser Methode ist unter anderem, dass die Größe der untersuchten Fragmente auf ca. 250 Basen begrenzt ist. Des Weiteren vervielfacht sich der Aufwand dieser Methode, da für jede Fragmentanalyse stets mehrere Gele bei unterschiedlichen Temperaturen gefahren werden müssen, und weil sich jede Mutation anders auf das Denaturierungs- und Laufverhalten auswirkt (Mülhardt 2009).

Eine besonders weitverbreitete Methode schließt die direkte Sequenzierung (z.B. nach Sanger et al. 1977) der zuvor amplifizierten Marker ein. Dabei werden die Arten durch den direkten Abgleich der Nukleotidabfolge mit der in internationalen Genbanken hinterlegten homologen Sequenzen identifiziert. Diese Herangehensweise ermöglicht die Nutzung der Gesamtheit der Nukleotide als Einzelmerkmale und ist grundlegend für die Analyse phylogenetischer Zusammenhänge. Obwohl zu diesem Zweck eine Reihe verschiedener Marker (mtDNA *cytb*: Mattiucci et al. 2003; *cox1*: Cross et al. 2007, Noguera et al. 2009; rDNA s-rRNA/tRNA-ser/AT-rich/tRNA-Asn/tRNA-Tyr: Kijewska et al. 2009; 18S DNA: Santos et al. 2006; *nad6*: Kijewska et al. 2009; ss-mtRNA: Abollo et al. 2003) etabliert wurden, haben sich der Cytochrome Oxidase Subunit 2- (*cox2*: Colón-Llavina et al. 2009, Mattiucci et al. 2007a,b, 2008, 2009) und insbesondere der ITS1/5.8S/ITS2-Marker (z.B. Abe 2008, D'Amelio et al. 2000, Klimpel et al. 2004, 2008a, 2010a, Palm et al. 2008, Pontes et al. 2005, Umehara et al. 2010, Zhang et al. 2007, Zhu et al. 2000a,b, 2007) in der Vergangenheit weitestgehend durchgesetzt.

Der ITS1/5.8S/ITS2 Marker ist ein kurzer Abschnitt ribosomaler DNA (rDNA) der etwa 900 Nukleotide umfasst. Er beinhaltet die beiden nicht kodierenden „Internal Transcribed Spacer 1 und 2“, die eigentlichen Zielsequenzen der Analyse, und zusätzlich den Bereich der 5,8S rRNA, welcher zwar nicht von direkter Bedeutung ist, aus praktischen Gründen jedoch üblicherweise mitamplifiziert wird. Ribosomale DNA eignet sich insofern besonders für die Sequenzanalyse, da Ribosomen eine zentrale Rolle in der Proteinsynthese einnehmen und ihr Grundaufbau in allen Organismen ähnlich ist. Die rDNA für die Ribosomen ist sowohl bei Pro- als auch bei Eukaryoten in hochrepetitiven, tandemartigen Sequenzclustern angeordnet, wobei die jeweiligen

Strukturgene (18S, 5,8S, 28S) durch „External Transcribed Spacer (ETS)“ flankiert und durch die Internal Transcribed Spacer (ITS) voneinander getrennt werden. Während die Strukturgene hochkonserviert sind und zwischen den Arten kaum Polymorphismen auftreten, weisen die ITS-Bereiche umfangreiche Sequenzvariationen auf und eignen sich daher, um auch sehr nahverwandte (Nematoden-) Arten voneinander zu unterscheiden (z.B. Kuhn 2010, Zhu et al. 2000).

1.1.5 Zoogeographie

Die Verbreitung mariner, helminthischer Parasiten wird durch verschiedene abiotische und biotische Faktoren bestimmt. Darunter fallen neben den hydrographischen und klimatischen Bedingungen besonders die Übertragungswege der Parasiten, welche tief in den trophischen Wechselwirkungen der Zwischen- und Endwirte eingebettet sind. Das Wissen um die Verbreitung und das Fressverhalten der Wirte ist daher unerlässlich um Rückschlüsse über das Vorkommen anisakider Nematoden zu ziehen. Aufgrund der enormen Anzahl potentieller Zwischenwirte sowie dem hohen Migrationspotenzial der Cetacea Endwirte, ist *Anisakis* (als Gattung) weltweit verbreitet. Der Nachweis von Artkomplexen im Zuge der verbesserten Artdiagnostik eröffnete allerdings eine bei weitem höhere Komplexität in dem Verbreitungsmuster als zunächst angenommen. Aus dem Vorkommen dieser morphologisch sehr ähnlichen, aber ökologisch unterschiedlichen Arten lässt sich vermutlich das ungleichmäßige Auftreten der Anisakiasis in verschiedenen Ländern und Regionen ableiten.

Eine weitverbreitete Darstellungsform zoogeographischer Verbreitungsmuster ist die Darstellung als sog. „Dot Map“, in der das Vorkommen einer Art in einem bestimmten Areal durch einen Punkt (auf einer Karte) gekennzeichnet ist (Gaston 1991, siehe auch Mattiucci & Nascetti 2006, 2008). Da diese relativ einfache Methode üblicherweise nur Datensätze aus Regionen widerspiegelt, in denen die besagte Art tatsächlich nachgewiesen wurde (sog. occurrence data), ist sie mitunter stark von dem unterschiedlichen Forschungsaufwand in den für die Forscher besonders interessanten Gebieten beeinflusst, und sie liefert keine Informationen über weniger intensiv beprobte Areale (Kadmon et al. 2004, Raedig et al. 2010, Reddy & Dávalos 2003). Zwar gibt es mittlerweile einige Ansätze, Verbreitungsgrenzen zu interpolieren und auch auf Gebiete zu erweitern, die bislang noch nicht beprobt wurden, allerdings

beschränken sich diese Methoden auf Organismen mit terrestrischer Verbreitung. Zudem neigen sie zum Teil dazu, Artgrenzen zu stark zu vereinfachen und damit meist zu überschätzen. Dabei liegt vielen Ansätzen das Prinzip der sog. Polygon-Triangulation zugrunde, bei der aus einer Punktmenge ein Dreiecksnetz erstellt wird. Im Falle der "Alpha-hull-Interpolation" wird im Zuge einer sog. "Delauney Triangulation" jeder Datenpunkt unter Vermeidung von Überkreuzungen miteinander verbunden. Aus den Durchschnittslängen wird ein Mittelwert berechnet (alpha). Durch das Löschen sämtlicher Linien, welche in ihrer Länge einen zuvor bestimmten Alpha-Cut-off übersteigen, entsteht ein Polygon, das durch ein Vielfaches der Variable alpha gebildet wird. Nach Burgmann & Fox (2003) ist diese Methode der sog. Convex-hull-Interpolation vorzuziehen. Diese Methode stellt das kleinste Polygon dar, in dem kein Winkel 180° erreicht. Da diese ein Polygon auch um die extremsten Punkte im Raum zog und damit disjunkte Verbreitungsgebiete unberücksichtigt ließ, neigte sie jedoch dazu, Verbreitungsgebiete eher zu überschätzen. Die Alpha-hull gibt diese Verbreitung zwar schon weitaus differenzierter wieder, allerdings lässt auch sie isolierte endemische Populationen außer Acht. In einer kürzlich erschienenen Studie von Raedig et al. (2010) wird ein Ansatz verfolgt, bei dem durch eine sog. "conditional triangulation" der Ausschluss endemischer Populationen innerhalb eines bestimmten Grenzwertes vermieden wird. Das Verbreitungsgebiet einer Art wird dabei nicht nur durch ein zusammenhängendes Areal dargestellt sowie durch jene Cluster, welche innerhalb einer definierten Interpolationsdistanz liegen, sondern es gibt auch solche Datenpunkte wieder, welche aufgrund mangelnder angrenzender Datenpunkte isoliert vom Hauptverbreitungsgebiet dieser Art dargestellt werden müssen (Raedig et al. 2010).

Die Schätzungen über das Verbreitungsgebiet der einzelnen *Anisakis*-Arten basieren hauptsächlich auf zoogeographischen Einzelnachweisen. Mattiucci & Nascetti (2006, 2008) stellten das Wissen über die derzeit bekannten molekular geführten Nachweise in einem umfassenden Review-Artikel zusammen. Das Vorkommen wurde dem belegten Fundort entsprechend in einer provisorischen Punk-Verbreitung-Karte dargestellt und enthielt alle acht bis dato beschriebenen *Anisakis*-Vertreter. Ebenfalls aufgeführt war *Anisakis* sp., eine Art, welche im darauf folgenden Jahr taxonomisch als *Anisakis nascettii* beschrieben wurde. Basierend auf den Einzelnachweisen kann die Zoogeographie von *Anisakis* wie folgt zusammengefasst werden:

Anisakis simplex s.s. ist besonders in der nördlichen Hemisphäre zwischen 35°N und dem Arktischen Polarkreis verbreitet. Es existieren außerdem Nachweise aus dem östlichen und westlichen Atlantischen und Pazifischen Ozean (siehe Mattiucci & Nascetti 2008) sowie aus dem Bereich des Mittel-Atlantischen Rückens (Klimpel et al. 2008a,b). Auch in Gewässern um Spanien und Marokko konnte *A. simplex s.s.* mehrfach nachgewiesen werden (Abollo et al. 2001, Farjallah 2008a,b, Mattiucci & Nascetti 2008).

Anisakis pegreffii ist die dominante *Anisakis*-Spezies rund um Gibraltar und im Mittelmeer (Abollo et al. 2001, Farjallah 2008a,b, Mattiucci & Nascetti 2008).

Anisakis simplex C zeigt eine eher diskontinuierliche Verteilung mit Nachweisen innerhalb der südlichen Hemisphäre sowie vor der Westküste Kanadas (Mattiucci & Nascetti 2008).

Anisakis typica gilt als die dominante *Anisakis*-Spezies in wärmer temperierten Gewässern entlang der Subtropen und Tropen (Mattiucci & Nascetti 2006, 2008, Palm et al. 2008).

Anisakis ziphidarum hat eine hauptsächliche Verbreitung in atlantischen Gewässern entlang der Ostküste Afrikas, wurde aber auch in westlichen Gebieten des Nord-Atlantiks und Neuseelands nachgewiesen (Paggi et al. 1998, Mattiucci & Nascetti 2006, 2008, Mattiucci et al. 2009).

Anisakis nascettii wurde hauptsächlich im Zentral- und Südatlantik sowie auf der Südhalbkugel zwischen Australien und Neuseeland nachgewiesen. Die geographische Verteilung ist dabei jener von der Schwesternart *A. ziphidarum* relativ ähnlich (Mattiucci et al. 2009).

Anisakis paggiae wurde bislang nur vor der Küste Floridas bzw. Puerto Ricos und Südafrikas nachgewiesen. Alle drei Fundorte liegen im Atlantischen Ozean (Còlon-Llavina et al. 2009, Mattiucci & Nascetti 2008).

Anisakis brevispiculata weist in der geographischen Verteilung große Ähnlichkeiten zu jener von *A. paggiae* auf. Diese Art konnte bisher ausschließlich im Atlantischen Ozean nachgewiesen werden (Còlon-Llavina et al. 2009, Mattiucci et al. 2001, Mattiucci & Nascetti 2008).

Anisakis physeteris Nachweise beschränken sich bislang auf das Mittelmeer und die östliche Atlantik-Küste (Mattiucci et al. 1986, Mignucci-Giannoni et al. 1999).

1.1.6 Medizinische Relevanz (Pathogenität)

Mehr als eine Milliarde Menschen weltweit sind mit einer oder mehreren Arten gastrointestinaler Nematoden befallen (WHO 2012, Audicana & Kennedy 2008). In den meisten Fällen stellen Menschen für den Parasiten einen sogenannten Fehlwirt dar. Darunter versteht man Wirte, in denen keine Weiterentwicklung stattfindet, und aus denen sich der Parasit unter natürlichen Umständen nicht mehr befreien kann (Mehlhorn & Piekarski 2002). Zahlreiche Studien beschäftigen sich mit der Pathogenität und dem zoonotischen Potenzial anisakider Nematoden und spiegeln damit die enorme medizinische Relevanz dieser Parasiten wieder (z.B. Anadón et al. 2009, Audicana & Kennedy 2008, Chai et al. 2005, Gamboa et al. 2012, Ishikura & Namiki 1989, Oshima 1987, Smith & Wootten 1978, Zhu et al. 2007). Der Forschungsaufwand bezüglich *Anisakis* hat sich erst seit Mitte der 50er Jahre drastisch erhöht, als zunächst niederländische und später japanische Wissenschaftler die Pathogenität anisakider Nematoden für den Menschen nachwiesen (EFSA 2010, Van Thiel 1960, 1962, Oshima 1987, Margolis & Beverley-Burton 1977, Smith & Wootten 1978). Jährlich erkranken mindestens 20.000-25.000 Menschen an einer Anisakidosis als Folge der Aufnahme lebender Larven in rohen oder unzureichend gegarten Fischereierzeugnissen (Hochberg & Hamer 2010). Die Terminologie Anisakidosis umfasst dabei alle Erkrankungen, welche durch den Befall mit Vertretern einer der drei Gattungen *Anisakis*, *Pseudoterranova* oder *Contracaecum* hervorgerufen werden, während sich die Bezeichnungen Anisakiasis bzw. Pseudoterranovosis entsprechend auf Erkrankungen ausgelöst durch *Anisakis* spp. oder *Pseudoterranova* spp. beziehen (Audicana & Kennedy 2008). *Anisakis simplex* sowie *P. decipiens* gelten als die häufigsten Auslöser dieser Zoonose. Daneben sind weitere Vertreter des *A. simplex*- (*A. pegreffii*) und des *P. decipiens*-Komplexes sowie *A. physeteris*, *C. osculatum* und *Hysterothylacium aduncum* zwar als Auslöser bekannt, werden jedoch nur sehr selten nachgewiesen (Audicana & Kennedy 2008, Hochberg & Hamer 2010, Nagasawa 2005). Mehr als 90% aller gemeldeten Anisakidosis Fälle (~2000 p.a.) stammen aus Japan und dessen Küstenregionen. Aber auch Menschen in den Küstenstaaten Europas (Deutschland, Frankreich, Italien, Niederlande, UK, Spanien, sowie den USA (inkl. Alaska & Hawaii) und immer öfter auch Neuseeland, Kanada, Brasilien, Chile und Ägypten sind betroffen (Audicana & Kennedy 2008, EFSA 2010, Hochberg & Hamer 2010). Insbesondere in den letzten drei Jahren kam es zu einem weltweiten Anstieg gemeldeter Anisakidosis Fälle. Dies hat vermutlich mehrere Gründe: Globalisierung,

weltweiter Handel und der immer beliebter werdende Trend, Speisen nicht zu „überkochen“, haben zu einem Anstieg der Infektionen auch in Ländern geführt, in denen der Verzehr von rohen oder unzureichend gekochten Fischprodukten (z.B. Sushi, Sashimi) keine Tradition hat. Durch die verbesserte Diagnostik und die entsprechende Kenntnis der Ärzte hat sich die Anzahl unerkannter Fälle deutlich verringert und die Anzahl der Nachweise dementsprechend erhöht. Inwiefern die wieder zunehmende Individuenzahl mariner Säuger im Zuge ihres Bestandsschutzes durch strikte Regularien einen Einfluss auf diesen Anstieg haben, ist bislang allerdings noch unklar.

Eine Infektion des Menschen kann mit ernsthaften klinischen Symptomen einhergehen. Abhängig von Ort und histopathologischer Läsion unterscheidet man zwischen gastrischem, intestinalem, ektopischem (extra-gastrointestinal) sowie allergischem Verlauf (Hochberg & Hamer 2010, Lymbery & Cheah 2007). Der gastrische Verlauf (1-12 h nach Infektion) wird ausgelöst durch das Einbohren der Larven in die Magenschleimhaut und ist gekennzeichnet durch das Einsetzen akuter, schwerer, epigastrischer Schmerzen, Übelkeit, Erbrechen und Fieber, welche unbehandelt zu chronischen, langanhaltenden, geschwürähnlichen Symptomen führen können (Hochberg & Hamer 2010). Die intestinale Form beschränkt sich hauptsächlich auf Ileum, seltener aber auch auf Colon und Jejunum und ist charakterisiert durch intermittierende oder permanente Schmerzen, die erst 5-7 Tage nach der Aufnahme lebender Larven eintreten können. Bei manchen Patienten kommt es zusätzlich zu Bauchwassersucht (Aszites) und anderen peritonealen Symptomen sowie Übelkeit und Durchfall (Lymbery & Cheah 2007, Matsui et al. 1985). Histopathologische Untersuchungen zeigen, dass die Symptomatik oftmals mit der Bildung eosinophiler Granulome in den Schleimhäuten einhergeht (Lymbery & Cheah 2007). Im Falle der ektopischen, extra-gastrointestinalen Anisakidosis kommt es zu einer Penetration der Magen- bzw. Darmschleimhaut durch die Larven. Die Nematoden liegen dann in der Bauchhöhle, Pleuralhöhle, Mesenterien, Leber, Pankreas, Ovarien oder subkutan vor, wo sie schmerzhaft, tumorähnliche, eosinophile Granulome oder Abszesse bilden können (Hochberg & Hamer 2010, Lymbery and Cheah 2007).

Zusätzlich zu den drei beschriebenen klinischen Syndromen kann es durch die Infektion bei ca. 10% der Patienten zu starken immunologischen Reaktionen kommen (Anadón et al. 2009, Audicana & Kennedy 2008). Die Symptome reichen dabei von

leichten Schwellungen und Nesselsucht, bis hin zu lebensbedrohlichen anaphylaktischen Schocks. Oft reichen schon minimale Mengen parasitischen Antigens aus, um eine Reaktion auszulösen (Alonso et al. 1999, Audicana & Kennedy 2008). In den meisten Fällen wird eine Reaktion durch lebende Larven des *Anisakis simplex*-Komplexes ausgelöst. In welchem Maße auch die anderen anisakiden Gattungen (*Pseudoterranova*, *Contracaecum*) allergische Reaktionen hervorrufen können, ist bislang noch unklar. Die Infektion mit *Anisakis* stimuliert eine Immunreaktion induziert durch beide T-Helfer-Zellen Typ 1 (Th1, Th2), in deren Verlauf es zur Produktion der Immunglobuline IgE, IgG, IgA und IgM kommt (Anadón et al. 2009, Klimpel & Palm 2011). Die sog. exkretorisch/sekretorischen (ES) Antigene sind in diesem Kontext von besonderer klinischer Bedeutung, da sie als Hauptauslöser dieser Immunreaktion gelten. Die Frage, ob das Immunsystem nur auf Antigene lebender Larven reagiert, oder ob eine Reaktion auch durch abgestorbene Nematoden hervorgerufen wird, ist derzeit noch ungeklärt (Anadón et al. 2009).

Neben der medizinischen Relevanz für den Menschen, kann ein Befall mit anisakiden Nematoden ebenso pathologische Effekte auf die Zwischen- und Endwirte haben. Dailey (2001) beschrieb Gastritiden und Geschwüre im Magen-Darm-Trakt von Pinnipedia, Cetacea und Seeottern, bedingt durch Larven-Aggregationen larvaler und adulter Anisakiden der Gattungen *Anisakis*, *Pseudoterranova* und *Contracaecum*. Der Befall war begleitet von Symptomen wie Durchfall, Dehydrierung und Anämie (Klimpel & Palm 2011, McClelland 2005). Lebernekrosen, granulomatöse Entzündungen und Läsionen der Darmwand, Viscera und Muskulatur sowie Lipidmangel und erhöhte Mortalität wurden bereits bei stark befallenen Fischzwischenwirten nachgewiesen (z.B. Hauck & May 1977, Klimpel & Palm 2011, Williams & Jones 1994).

1.1.7 *Anisakis* in Tiefsee-Habitaten

Der marine Lebensraum lässt sich in einen pelagischen (Freiwasser) sowie einen benthischen (Boden und Rand der Meere) Bereich unterteilen. Innerhalb des Pelagials unterscheidet man zwischen neritischen und ozeanischen Zonen. Der neritische Bereich beschreibt den gut durchlichteten Flachwasserbereich des Meeres (euphotische Zone) mit Wassertiefen von maximal 200m auf dem Kontinentalschelf, während der ozeanische Bereich die Wassermassen jenseits des Kontinentalsockels beschreibt. Dieser Lebensraum gliedert sich rein formal nach funktionellen Kriterien

(z.B. Lichtprofil, Nahrungsangebot) wiederum in die Tiefenzonen Epi- (0-200 m), Meso- (200-1.000 m), Bathy- (1.000-4.000 m), Abysson- (4.000-6.000 m) und Hadalpelagial (>6.000 m) (Bray et al. 1999, Castro & Huber 1997, Klimpel et al. 2006a, Sommer 2005). Das Benthon bildet den Siedlungsraum für alle als Benthos bezeichneten Organismen, die an Substratoberflächen gebunden sind, oder die in Weichsubstraten leben (Sommer 2005). Es gliedert sich entlang seiner vertikalen Ausdehnung (Bathymetrie) mit zunehmender Tiefe (s.o.) in das Litoral, Bathyal, Abyssal und Hadal. Das Litoral lässt sich etwas uneinheitlich in Supralitoral (Spritzwasserzone), Eulitoral (Gezeitenzone) und Sublitoral (Niedrigwasserlinie) weiter unterteilen (Sommer 2005).

Als Tiefsee bezeichnet man den Meeresbereich ab einer Wassertiefe von 200m. Mit einer Bodenfläche von 318,9 Mio km² (< 1.000 m) stellt sie das größte Habitat der Erde dar und bedeckt 62,3% der gesamten Erdoberfläche (Türkay 2001). Verglichen mit den wirtschaftlich bedeutenden und hochproduktiven Schelfmeeren, in denen über 95% der weltweiten Fischereierträge erzielt werden (Hubold 1997), sind die schwerzugänglichen Tiefsee-Habitate mehr als unzureichend erforscht (Klimpel et al. 2009). Die Tiefsee ist charakterisiert durch Dunkelheit, hohen Druck (500 Bar in 5000 m Tiefe), konstant niedrige Temperatur (ca. 4 °C ab 2.000 m) bei vergleichsweise guter Sauerstoff-Sättigung (Noble 1973). Entgegen der im 19ten Jahrhundert verbreiteten Lehrmeinung einer azoischen Tiefsee (Forbes 1843) weiß man heute, dass diese extremen Bereiche der Ozeane voller Leben sind, welches geprägt ist von einem hohen Maße physiologischer und morphologischer Spezialisierungen (Türkay 2001). Schätzungen zufolge leben von den weltweit bekannten 32.470 Fischarten ca. 10-15% (3.200-4.900) in Tiefsee-Habitaten (Klimpel et al. 2006a, 2009). Aufgrund der durch den Lichtmangel bedingten ausbleibenden Primärprodukten in mehr als > 200 m Tiefe, sind die dort lebenden Organismen von jener organischen Materie abhängig, die „als Überschuss“ aus den produktiven Oberflächensystemen herabsinkt (Klimpel et al. 2009, Türkay 2001, Tyler 1995). Durch die tagesperiodischen Auf- und Abwärtsbewegungen des Planktons kommt es zusätzlich zu diurnalen Vertikalwanderungen vieler Tiefseefische, die versuchen, dem unterschiedlichen Nahrungsangebot in den Wasserschichten entlang der Nahrungskette zu folgen und opportunistisch (z.B. Ausnutzung von Aggregationen der Beuteorganismen) so viel Nahrung wie möglich aufzunehmen (Klimpel et al. 2009, Türkay 2001, Mauchline & Gordon 1986). Eine derartige Verkettung von Vertikalwanderungen stellt eine

Verbindung zwischen Oberflächensystemen und Tiefenhabitaten her, die es ozeanischen Räubern/Säugern ermöglicht, Tiefseefische in ihr Nahrungsspektrum einzuschließen (Klimpel et al. 2006a, 2009). Auf diese Weise kommt es dazu, dass Parasiten zwischen den Lebensräumen wechseln können, und es finden sich folglich Arten des Pelagials auch im Benthos und *vice versa* (Klimpel et al. 2006a, 2010b).

Verglichen mit kommerziell genutzten Fischen sowie solchen aus Schelfgebieten, sind parasitologische Studien an Tiefseefischen selten (Klimpel et al. 2001). Klimpel et al. (2009) fassten die bestehende Literatur über Tiefseefisch-Parasiten in einer Checkliste zusammen und zeigten, dass mehr als 789 unterschiedliche Parasitenarten in den untersuchten 511 Fischarten zu finden sind. Das entspricht 1,5 Parasitenarten pro untersuchter Fischart (Klimpel et al. 2009, 2010b). Nur etwa 10% wurden auf ihre metazoische Parasitenfauna hin untersucht und es zeigt sich, dass die höchste Diversität dabei in einer Wassertiefe von 200-1.000 m zu finden ist (z.B. Campbell et al. 1980, Klimpel et al. 2001, 2004, 2006a,b, 2008b, 2009, 2010b, Noble & Orias 1975, Orias et al. 1978). Die Studien zeigen außerdem, dass die Parasitenfauna charakteristisch für die Stellung des Wirtes im Nahrungsnetz ist und wichtige Hinweise über das vertikale und horizontale Migrationsverhalten der Zwischen- und Endwirte liefert (z.B. Campbell et al. 1980, Klimpel et al. 2001, 2010b, Marcogliese 2002).

Während Fische des Mesopelagials insbesondere durch das Vorkommen vieler parasitischer Helminthen (z.B. anisakide Nematoden) charakterisiert sind, weisen Fische des Bathypelagials eine eher geringe Diversität und Prävalenz in Bezug auf die Parasitenfauna auf (Klimpel et al. 2006a).

In einer vergleichenden Studie untersuchten Klimpel et al. (2007) 200 mesopelagische Lachsheringe (*Maurollicus muelleri*) vom Mittel-Atlantischen-Rücken (MAR; ca. 1.650 m) und der Norwegischen Rinne (ND; 175-215 m) und wiesen helminthische, tetraphyllide Cestoden-Larven (*Scolex pleuronectis*) sowie *Anisakis simplex* s.s. als die häufigsten metazoischen Parasiten nach. Die Autoren zeigten, dass die Fische des MAR dabei eine deutlich geringere Parasitendiversität aufwiesen als die Fische der Norwegischen Rinne und führten dies auf die geringere Dichte potentieller Zwischen- und Endwirte im Mesopelagial zurück. In einer vorangegangenen Studie konnten Klimpel et al. (2006a) bereits durch parasitologische Studien von Fischen (*Macrourus berglax*, *Bathylagus euryops*, *Argentina silus*, *Borostomias antarcticus*, *Chauliodus sloani*, *Lampanyctus macdonaldi*) unterschiedlicher arktischer Tiefsee-Habitate der Grönland- und Irminger See nachweisen, dass die Parasitendiversität des Meso- und

Bathypelagials geringer ist, als die des Benthals. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ausführungen von Marcogliese (2002), nach welchen die Parasitendiversität mit zunehmender Tiefe im Pelagial sinkt, um dann am Benthal aufgrund des höheren Nahrungsangebotes wieder anzusteigen. Da viele Tiefseefische eher generalistisch in Bezug auf ihre Nahrungsaufnahme sind, spiegelt die unterschiedliche Diversität vermutlich weniger nahrungsökologische Unterschiede, als vielmehr die vertikale Verbreitung der Fische wieder (Klimpel et al. 2006a). Dies konnte ebenfalls durch eine kürzlich erschienene Studie bestätigt werden, in der 247 meso- und bathypelagische Fische des MAR parasitologisch sowie nahrungsökologisch untersucht wurden (Klimpel et al. 2010b). Die Autoren wiesen auch hier eine geringe Parasitendiversität von wirtsunspezifischen Parasitenarten in den Tiefenzonen nach und schlossen darauf, dass die Übertragung in diesen Habitaten eher durch Zufall als durch das Vorhandensein hoher Biomasse geprägt sein muss. Darüber hinaus zeigten sie am Beispiel des schlankschwänzigen Laternenfisches *Myctophum punctatum*, dass pelagische Fische ein wichtiges Bindeglied bei der Übertragung anisakider Nematoden (*Anisakis simplex* s.s., *A. pegreffii*) vom invertebraten Zwischenwirt auf weitere paratenische Zwischenwirte bzw. den Cetacea-Endwirt entlang des MAR sein können (Klimpel et al. 2010).

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Trotz kontinuierlicher Forschung auf dem Gebiet der ascaridoiden Nematoden und der verbesserten diagnostischen Methoden, ist das Wissen über die Biologie von *Anisakis* immer noch unzureichend. Die Zielsetzung der durchgeführten Studien bestand unter anderem darin, unter Verwendung molekularbiologischer und computergestützter Analyseverfahren, Fragestellungen zur Zoogeographie, (Co-)Phylogenie, Artdiagnostik, Lebenszyklus-Ökologie sowie des bioindikatorischen Potentials dieser Gattung zu bearbeiten und bestehende Wissenslücken zu schließen. Unter Berücksichtigung möglicher co-evolutiver Prozesse der Parasiten und ihrer Cetacea-Endwirte, wurde besonderes Augenmerk auf das potentielle Vorkommen spezies-spezifischer Verbreitungsmuster, die Verteilung der jeweiligen Arten in der Wassersäule sowie die Übertragungswege entlang verschiedener trophischer Stufen gelegt.

2 Ergebnisse

Im Folgenden werden theoretischer Hintergrund, Methodik, Ergebnisse und Teilaspekte der Diskussion der jeweiligen Einzelpublikationen separat zusammengefasst. Für eine vollständige Darstellung der Ergebnisse sowie der Diskussion sei an dieser Stelle auf die Originalarbeiten im Anhang dieser Dissertation verwiesen.

2.1 Klimpel S, Kuhn T, Busch MW, Karl H, Palm HW (2011) Deep-water life cycle of *Anisakis paggiae* (Nematoda: Anisakidae) in the Irminger Sea indicates kogiid whale distribution in north Atlantic waters. *Polar Biology* 34: 899-906

2.1.1 Zusammenfassung

Die Ordnung der Cetacea umfasst 86 rezente Arten, die sich in die beiden Unterordnungen Odontoceti (Zahnwale) und Mysticeti (Bartenwale) aufspalten (Nikaido et al. 2001, Jefferson et al. 2008). Während sich die Bartenwale hauptsächlich von Zooplankton ernähren, welches sie mit Hilfe sog. Barten aus dem Meerwasser filtern, ernähren sich Zahnwale vornehmlich von Cephalopoden, Fischen sowie seltener auch von anderen Meeressäugern (Perrin et al. 2009).

Die Superfamilie der Pottwale (Physeteroidea) umfasst neben der namensgebenden Familie Physeteridae mit nur einem einzigen Vertreter, dem Pottwal (*Physeter macrocephalus*), außerdem die beiden kleineren Walarten *Kogia sima* (Kleiner Pottwal) sowie *K. breviceps* (Zwergpottwal). Diese werden aufgrund ihrer bedeutend kleineren Größe in die Familie Kogiidae eingeordnet (Gowen et al. 2009, Jefferson et al. 2008). Beide Arten sind weltweit in Tiefsee-Habitaten entlang der Tropen und gemäßigten Breiten verbreitet. Während *K. sima* hauptsächlich im Bereich des Kontinentalschelfs vorkommt, ist *K. breviceps* Beobachtungen zufolge eher ozeanisch, fern des Kontinentalhanges verbreitet (Jefferson et al. 2008, Perrin et al. 2009). Da die Kogiiden jedoch auf See – nicht zuletzt wegen ihrer geringen Größe – schwierig auszumachen sind, basiert das Wissen über ihre Verbreitung weitestgehend auf gelegentlichen Strandungen, oder aber auf jenen Nachweisen, bei denen sie als Beifang von Fischern gemeldet wurden (Jefferson et al. 2008).

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass sich Parasiten als biologische Indikatoren für verschiedene ökologische Fragestellungen nutzen lassen (siehe Einleitung). Die

Studien belegen außerdem, dass die Parasitenfauna charakteristisch für die Stellung des Wirtes im Nahrungsnetz ist und wichtige Hinweise über das vertikale und horizontale Migrationsverhalten der Zwischen- und Endwirte liefert (z.B. Campbell et al. 1980, Klimpel et al. 2001, 2010b, Marcogliese 2002). Für die Vertreter der Gattung *Anisakis* ist bekannt, dass sie entlang der Artenkomplexe verschiedene Wirtspräferenzen ausgebildet haben und teilweise nur einige wenige bestimmte Wirtstierarten befallen (siehe 1.1.2). So sind zum Beispiel die einzigen bis dato nachgewiesenen Wal-Endwirte für *Anisakis paggiae* die beiden Kogiiden *K. breviceps* und *K. sima* (Mattiucci et al. 2005b, Valentini et al. 2006).

Im Rahmen der Studie „Deep-water life cycle of *Anisakis paggiae* (Nematoda: Anisakidae) in the Irminger Sea indicates kogiid whale distribution in north Atlantic waters“ wurden 21 gewöhnliche Fangzahnfische (*Anoplogaster cornuta*) aus der Irminger See (52°14.83'–58°44.74'N/37°01.09'–51°06.99'W) untersucht. Die Tiefseefische wurden im Juni 2003 an Bord des Fischerei-Forschungsschiffes Walther Herwig III im Rahmen eines ICES-Programms (International Council for the Exploration of the Sea) aus einer Tiefe von 300-950m gefangen und im Labor parasitologisch sowie nahrungsökologisch aufgearbeitet. Isolierte (L3) *Anisakis*-Larven wurden anhand von Sequenzanalysen des ribosomalen ITS1/5.8S/ITS2-Markers eindeutig identifiziert und anschließend phylogenetischen Analysen zugeführt.

Die Untersuchungen ergaben, dass mehr als die Hälfte der 21 *Anoplogaster cornuta* mit einem oder mehr anisakiden Nematoden befallen waren (Prävalenz P(%) = 57,1). Insgesamt konnten 26 Nematoden aus den Probenfischen entnommen werden, was einer mittleren Intensität von 2,2 Nematoden pro Fisch entspricht. Die Mageninhaltsanalysen ergaben Fisch als hauptsächlichen Nahrungsbestandteil, wobei 74,4% der Fische keinen Mageninhalt aufwiesen. Durch die Sequenz- und phylogenetischen Analysen konnten vier Nematoden der Art *Anisakis paggiae* zugeordnet werden. Die Sequenzen zeigten untereinander keine Variationen, unterschieden sich jedoch in sechs Basen von einer Genbank-Vergleichs-Sequenz von *A. paggiae*. Die phylogenetische Analyse des ribosomalen ITS-Markers ergab ein leicht abweichendes Verzweigungsmuster gegenüber dem, welches in vorangegangenen Studien des mitochondrialen Cytochrome-c-Oxidase (Untereinheit II) Markers berechnet wurde.

Durch den erstmaligen Nachweis des stenoxenen Parasiten *Anisakis paggiae* in der Tiefsee-Fischart *Anoplogaster cornuta* in der Irminger See, konnten Hinweise darauf geliefert werden, dass die Verbreitungsgrenze kogiider Wale weiter in den nördlichen Breiten liegt als bisher bekannt bzw. angenommen wurde. Die Abundanz und Prävalenz von *A. paggiae* in dem räuberischen, mesopelagischen *A. cornuta* deutet auf eine Rolle als (zweiter) Zwischenwirt im Lebenszyklus von *A. paggiae* hin. Die Lebensweise der bislang nachgewiesenen Zwischenwirte und das Fressverhalten der kogiiden Endwirte (z.B. Tiefsee-Teleostei, Cephalopoda, Crustacea) deuten auf einen meso-/bathypelagisch-orientierten Lebenszyklus von *A. paggiae* in der Grönland-See hin. Der hypothetische meso-/bathypelagische Lebenszyklus steht damit im Kontrast zu dem postulierten epipelagischen Zyklus von *Anisakis simplex* s.s. im Nord-Atlantik. Aufgrund vergleichbarer Ernährungsweisen der nachgewiesenen Endwirte werden ähnliche (mesopelagische?) Lebenszyklen für die Arten *A. physeteris* (Endwirt: Physeteridae), *A. brevispiculata* (Endwirt: Kogiidae), *A. ziphidarum* (Endwirt: Ziphyiidae) sowie *A. nascetti* (Endwirt: Ziphyiidae) postuliert. Die Sequenzunterschiede zwischen den sequenzierten Individuen und verwendeten *A. paggiae*-Referenzen aus *Theragra chalcogramma* aus japanischen Gewässern könnten Hinweis auf die Existenz einer Nord-Atlantik-Population von *A. paggiae* sein. Die Abweichungen im Verzweigungsmuster des phylogenetischen Baumes machen allerdings die Analyse weiterer hochvariabler Marker notwendig.

2.2 Kuhn T, García-Màrquez J, Klimpel S (2011) Adaptive radiation within marine anisakid nematodes: a zoogeographical modeling of cosmopolitan, zoonotic parasites. PLoS ONE: e28642

2.2.1 Zusammenfassung

Mit 20.000-25.000 Infektionen pro Jahr ist die Zahl der weltweit gemeldeten Anisakidosis-Erkrankungen als Folge der Aufnahme lebender anisakider Nematoden Larven in rohen oder unzureichend gegarten Fischprodukten ein nicht zu unterschätzendes medizinisches Problem (z.B. Hochberg & Hamer 2010). Obwohl ein Großteil aller gemeldeten Anisakidosis Fälle aus Ländern und Regionen stammen, in denen der Verzehr von rohen Fischprodukten traditionelle Ursprünge hat, werden auch in vielen Küstenstaaten Europas (Deutschland, Niederlande, Spanien, Frankreich,

Italien, USA, UK) sowie den USA, Kanada, Süd-Amerika und Afrika aufgrund der sich ändernden Ernährungsgewohnheiten immer wieder Fälle dieser zoonotischen Infektion gemeldet (Audicana & Kennedy 2008, EFSA 2010, Hochberg & Hamer 2010). Aufgrund der enormen Anzahl potentieller Zwischenwirte sowie dem ausgeprägten Migrationsverhalten der Cetacea Endwirte ist *Anisakis* (als Gattung) weltweit verbreitet (z.B. Mattiucci & Nascetti 2008). Durch die verbesserte Artdiagnostik mittels Verwendung molekularer Marker (siehe 1.1.4) konnte gezeigt werden, dass die ursprünglich aus drei Arten bestehende Gattung Cluster von morphologisch nahezu identischen "sibling species" (Schwesterarten) beinhaltet und sich in (derzeit) neun distinkte Arten aufteilt (z.B. Klimpel et al. 2010a, Mattiucci et al. 2009). Unklar dabei ist jedoch, ob jede dieser bis dato bekannten Arten in der Lage ist, klinische Anisakiasis-Symptome beim Menschen auszulösen. So gilt die Art *Anisakis simplex* s.s. zum Beispiel als der mit Abstand häufigste Auslöser, wohingegen *A. typica* bisher noch nicht mit Anisakiasis-Infektionen in Verbindung gebracht werden konnte. Die Ergebnisse vieler Studien deuten außerdem darauf hin, dass die verschiedenen *Anisakis* Arten unterschiedliche Verbreitungsmuster innerhalb der Ozeane haben und damit das ungleichmäßige Auftreten der Anisakiasis in verschiedenen Ländern und Regionen erklären könnte (z.B. Abollo et al. 2001, Klimpel et al. 2008a, 2010a, Mattiucci & Nascetti 2008, Mattiucci et al. 2009, Palm et al. 2008).

In der publikationsbasierten Metaanalyse „Adaptive radiation within marine anisakid nematodes: a zoogeographical modeling of cosmopolitan, zoonotic parasites“ wurden die Daten aus 53 fachspezifischen Publikationen mit den Ergebnissen eigener molekular-biologischer Analysemethoden kombiniert und auf diese Weise zum ersten Mal die Verbreitung der einzelnen *Anisakis*-Arten in den verschiedenen Ozeanen modelliert. Der Studie lagen die geographischen Daten von insgesamt 373 larvalen *Anisakis*-Individuen aus 30 Knochen- und Knorpelfisch-Wirten aus 21 Probenahme-Gebieten unterschiedlicher Klimazonen und Ozeane zugrunde, welche anhand des ribosomalen ITS1/5.8S/ITS2-Markers eindeutig den neun *Anisakis*-Arten zugeordnet werden konnten. In Kombination mit den molekularen Nachweisen aus den Literaturquellen konnte eine Datenbank mit insgesamt 584 Einzelnachweisen und den dazugehörigen Koordinaten erstellt werden. Dieses Datengerüst diente als Grundlage für eine übergreifende Interpolationsmethode, welche Aspekte von zwei verschiedenen Modellierungsmethoden („alpha-hull-interpolation“ nach Burgmann & Fox (2003); „conditional triangulation“ nach Raedig et al. (2010)) miteinander vereinte

(siehe 1.1.5). Unter Verwendung eines Geoinformationssystems (QGIS) wurden die geographischen Daten (den Fangorten entsprechend) auf ein Gitternetz mit der Auflösung von $1^\circ \times 1^\circ$ übertragen. Im Rahmen der nachfolgenden Interpolation wurde die sog. „alpha-hull“ berechnet und die darunterliegenden Quadrate jeweils als positiv für das Vorkommen der jeweiligen Art an einem bestimmten Ort gekennzeichnet. Die Ergebnisse wurden als farbige Flächen auf einer Landkarte für die neun beschriebenen *Anisakis* Arten vergleichend dargestellt. Durch die Verwendung von 25 verschiedenen alpha-Ausgangswerten konnte ein Farbgradient erzeugt werden, bei welchem die Farbintensität die Wahrscheinlichkeit für das Vorkommen der jeweiligen Art an einem bestimmten Ort widerspiegelt.

Die Ergebnisse der Modellierung weisen auf das Vorkommen spezies-spezifischer Verbreitungsmuster innerhalb der Klimazonen und Ozeane hin, welche in weiten Teilen mit der Verbreitung und dem Migrationsverhalten der für die jeweiligen (wirtsspezifischen) Arten nachgewiesenen Cetacea-Endwirte in Deckung zu bringen sind. Jene Arten, welche aktuellen phylogenetischen Analysen (siehe 2.1) zufolge besonders nah miteinander verwandt sind, zeigten, vermutlich aufgrund ähnlicher Wirtspräferenzen, darüber hinaus große Ähnlichkeiten in ihren Verbreitungsgebieten, was die Hypothese einer „kürzlich“ erfolgten Radiation innerhalb der Artenkomplexe unterstützt. So sind die Arten des *Anisakis simplex*-Komplexes (*A. simplex* s.s., *A. pegreffii*, *A. simplex* C) zum Beispiel hauptsächlich innerhalb des atlantischen Ozeans sowie im West und Ost Pazifik bis zur Antarktischen Halbinsel verbreitet. Alle drei Arten nutzen überwiegend ozeanische Delphinidae (z.B. *Delphinus delphis*, *Globicephala melas*) als Endwirte, welche für große Populationsdichten in diesem Bereichen bekannt sind und sich offshore von pelagischen Knochenfischen und Cephalopoden, also typischen *Anisakis*-Zwischenwirten, ernähren (siehe dazu 2.3). Im Gegensatz dazu zeichnete sich für die Art *A. typica* ein sehr eingeschränktes Verbreitungsgebiet entlang des Äquators ab. *Anisakis typica* ist ein typischer Parasit tropen- und subtropen-assoziierter Delphinidae wie *Stenella attenuata* oder *Tursiops truncatus*, welche sich typischerweise in flachen Gewässern nahe der Küste aufhalten.

Die Studie unterstützt damit vorangegangene Untersuchungen welche *Anisakis* spp. als geeignete Bioindikatoren für die Verbreitung und Populationsgröße ihrer Wal-Endwirte vorschlugen. Die Modellierung könnte darüber hinaus als Ausgangspunkt dienen um das Risiko einer Infektion in einem bestimmten Gebiet besser einschätzen zu können.

2.3 Kuhn T, Hailer F, Palm HW, Klimpel S (2013) Global assessment of molecularly identified *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Anisakidae) in their teleost intermediate hosts. *Folia Parasitologica* 60: 123-134.

2.3.1 Zusammenfassung

Durch die routinemäßige Anwendung molekularbiologischer Artidentifizierungsmethoden konnte der taxonomische Status der Gattung *Anisakis* grundlegend revidiert werden. Über die beschriebenen neun Arten (siehe 1.1.1) ist bekannt, dass sie neben der erwähnten morphologischen Ähnlichkeit über eine enorme genetische und insbesondere ökologische Heterogenität (z.B. Wirtspräferenz) und Zoogeographie verfügen (z.B. Klimpel et al. 2004, 2010a). Der hohe Forschungsaufwand bezüglich der Gattung *Anisakis* und die daraus resultierende große Menge unterschiedlicher Studien haben zu einer unübersichtlichen Fülle verschiedener Zwischen- und Endwirtsnachweise in der wissenschaftlichen Literatur geführt, welche oftmals (aufgrund rein morphologischer Bestimmungen) nicht den jeweiligen neun Arten zugeordnet werden konnten. Untersuchungen über spezifische Wirtmuster und Lebenszyklusstrategien waren dadurch erschwert (siehe 1.1.3). Das Zwischenwirts-Spektrum von *Anisakis* wurde zuletzt durch Mattiucci und Nascetti (2008) mit 68 Fisch- sowie 5 Cephalopoda-Arten angegeben (siehe 1.1.2). Die nachgewiesene Endwirtspezifität einiger *Anisakis*-Arten (siehe 2.1; I) und die Lebensweise ihrer Cetacea-Endwirte lassen vermuten, dass sich abweichende Lebenszyklus-Strategien auch in dem Zwischenwirt-Spektrum widerspiegeln. Eine weitere Fragestellung ergibt sich durch die Kontroverse hinsichtlich der Habitat-Präferenz von *Anisakis* (siehe 1.1.2). Während für die Vertreter der nahverwandten Gattung *Pseudoterranova* relativ einheitlich ein benthischer Lebenszyklus postuliert wird, gibt es über die Verbreitung von *Anisakis* entlang der Tiefenzonen keine einheitlichen Vermutungen (siehe dazu: Abollo et al. 2001, Klimpel et al. 2004, 2007a, 2008a, Mattiucci et al. 1997).

Im Rahmen der Studie „Global assessment of molecularly identified *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Anisakidae) in their teleost intermediate hosts“, wurden 330 *Anisakis*-Larven, aus 26 verschiedenen Knochenfisch-Spezies, anhand von Sequenzanalysen des ribosomalen ITS1/5.8S/ITS2-Markers bis zum kleinstmöglichen Taxon bestimmt. Die erbrachten Wirtsnachweise wurden mit den molekular geführten Literaturdaten aus 60 Publikationen in tabellarischer Form zusammengefasst. Die als Zwischenwirte geführten Knochenfisch-Arten wurden den Literaturquellen entsprechend (Froese & Pauly 2013) bezüglich ihres Tiefenhabitats kategorisiert.

Neben den Nachweisen von fünf beschriebenen *Anisakis*-Arten konnten zwei weitere bislang nicht klassifizierte (*Anisakis* sp. HC 2005, *Anisakis* sp. SAN 2004) *Anisakis*-Formen in den untersuchten Knochenfischen nachgewiesen werden. Vier Sequenzen konnten anhand des ITS-Markers nicht eindeutig zugeordnet werden und zeigten Übereinstimmungen, sowohl zu *A. simplex* s.s., *A. pegreffii* als auch zu *A. simplex* C. Eine Erweiterung des bekannten *Anisakis*-Wirtsspektrums ergab sich durch die Nachweise von *A. simplex* s.s. in *Anoplopoma fimbria* und *Cololabis saira*, *A. pegreffii* in *Caesio cuning*, *A. typica* in *Caesio cuning*, *Lepturacanthus savala* und *Katsuwonus pelamis*, *A. simplex* C in *Sebastolobus alascanus* sowie *A. physeteris* in *Synaphobranchus kaupii*. Insgesamt wurden 155 Zwischenwirte aus 71 Familien und 19 Ordnungen für *Anisakis* mit molekularen Methoden eindeutig für die neun *Anisakis*-Arten belegt. *Anisakis pegreffii* hatte mit 101 nachgewiesenen Arten das breiteste Wirtsspektrum. Die Kategorisierung der als Zwischenwirte bekannten Teleostei in Tiefenhabitats ergab ein Verhältnis von 72 demersalen zu 71 (bentho-) pelagischen Arten.

Es konnte gezeigt werden, dass der verwendete ribosomale ITS-Marker geeignet ist, die neun bislang bekannten *Anisakis*-Arten eindeutig voneinander zu unterscheiden. Die Existenz von Hybrid-Genotypen zwischen den Vertretern des *Anisakis-simplex*-Komplexes (siehe 1.1.1) konnte durch die Sequenzanalysen jedoch nicht ausgeschlossen werden und zeigte die Notwendigkeit zur Etablierung weiterer, hochvariabler Marker. Der häufige Nachweis von *A. pegreffii* in asiatischen Gewässern ist vermutlich durch den traditionsbedingten gesteigerten Konsum von Fischereiprodukten und das daraus resultierende wissenschaftliche Interesse für potentielle Krankheitserreger zu erklären (siehe II). Durch die Kategorisierung der Zwischenwirte in Tiefenhabitats entsprechend ihrer Lebensweise konnten indirekt Rückschlüsse über mögliche Habitat-Präferenzen der *Anisakis*-Arten gezogen werden. *Anisakis* ist daher generell als eher euryxen zu bezeichnen und prinzipiell in der gesamten Wassersäule verbreitet. Ähnliche Verbreitungsmuster zeigten sich dabei entlang eng verwandter Arten und weisen auf jüngere Abspaltungseignisse innerhalb der Gattung hin (siehe II). Die Übertragung auf den Endwirt muss aufgrund des pelagischen Fressverhaltens der Cetacea in der freien Wassersäule stattfinden. Es wird vermutet, dass dabei die piscivoren, paratenischen Zwischenwirte als wichtiges Bindeglied fungieren.

3 Diskussion

Im Rahmen dieser Dissertation wurden drei Einzelpublikationen vorgestellt, welche sich insbesondere mit der Zoogeographie und Lebenszyklus-Ökologie mariner Nematoden der Gattung *Anisakis* befassen. In der nachfolgenden Diskussion werden die wichtigsten Ergebnisse und Schlussfolgerungen der Einzelpublikationen aufgegriffen und unter den oben genannten Gesichtspunkten zusammenfassend erörtert. Zukünftige Fragestellungen, welche sich aus den Ergebnissen und Schlussfolgerungen ergeben, werden an entsprechender Stelle vorgestellt.

3.1 Zoogeographie

Die Verbreitung von *Anisakis*, welche bisher ausschließlich anhand von biogeographischen Einzelnachweisen abgeschätzt wurde, konnte durch den angewandten Modellierungsansatz erstmalig interpoliert und in Kartenform vergleichend dargestellt werden. Durch die durchgeführten zoogeographischen Modellierungen konnte gezeigt werden, dass die Verbreitung von *Anisakis* spp. in den Ozeanen nicht gleichmäßig ist. Die Analysen deuten darauf hin, dass die neun Vertreter dieser Gattung spezies-spezifische Verbreitungsmuster innerhalb der Klimazonen und Ozeane innehaben, welche vermutlich neben vielfältigen abiotischen Faktoren in erster Linie durch biotische Faktoren, wie die Verfügbarkeit und die Verbreitung ihrer Zwischen- und Endwirte sowie deren Tiefenverteilungen und Nahrungspräferenzen geprägt sind (II).

Das Verbreitungsgebiet von *Anisakis simplex* s.s. beschränkt sich den Berechnungen zufolge ausschließlich auf die Nördliche Hemisphäre und hier speziell auf den Atlantischen und Pazifischen Ozean sowie den westlichen Teil des Mittelmeeres. Nachweise unterhalb der 20° nördlicher Breite existieren für diese Art bislang noch nicht. Die Verteilung der Datenpunkte deutet auf ein Hauptverbreitungsgebiet im gesamten Nord-Atlantik hin. Eine Kumulation im westlichsten Teil des Nord-Pazifik in den Küstengewässern von Japan ist ähnlich wie bei *A. pegreffii* (s.u.) vermutlich auf das gesteigerte Forschungsinteresse der Wirtschaft bezüglich potentieller Schadorganismen in den kommerziell hoch bedeutenden und oftmals roh verzehrten Fischarten zurückzuführen (siehe 1.1.5).

Anisakis pegreffii, die zweite Art des *A. simplex*-Komplexes und Schwesterart von *A. simplex* s.s., ist überwiegend im Nord-Ost Atlantik entlang der Küstengebiete sowie

fast im gesamten Mittelmeer-Bereich verbreitet. Mehrfache Nachweise entlang der südafrikanischen sowie der südamerikanischen Ostküste und den antarktischen South Shetland Inseln erweitern das Gebiet in den Süd-Atlantik bis zum Südpolarmeer. Vielfache Meldungen entlang japanischer Gewässer deuten zwar auf eine starke Verbreitung in diesen Gebieten hin, sind vermutlich jedoch, ähnlich wie im Falle von *A. simplex* s.s., durch eine ungleichmäßige Beprobung beeinflusst. Die vereinzelt, isolierten Datenpunkte an der Südküste Neuseelands lassen keine eindeutigen Aussagen über die Verbreitung in diesem Gebiet zu.

Ähnliches gilt für *A. simplex* C, den dritten Vertreter des *A. simplex*-Komplexes. Die disjunkte Verteilung der geographischen Nachweise entlang der Nordwest-Pazifikküste, dem Südpolarmeer und der Wedell See, der Südküste Afrikas sowie zwischen Australien und Neuseeland ließen keine Interpolation der Daten zu. Um verlässlichere Aussagen über potentielle Endemie-Gebiete von *A. simplex* C treffen zu können, sind deutlich mehr als die hier eingeflossenen 77 Nachweise notwendig. *Anisakis ziphidarum* und die erst kürzlich beschriebene Schwesterart *A. nascettii* wurden vereinzelt im Zentral- und Süd-Atlantik sowie Neuseeland nachgewiesen. Da *A. ziphidarum* zusätzlich auch im West-Atlantik entlang Mittelamerikas nachgewiesen wurde, ist es wahrscheinlich, dass sich das Verbreitungsgebiet dieser Spezies auf den gesamten Zentral-Atlantik erstreckt. Die wenigen Datenpunkte für *A. nascettii* lassen hier jedoch keine gesicherten Aussagen zu. *Anisakis typica* ist ausschließlich entlang der Tropen und Subtropen nachgewiesen worden. Trotz der modellierten, disjunkten Verbreitung ist aufgrund der Einzelnachweise im Zentral-Pazifik und der Arabischen See vermutlich von einer zirkumglobalen Verbreitung auszugehen. Die Verbreitung der drei Arten des *A. physeteris*-Komplexes ist sehr ähnlich und hauptsächlich auf den Zentral-Atlantik sowie vereinzelt auch auf süd-afrikanische und im West-Pazifik auf japanische Gewässer beschränkt. *Anisakis physeteris* ist zusätzlich fast im gesamten Mittelmeer nachgewiesen worden. Für *A. paggiae* existiert darüber hinaus ein isolierter Nachweis an der neuseeländischen Küste.

Obwohl sich das Wirtsspektrum der Arten des *Anisakis simplex*-Komplexes (*A. simplex* s.s., *A. pegreffii*, *A. simplex* C) sowie *A. typica* weitestgehend auf Delphinidae beschränkt, zeigen sich entlang der Arten unterschiedliche Präferenzen, aus denen sich vermutlich das unterschiedliche geographische Vorkommen der jeweiligen Art ableiten lässt.

A. simplex s.s. unterscheidet sich von den anderen Arten in fünf Endwirtnachweisen (*Balaenoptera acutorostrata*, *Delphinapterus leuca*, *Lagenorhynchus albirostris*, *Orcinus orca*, *Phocoena phocoena*). Insbesondere der Weißschnauzendelfin *L. albirostris* kommt ausschließlich im Nordatlantik vor, was vermuten lässt, dass er eine maßgebliche Rolle im Lebenszyklus dieser Parasitenart spielt (Jefferson et al. 2008, Klimpel et al. 2007a). Ähnliches gilt für den Schweinswal *P. phocoena* sowie den monodontiden Weißwal *D. leucas*, welche hauptsächlich in der nördlichen Hemisphäre (Nord-Atlantik, Nord-Parzifik) verbreitet sind (Culik 2004, Jefferson et al. 2008). Der Langflossen-Grindwal *Globicephala melas* (*melas*) besitzt ebenfalls ein charakterisches Verbreitungsgebiet innerhalb des Nord-Atlantiks. Bei diesem Wal konnte gezeigt werden, dass ommastrephide Cephalopoden einen großen Anteil seiner Nahrung ausmachen (Gonzales et al. 1994). Abollo et al. (2001) untersuchten 1.370 Individuen dieser Familie und wiesen *A. simplex* s.s. mit einer Prävalenz von bis zu 34,28% nach. Adulte Exemplare dieser Art aus *Globicephala melas* wurden eindeutig als *A. simplex* s.s. identifiziert (Abollo et al. 2001). Welche Bedeutung der Schwertwal *Orcinus orca* in dem Lebenszyklus von *A. simplex* s.s. hat, ist dagegen unklar. Obwohl *O. orca* weltweit verbreitet ist, kommt er in größeren Populationen vorwiegend in nördlichen Gewässern des Atlantiks und weniger in Tropennähe vor. Für *Anisakis pegreffii* sind lediglich sechs marine Säuger als Endwirte nachgewiesen (siehe Tab.1). Übereinstimmungen in den Verbreitungsgebieten zwischen Parasit und Wirt sind hier zwar nicht so deutlich wie bei der Schwesterart *A. simplex* s.s., jedoch lässt sich das grundlegende Verbreitungsmuster ebenfalls mit der Verbreitung der Endwirte in Relation setzen. Der gemeine Delfin (*Delphinus delphis*) bevorzugt wärmer temperierte Gewässer der Tropen und Subtropen und ist vermutlich mitverantwortlich für die Verbreitung von *A. pegreffii* im Ost-Atlantik, dem Mittelmeerraum sowie dem Westpazifik (Culik 2004). *Caparea marginata*, der Zwergglattwal, lebt ausschließlich auf der Südhalbkugel in einem vergleichsweise schmalen Streifen entlang der Antarktischen Konvergenz. Eine Verbreitung von *A. pegreffii* bis in neuseeländische Gewässer ist vermutlich auf diesen Wal zurückzuführen. Im Gegensatz zu *A. simplex* s.s. deutet die Modellierung auch auf eine Verbreitung von *A. pegreffii* im Zentral-Atlantik hin. Die Kosmopoliten *Ziphus cavirostris*, *Physeter macrocephalus* sowie *Stenella coruleoalba* könnten wesentlich dazu beitragen.

Anisakis simplex C wurde ausschließlich in den vier Delphiniden *Lissodelphis borealis*, *Pseudorca crassidens*, *Globicephala melas* und *Mesoplodon layardii* nachgewiesen.

Lissodelphis borealis kommt vorwiegend in temperierten und subarktischen Gewässern des Nord-Pazifiks vor und könnte daher eine zentrale Rolle für die Verbreitung *A. simplex* C entlang der Nordamerikanischen Westküste spielen. Für den Langflossen Grindwal (*G. melas*) existieren den Literaturangaben zufolge zwei Subspezies mit unterschiedlicher geographischer Verbreitung. *Globicephala melas melas* kommt demnach ausschließlich im Nord Atlantik vor wobei *G. melas edwardii* circumglobal in der südlichen Hemisphäre verbreitet ist. Die Abwesenheit von *A. simplex* C im Nord Atlantik lässt darauf schließen, dass *G. melas melas* entweder nicht zum Wirtsspektrum dieses Parasiten gehört, oder dass *G. melas edwardii* nicht bis in die nördliche Hemisphäre vordringt.

Das Endwirts-Spektrum von *A. typica* schließt neben dem pontoporidaen *Pontoporia blainvillei* und dem Kogiiden *Kogia breviceps* eine große Bandbreite delphinider Wirte ein. Das spezifische Verbreitungsmuster von *A. typica* nahe des Äquators wird in diesem Fall auf die Nutzung von tropen- und subtropenassoziierten Delphiniden wie zum Beispiel *Stenella attenuata* und *Steno bredanensis* (beide Delphinidae) zurückgeführt. Diese sind im Gegensatz zu den delphiniden Endwirten von *A. simplex* s.s. weniger ozeanisch sondern mehr küsten-orientiert und besonders in diesen Bereichen mit hohen Populationsgrößen vertreten (Klimpel et al. 2008a, Palm et al. 2008). Die Tatsache, dass sich das Verbreitungsgebiet einiger Wirte jedoch weit über jenes von *A. typica* hinaus erstreckt (z.B. *Globicephala melas*) ist ein Indiz dafür, dass nicht nur die Endwirtsvorkommen maßgeblich für die Verbreitung des Parasiten sein können.

Die beiden Schwesterarten *Anisakis ziphidarum* und *A. nascettii* zeigen im Vergleich zu den übrigen Vertretern der Gattung eine enorme Wirtsspezifität. Die Verbreitung der beiden Arten ist prinzipiell sehr ähnlich und spiegelt die enge phylogenetische Verwandtschaft wieder. Beide wurden ausschließlich als Parasiten ziphiider Wale nachgewiesen, wobei *A. ziphidarum* neben Vertretern der Gattung *Mesoplodon* (Zweizahnwale) zusätzlich aus dem Schnabelwal *Ziphius cavirostris* isoliert wurde. *Mesoplodon bowdoini*, *M. grayi* sowie *M. layardii* zeigen eine circumglobale Verbreitung auf der Südhalbkugel und erweitern das Verbreitungsgebiet von *A. ziphidarum* und *A. nascettii* bis nach Neuseeland und Tasmanien. Für *Mesoplodon mirus* ist ein diskontinuierliches Verbreitungsmuster im Zentral-Atlantik sowie in der Südhemisphäre nachgewiesen. Die Population des Zentral-Atlantiks überschneidet sich dabei deutlich mit der Verbreitung der Parasiten. Die eindeutigste Parallele in der

Verbreitung zeigt sich bei dem Gervais-Zweizahnwal *M. europaeus*, welcher nur im Zentral-Atlantik vorkommt. Auch wenn die Datengrundlage zur Modellierung der Verbreitung der beiden Schwesterarten nicht sehr solide ist, so scheinen sich auch bei diesen Arten geographische Parallelen zwischen den Parasiten und ihren Wirten abzuzeichnen.

Das vergleichsweise homogene Auftreten der drei Vertreter des *Anisakis physeteris*-Komplexes (*A. physeteris*, *A. brevispiculata*, *A. paggiae*) im Zentral-Atlantik spiegelt ihre enge phylogenetische Verwandtschaft wieder (siehe I). Ähnlich wie *A. ziphidarum* und *A. nascettii* zeigt *A. physeteris* eine erhöhte Wirtsspezifität. So weisen alle drei Arten klare Wirtspräferenzen für die kogiiden *Kogia breviceps* und *K. sima*, während *A. physeteris* die einzige Art des Komplexes ist, welche zusätzlich den Pottwal *Physeter macrocephalus* parasitiert.

Die Zoogeographie der Nematoden, wie sie in dieser Form modelliert wurde, weist grundlegende Übereinstimmungen mit der Verbreitung und dem Fressverhalten der Endwirte auf und lässt vermuten, dass diese maßgeblich zur spezifischen Verbreitung der Parasiten beitragen. Ähnlichkeiten in den Verbreitungsgebieten spiegeln die teilweise enge stammesgeschichtliche Abstammung der Parasiten und Übereinstimmungen in deren Wirtsspektren wieder, welche eine Theorie auf mögliche Co-Speziations-Ereignisse zwischen *Anisakis* und ihren Cetacea-Endwirten unterstützen (siehe 1.1.2, Mattiucci & Nascetti 2006, 2008, Mattiucci et al. 1997, 2009). Da die Verbreitung der Parasiten jedoch nicht in jedem Fall nur auf das Vorhandensein der jeweiligen nachgewiesenen Endwirte zurückzuführen sein kann, müssen weitere biotische und abiotische Faktoren, welche einen Einfluss auf die Verbreitung eines Parasiten und dessen Zwischenstadien haben können, berücksichtigt werden. Klimpel & Rückert (2005) zeigten zum Beispiel anhand des Raphidascaeriden *Hysterothylacium aduncum* in der zentralen und nördlichen Nordsee, dass die Ausbreitung und Abundanz mariner Helminthen stark durch physikalische Systeme (Vermischung/Stratifikation von Wassermassen) geprägt ist. Durch eine Stratifikation der Wassermassen wurde der Transfer von Parasiten auf den nächsten Wirt begünstigt, was sich in erhöhten Parasitierungsraten der untersuchten Fischarten (*Melanogrammus aeglefinus*, *Merlangius merlangus*) in diesen Gebieten widerspiegelte.

Einen weiteren Aspekt welcher bislang noch ungeklärt ist, stellt der Einfluss von Meeresströmungen und unterschiedlichen Temperaturbedingungen auf das

Überleben und die Verbreitung von Nematoden-Zwischenstadien dar. Bratney & Clark (1992) demonstrierten, dass der Schlupfzeitpunkt von *Anisakis*-Larven abhängig von der Wassertemperatur ist. Larven, welche bei 24,3°C inkubiert wurden, schlüpften bereits nach drei Tagen, während solche die bei 1,9°C inkubiert wurden bis zu 81 Tage benötigten. Die Schlupfrate bei dieser Untersuchung lag zwischen 30-60%. Die Überlebensdauer der bereits geschlüpften Larven war dabei ebenfalls temperaturabhängig und variierte zwischen 3 (24,3°C) und 105 (8,6°C) Tagen. Starke Meeresströmungen wie etwa der Golfstrom, mit einer Geschwindigkeit von durchschnittlich 6,4 km/h (NOAA 2013), könnten die Zwischenstadien der Nematoden rein rechnerisch bis zu 153,6 km pro Tag weit befördern. Dieses Szenario scheint vor den sich (trotz gewisser Einschränkungen) abzeichnenden spezifischen Verbreitungsgebieten vermutlich nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, sollte aber in zukünftigen Studien berücksichtigt werden. Besonders geeignet für solche Untersuchungen sind die beiden Arten *A. simplex* s.s. und *A. typica*, da sie sehr differenzierte Verbreitungsgebiete in Nordatlantik bzw. entlang der Tropen und Subtropen haben. Es ist zu erwarten, dass der Einfluss unterschiedlicher Temperaturen bei diesen Arten (sofern vorhanden) am deutlichsten ausfällt.

Die angewendete Methode zur Interpolation der zoogeographischen Einzelnachweise basierte auf zwei Ansätzen. Raedig et al. (2010) entwickelten ihre geometrische Interpolationsmethode, um die Zoogeographie und Artenvielfalt endemischer Angiosperma der Neotropen zu modellieren. Die Alpha-hull-Methode nach Burgmann & Fox (2003) stellt eine Erweiterung der Convex-hull nach Edelsbrunner et al. (1993) dar und dient generell dazu, Verbreitungsgebiete anhand räumlicher Einzelnachweise zu berechnen.

Bei der Methode handelt es sich wie bei vielen anderen Interpolationsmethoden um einen Ansatz, welcher ausschließlich sog. „presence-only“ Informationen bezüglich des Vorkommens einer Art in einem bestimmten Gebiet enthält und verarbeitet. Informationen über das Nicht-vorkommen gibt es in diesem Fall nicht. Nach Lindenmayer & Burgmann (2005) ist die einfachste Methode ein Verbreitungsgebiet zu kartieren jene, bei der eine Linie um alle bekannten Datenpunkte gezogen wird. Dieses als sog. Minimum-Convex-Polygon bezeichnete Gebiet enthält zwar alle bekannten Datenpunkte, überschätzt die wahre Verbreitung einer Art jedoch (Burgmann & Fox 2003, Lindenmayer & Burgmann 2005, Raedig et al. 2010). Als

Alternative dazu kann die sog. Alpha-hull berechnet werden. Dazu werden im Rahmen einer Delauney-Triangulation alle Datenpunkte mit Linien verbunden, ohne dass diese sich untereinander überkreuzen. Aus der Durchschnittslänge dieser Linien berechnet sich der Wert „alpha“. Im nächsten Schritt werden alle Linien gelöscht, welche oberhalb eines bestimmten Cut-offs-Werte liegen, welcher wiederum ein beliebiges Vielfaches des berechneten alpha-Wertes darstellt. Die verbleibenden Dreiecke geben dann ein grobes Abbild des Verbreitungsgebietes einer Art wieder. Wie auch bei der hier angewandten Methode sind solche Berechnungsmethoden sowohl von der Qualität, als auch von der Quantität der zugrundeliegenden Datenpunkte abhängig. Um taxonomische Fehlinterpretationen der morphologisch nahezu identischen *Anisakis*-Arten weitestgehend zu vermeiden, wurden in die Analyse ausschließlich geographische Nachweise eingeschlossen, bei denen die Artidentifizierung anhand molekularbiologischer Methoden (direkte Sequenzierung, AFLP, RFLP, etc.) geführt wurde. Die Verlässlichkeit dieser Methode ist dabei letztendlich durch die korrekte Artidentifizierung und Annotation der Referenzen in der Genbank (NCBI) begrenzt. Um das Problem der Abweichung und Verfälschung der Verbreitungsgebiete durch den ungleich verteilten Forschungsaufwand entlang der *Anisakis*-Arten zu verringern, wurden jeweils die unterschiedlich stark interpolierten Verbreitungsgebiete, welche sich durch die Verwendung unterschiedlicher Cut-Off-Werte (alpha: siehe 1.1.5) ergaben, für 25 verschiedene alpha-Werte (2-50) übereinander gelegt. Durch die Einfärbung mit unterschiedlichen Farbtintensitäten wurden jene Gebiete hervorgehoben, in denen vermehrt Nachweise in enger Nachbarschaft dokumentiert wurden. Diese dunkelrot eingefärbten Bereiche stellen somit Gebiete dar, in denen das Auffinden einer bestimmten Art in den Zwischen- und Endwirten wahrscheinlicher ist, (oder eben häufiger nachgewiesen wurde). Trotz des Einbezugs verschiedener Aspekte aus teilweise etablierten zoogeographischen Interpolationsmethoden sind die berechneten Schätzungen über die Verbreitung der *Anisakis*-Arten in den Ozeanen und Klimazonen nur eine grobe Annäherung. So bleiben die vielfältigen abiotischen Faktoren, welche Einfluss auf die Verbreitung einer Art haben können, bei dieser Methode vollständig unberücksichtigt.

3.2 Phylogenie und Artdiagnostik

Die Phylogenie der Gattung *Anisakis* ließ sich durch die durchgeführten Berechnungen in weiten Teilen bestätigen. Die Gattung ist zweigeteilt in die beiden großen Kladen I

und II, wobei die erste Klade den *A. simplex*-Komplex mit *A. simplex* s.s. und *A. pegreffii* als Schwesterarten sowie *A. simplex* C als Monophylum enthält. Darüber hinaus werden auch die Arten *A. ziphidarum* und *A. nascettii*, sowie *A. typica* in diese Klade eingeordnet. Die zweite Klade enthält ausschließlich den *A. physeteris*-Komplex mit *A. paggiae* als monophyletische Art. Abweichungen zu vorangegangenen Studien des *cox2*-Markers bestanden dabei in der Positionierung von *A. typica* innerhalb der Klade I. Analysen von Mattiucci & Nascetti (2006, 2008) und Mattiucci et al. (2009) positionierten *A. typica* als Monophylum in einer gemeinsamen Abstammungslinie mit dem *A. simplex*-Komplex. Colón-Llavina et al. (2009) dagegen gruppierten diese Art als Schwesertaxon mit einem gemeinsamen Vorfahren mit *A. ziphidarum* und *A. nascettii* (*Anisakis* sp.). Beiden Darstellungen ist dabei gemeinsam, dass die entsprechenden Abspaltungseignisse mit jeweils nur geringen Bootstrapping-Werten von (60-65%) unterstützt wurden. In der durchgeführten Maximum-Likelihood Analyse des ITS-Markers mit 1.000 Bootstrap-Replikaten wurde *A. typica* als Monophylum in der ersten Klade mit gemeinsamer Abstammungslinie zum *A. simplex*-Komplex und *A. ziphidarum* bzw. *A. nascettii* positioniert. Die Abzweigung wurde dabei mit einem Bootstrap-Wert von 100% unterstützt. In jedem Fall scheint *A. typica* eine Sonderstellung innerhalb der Gattung *Anisakis* einzunehmen, da diese Art sich durch eine besonders hohe genetische Distanz (intra/interspezifisch) im Vergleich zu den anderen Vertretern auszeichnet (siehe auch Kuhn 2010, Nadler et al. 2005). Palm et al. (2008) wiesen bereits in einer Stichprobe von 21 *A. typica* aus Indonesien zwei verschiedene genotypische Ausprägungen nach, welche als *A. typica* cf. 1 HWP 2008, bzw. *A. typica* cf. 2 HWP 2008 bezeichnet wurden. Dabei schlossen die Autoren das Vorkommen einer Indonesien-spezifischen Linie nicht aus. Ob die Art *A. typica* ihrerseits möglicherweise einen Komplex verschiedener sibling species darstellt, kann nur durch weitere Analysen entsprechender Stichproben aus unterschiedlichen geographischen Regionen und Wirten bewertet werden. Zusätzlich ist die Sequenzierung weiterer (hochauflösender) Marker unumgänglich, da der verwendete ITS-Marker über eine nicht ausreichende Anzahl informativer Positionen verfügt, um derartige Fragestellungen untersuchen zu können. Dies zeigte sich zusätzlich in der Tatsache, dass durch die geführten Sequenzanalysen kein nennenswerter Fortschritt zur Klärung der Existenz oder nicht-Existenz mutmaßlicher Hybrid-Genotypen zwischen *A. simplex* s.s. und *A. pegreffii* und damit auch mögliche Introgressionsereignisse gemacht werden konnte.

Die Co-phylogenetischen Analysen durch Mattiucci & Nascetti (2006, 2008) basieren auf den oben vorgestellten molekularen Sequenzanalysen des mtDNA *cox2*-Markers mit *A. typica* als Teil einer gemeinsamen Klade mit dem *A. simplex*-Komplex. Im Kontext der Theorie zur Co-Speziation von *Anisakis* und ihren Cetacea-Endwirten erscheint diese Darstellung als die naheliegendere, da sich die vier betreffenden Arten (*A. simplex*-Komplex: *A. simplex* s.s., *A. pegreffii*, *A. simplex* C, *A. typica*) in ihren bislang nachgewiesenen Endwirten deutlich stärker ähneln als es bei *A. typica* und *A. ziphidarum* bzw. *A. nascettii* der Fall ist. Problematisch dabei ist, dass die phylogenetische Rekonstruktion (Nikaido et al. 2001) nur einen geringen Anteil des bekannten *Anisakis* Wirtsspektrums umfasst. Um differenziertere Informationen über mögliche Co-Speziations-, „missing the boat-“, host-switching-, Hybridisierungs- und damit potentiell einhergehenden Introgressions-Ereignissen zu erhalten, sollten verschiedene Aspekte in zukünftigen Studien berücksichtigt werden. (i) Die Anzahl eingeschlossener Taxa sollte sowohl auf Parasit-, mindestens aber auf der Wirt-Seite erhöht werden, um ein möglichst breites Wirtsspektrum abzudecken. (ii) Den Analysen sollten idealerweise Sequenzdaten mehrerer, verschiedener, hochauflösender Marker (z.B. Mikrosatelliten) zugrundeliegen. (iii) Durch die Verwendung hochspezifischer (high-fidelity) Polymerasen kann die Sequenzgenauigkeit der Amplifikate zusätzlich erhöht werden. (iv) Die Einbeziehung großer Stichproben natürlicher Populationen ermöglicht Rückschlüsse auf mögliche Hybridisierungsereignisse.

3.3 Lebenszyklus-Ökologie

Durch die umfangreiche Zusammenstellung und anschließende Kategorisierung der (mit molekularen Methoden) geführten Zwischenwirtsnachweise konnten indirekte Rückschlüsse über die vertikale Verbreitung von *Anisakis* spp. entlang der Tiefenhabitate gezogen werden. Auf Ebene der Gattung wurde *Anisakis* (wenig wirtsspezifisch) in Fischen verschiedener trophischer Stufen und in pelagischen, benthopelagischen sowie demersalen Habitaten nachgewiesen.

Während Mattiucci et al. (1997) sowie Abollo et al. (2001) einen benthisch/demersal orientierten Lebenszyklus der Art *A. simplex* s.s. postulierten, lieferte die durchgeführte Metaanalyse der Fisch-Zwischenwirte Hinweise auf einen Lebenszyklus in der freien Wassersäule (pelagisch/benthopelagisch) (I). Eine ähnliche Verteilung fand sich dabei auch bei den zwei anderen Vertretern des *A. simplex*-Komplexes. Dies steht im

Kontrast zu der Studie von Abollo et al. (2001), welche in einer Stichprobe von 1.685 untersuchten pelagischen Cephalopoden zwar *A. simplex* s.s. mit Prävalenzen von bis zu 34,28% identifizierten, jedoch keinen Nachweis von *A. pegreffii* erbringen konnten. Während ommastrephide Cephaloda für *A. simplex* s.s. wahrscheinlich eine wichtige Rolle im Lebenszyklus spielen, die nicht zuletzt auch zu der charakteristischen Zoogeographie dieses Parasiten beiträgt (siehe oben; *Globicephala melas melas*), scheinen Cephalopoden im Lebenszyklus von *A. pegreffii* eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. Trotz der Ähnlichkeiten in den vertikalen Verteilungsmustern zu *A. simplex* s.s. und *A. pegreffii* erlaubt die vergleichsweise dünne Datenlage molekularer Wirtsnachweise im Falle von *A. simplex* C keine eindeutigen Aussagen über mögliche Habitats- und/oder Zwischenwirts-Präferenzen. Aufgrund der Ernährungsweise der delphiniden Endwirte (siehe I) ist ein pelagisch orientierter Lebenszyklus auch bei dieser Art wahrscheinlich. Während sich für die nahe verwandten Arten des *A. simplex*-Komplexes bezüglich der Tiefenhabitats ein relativ homogenes Bild ergibt, so ist die Verteilung bei den übrigen Vertretern der Gattung deutlich heterogener (III). Allen gemeinsam ist dabei ein geringerer Anteil bentho-pelagisch lebender Zwischenwirte bei ansonsten variierenden Anteilen demersaler bzw. rein pelagischer Fische. Aufgrund der schlechten Datenlage, von teilweise weniger als 10 Fischnachweisen pro Art, ist das Ergebnis wenig aussagekräftig und lässt nur bedingt Rückschlüsse auf die Lebenszyklus-Strategien zu. Durch die parasitologischen Studien des gewöhnlichen Fangzahnfisches *Anoplogaster cornuta* aus der Irminger See (I) konnte jedoch gezeigt werden, dass zumindest *A. paggiae* einen meso-/bathypelagischen Lebenszyklus im Nordatlantik vollzieht und räuberische, pelagische Fische wie *A. cornuta* wichtige Überträger des Parasiten von Invertebraten auf größere paratenische Zwischenwirte (Fische, Cephalopoda) sind. Am Beispiel von 247 meso- und bathypelagischen Fischen des MAR konnten Klimpel et al. (2010b) dies bereits für die Arten *A. simplex* s.s. und *A. pegreffii* nachweisen. Aufgrund vergleichbarer Ernährungsweisen der bis dato nachgewiesenen Endwirte ist zu erwarten, dass die Arten *A. physeteris* (Endwirt: Physeteridae), *A. brevispiculata* (Endwirt: Kogiidae), *A. ziphidarum* (Endwirt: Ziphiidae) sowie *A. nascettii* (Endwirt: Ziphiidae) eine ähnliche Verbreitung wie *A. paggiae* besonders entlang der Tiefsee-Habitats aufweisen. Aufgrund der pelagischen Lebensweise der großen Cetacea-Endwirte (z.B. *Physeter* sp.) ist es für eine erfolgreiche Vervollständigung des Lebenszyklus notwendig, dass sich das Vorkommen infektiöser Stadien durch die Einbindung von Zwischenwirten wie (paratenischen)

Fischen und Cephalopoden zu einem bestimmten Zeitpunkt vom Demersal in die freie Wassersäule verlagert. Dabei wird vermutet, dass die Gründe für die Evolution solcher komplexer (mehrwirtigen) Lebenszyklen in einer gesteigerten Fitness der Wirte durch das Einbeziehen neuer (größerer) Wirte und der erhöhten Übertragungswahrscheinlichkeit auf den Endwirt liegen (Hammerschmidt et al. 2009, Choisy et al. 2003). So ist die Verwendung von Transport- bzw. paratenischen Zwischenwirten im marinen Milieu ein sehr weit verbreitetes Konzept. Derartige Wirtstypen ermöglichen den parasitischen, infektiösen Stadien ein längeres Überleben in dem sehr verdünnten Medium (in welchem sie leben) und erhöhen so die Wahrscheinlichkeit einer Aufnahme in den nächsten Wirt, und damit letztendlich auch ihre Überlebenschance (Marcogliese 1995, 2002, 2005). Im Falle der Aufnahme eines paratenischen Zwischenwirtes durch den Endwirt werden gleichzeitig eine große Anzahl infektiöser Stadien übertragen, was insbesondere bei geschlechtlich differenzierten Parasiten wie den anisakiden Nematoden eine erfolgreiche Vermehrung begünstigt. Parker et al. (2003) erstellten ein mathematisches Modell zur Entstehung komplexer Lebenszyklen (upward/downward incorporation) helminthischer Parasiten und sahen eine verzögerte Geschlechtsreife, erhöhte Körpergröße und das damit einhergehende gesteigerte Reproduktionsvermögen als die treibende Kraft an. Die infektiösen Stadien (L3) von *Anisakis* sind prinzipiell in der gesamten Wassersäule vorhanden, wodurch sich die Übertragungswahrscheinlichkeit auf den Endwirt im Vergleich zu weniger generalistischen Arten deutlich erhöht.

Eine genauere Bewertung potentiell abweichender Lebenszyklus-Strategien ergibt sich in zukünftigen Studien durch die weitere Beprobung von Zwischenwirten aus sämtlichen trophischen Ebenen. Insbesondere ist die Datenlage zur Prävalenz und Abundanz anisakider Nematoden in Cephalopoda und Crustacea noch unzureichend. Die Probennahme sollte dabei unter besonderer Berücksichtigung bislang wenig oder unbeprobter geographischer Regionen, Tiefenhabitats und Wirtsarten durchgeführt werden. Die Identifizierung adulter *Anisakis* aus ihren Endwirten ist aufgrund des Washingtoner Artenschutzübereinkommens (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, CITES) ebenso wegen des in fast allen Nationen geltenden Verbots zur Jagd auf Wale durch das Moratorium der Internationalen Walfangkommission (IWC), auf Individuen beschränkt, welche im Rahmen verschiedener Sektionen, gestrandeter und verendeter Tiere gesammelt wurden und zu denen oft nur ein kleiner Kreis von Forschern Zugang hat. Eine

Verbesserung der Datenlage lässt sich dabei nur durch eine internationale Zusammenarbeit der Spezialisten und den Austausch gesammelten Probenmaterials erreichen.

3.4 *Anisakis* als Bioindikator

Parasiten wurden bereits vielfach als Bioindikatoren für verschiedenste biologische Fragestellungen verwendet (siehe Einleitung). Die Tatsache, dass viele Parasiten trophisch von einem Wirt auf den anderen übertragen werden, ermöglicht es, ökologische Informationen über ihre Wirte und deren Interaktionen in einem Ökosystem zu sammeln (Marcogliese & Cone 1997). Der Befall mariner Organismen hängt einerseits von den zur Verfügung stehenden Wirtsorganismen und andererseits von abiotischen Faktoren wie z.B. Temperatur und Salinität ab (z.B. Klimpel & Rückert 2005). Während nahrungsökologische Untersuchungen wie etwa die Analyse des Magen- und Darminhaltes lediglich nur Momentaufnahmen trophischer Beziehungen darstellen, lassen sich durch Parasiten langfristige trophische Interaktionen zurückverfolgen (z.B. Campbell et al. 1980, Klimpel et al. 2004, Klimpel & Rückert 2005). Das Vorhandensein eines Parasiten in einem Wirt impliziert dabei, dass weitere Wirte des Lebenszyklus in einem Ökosystem vorhanden sind. Der Nachweis infizierter Wirte, welche eine späte Position im Lebenszyklus eines Parasiten einnehmen, lässt Rückschlüsse über das Fressverhalten zu (Marcogliese & Cone 1997). Ist das Wirtsspektrum eines Parasiten bekannt, so kann man prinzipiell durch dessen Nachweis auch indirekt auf die Prävalenz und Abundanz der jeweiligen Wirte in einem bestimmten Gebiet schließen, da ihr Vorhandensein für die Vollendung des Lebenszyklus zwingend notwendig ist (Marcogliese 2005). Zwar können Parasiten in einem bestimmten Gebiet auch unabhängig von der Gegenwart geeigneter Endwirte nachgewiesen werden, etwa durch das Migrationsverhalten von Zwischenwirten, jedoch ist für die Aufrechterhaltung von Populationen, insbesondere in großskaligen Habitaten wie dem marinen Lebensraum, das Beibehalten einer kritischen Masse vermehrungsfähiger Stadien unumgänglich. Zumindest für direkt übertragene (z.B. terrestrische Makroparasiten) gilt, dass die örtliche Verbreitung durch eine Anzahl mehr oder weniger uniform bewohnter „Inseln“, nämlich ihre Wirte repräsentiert wird, wobei die Umgebung zwischen diesen Inseln für den Parasiten ungünstig ist (Stanko et al. 2006). Daher ist die Häufigkeit der Wirte ein wichtiger Faktor, welcher auch die

Verbreitung und Häufigkeit der Parasiten beeinflusst (Arneberg et al. 1998). Arneberg et al. (1998) testeten in einer vergleichenden Studie die Hypothese einer Beeinflussung der Parasitenhäufigkeit durch die Dichte ihrer Wirts-Populationen. Am Beispiel gastrointestinaler strongyloider Nematoden zeigten sie eine positive Korrelation der Wirts-Populationsdichte und der durchschnittlichen Parasiten-Abundanz und erbrachten einen Makro-ökologischen Beweis, dass die Transmissionsraten von Parasiten in natürlichen Gemeinschaften von der Häufigkeit ihrer Wirte abhängen. Obwohl ein derartiges Konzept nur bedingt auf Parasiten mit komplexen Lebenszyklen übertragbar ist, da hier Transmissionslücken durch das Einbinden einer Reihe (paratenischer) Transportwirte unterschiedlicher trophischer Stufen verkleinert werden, so lassen sich anisakide Nematoden dennoch bis zu einem gewissen Grad als Bioindikatoren für die vertikale und horizontale Verbreitung ihrer Endwirte nutzen. Dies konnte am Beispiel des stenoxenen anisakiden Nematoden *Anisakis paggiae* in der Tiefsee-Fischart *Anoplogaster cornuta* gezeigt werden. Während die Arten der Gattung *Anisakis* hinsichtlich ihrer Zwischenwirtspräferenzen, wie die meisten metazoischen marinen Endohelminthen, als generalistisch anzusehen sind, so gilt dies in Bezug auf das bekannte Endwirtsspektrum nur eingeschränkt. Aufgrund des sehr engen Endwirtsspektrums von *A. paggiae* (*Kogia breviceps*, *K. sima*) verbunden mit der hohen Befallshäufigkeit in *A. cornuta* unterschiedlicher Größe konnte geschlossen werden, dass die Verbreitungsgrenze von *K. breviceps* und/oder *K. sima* vermutlich weiter in den nördlichen Breiten liegt als bisher angenommen wurde. Der gleichen Annahme folgend lässt sich, aufgrund der bekannten Lebensweise von *A. cornuta* in Tiefen von normalerweise 500-2000 m (Froese & Pauly 2013), auch auf das Tauch- und Fressverhalten der Endwirte schließen. Die Nutzung von *A. paggiae* als biologischer Indikator für die Verbreitung bestimmter Endwirte ergibt sich in dem dargestellten Fall in erster Linie durch das sehr enge Endwirtsspektrum des Parasiten. Ein ähnliches Potential besitzen daher auch die beiden anderen Arten des *A. physeteris*-Komplexes *A. physeteris* bzw. *A. brevispiculata* sowie *A. ziphidarum* und *A. nascettii*, da diese über ein ähnlich eingeschränktes Endwirtsspektrum verfügen. Die Eignung anderer Vertreter dieser Gattung relativiert sich durch die Tatsache, dass sie in Bezug auf ihre Endwirte euryxen sind und dadurch keine Rückschlüsse auf spezifische Endwirtsarten, sondern nur auf übergeordneterem Niveau, wie etwa dem der Familie zulassen. Dies gilt insbesondere für die bislang 15 dokumentierten delphiniden Endwirte der Art *A. typica*.

Das bislang wenig dokumentierte Nahrungsspektrum von kogiiden Walen (*Kogia breviceps*, *K. sima*) lässt darauf schließen, dass in erster Linie Tiefsee-Cephalopoda und Fische als primäre und sekundäre Nahrungsquellen genutzt werden (I). Während für *K. sima* ausschließlich Molluska als Beuteorganismen nachgewiesen wurden, ist für *K. breviceps* bereits bekannt, dass sie neben Molluska verschiedene Knochenfische erbeuten. *Anoplogaster cornuta* wurde dabei noch nicht als Beuteorganismus nachgewiesen. Unter Berücksichtigung der hohen Prävalenz von 57,1% und Intensitäten von 1-6 Nematoden nimmt *A. cornuta* vermutlich eine Position als zweiter Zwischenwirt im Lebenszyklus von *Anisakis paggiae* ein, welcher Parasiten direkt oder unter Einbezug weiterer räuberischer Zwischenwirte auf den Endwirt überträgt.

Neben Rückschlüssen über die vertikale und horizontale Verbreitung der Endwirte lieferte die durchgeführte parasitologische Untersuchung damit weiterführende Daten über das Fressverhalten kogiider Wale und die Position des meso/bathypelagischen *A. cornuta* im Lebenszyklus von *A. paggiae* und bestätigte die Eignung anisakider Nematoden als Indikator für trophische Interaktionen im marinen Nahrungsnetz.

3.5 Schlussfolgerungen und Ausblick

Anisakide Nematoden, insbesondere die Vertreter der Gattung *Anisakis*, nehmen in vielerlei Hinsicht eine Sonderstellung im marinen Lebensraum ein. Zahlreiche evolutive Adaptationen ermöglichen ihnen den Selbsterhalt in diesem großskaligen, dreidimensionalen Lebensraum, in dem die größte Herausforderung darin besteht, einen geeigneten Wirt zur Vollendung des Lebenszyklus zu finden. Auf Gattungsebene ist *Anisakis* in der gesamten Wassersäule entlang verschiedener Tiefenhabitats abundant. Durch den Einbezug eines breiten Spektrums (paratenischer) Zwischen- und Transportwirte aus unterschiedlichen trophischen Ebenen werden Transmissionslücken weitestgehend minimiert und der Transmissionserfolg auf den Endwirt, und damit die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Reproduktion, erhöht. Durch die Parasitierung paratenischer Zwischenwirte mit vorwiegend (bentho-) pelagischer Lebensweise, lässt sich auf eine Anpassung an die ebenfalls in diesen Gewässerzonen jagenden und fressenden Cetacea-Endwirte schließen. Spezielle Anpassungen des von *A. paggiae* an meso-/bathypelagische Lebensräume der Irminger See können möglicherweise als Hinweise auf eine evolutive Anpassung an

ihre ebenfalls meso-/bathypelagisch fressenden Endwirte gedeutet werden. Trotz grundlegend ähnlicher Übertragungsstrategien sind die *Anisakis*-Arten nicht gleichmäßig im Meer verteilt. Die zoogeographischen Modellierungen weisen auf das Vorhandensein spezies-spezifischer Verbreitungsmuster hin, welche unter Einschränkungen mit der Verbreitung, dem Migrations- und Fressverhalten der Cetacea-Endwirte in Deckung zu bringen sind. Ausgeprägte Wirtspräferenzen und phylogenetische Analysen des ribosomalen ITS-Markers stützen eine Theorie zur co-evolutiven, radiativen Anpassung der Parasiten an ihre Endwirte. Obwohl das Vorkommen und das Fressverhalten der Endwirte vermutlich einen maßgeblichen Einfluss auf die Verbreitung eines Parasiten haben, müssen weitere Faktoren, wie etwa das Vorkommen geeigneter Zwischenwirte sowie abiotische Faktoren (z.B. Temperatur, Salinität, Meeresströmungen) berücksichtigt werden. *Anisakis* eignet sich daher unter Einschränkungen als Bioindikator für die vertikale und horizontale Verbreitung und Abundanz der Endwirte und lässt Rückschlüsse auf trophische Interaktionen im Nahrungsnetz zu. Informationen über Prävalenz, Abundanz und Intensität anisakider Nematoden in marinen Fischen sind aufgrund eines unterschiedlichen Forschungsaufwandes ungleichmäßig verteilt. Neben einer Verbesserung der Datenlage durch das kontinuierliche Aufarbeiten verschiedener Wirte unterschiedlicher trophischer Stufen, geographischer Regionen und Tiefenhabitate, insbesondere aus bislang wenig beprobten Arealen, sollten zukünftige Modellierungen der Zoogeographie auch verfügbare Informationen über abiotische Faktoren sowie den ungleich verteilten Forschungsaufwand berücksichtigen. Um einen möglichen Einfluss der Temperatur auf das Überleben der Parasiten bewerten zu können, eignen sich insbesondere die ausschließlich im Nord-Atlantik verbreitete Art *A. simplex* s.s. sowie die entlang der Tropen und Subtropen abundante Art *A. typica*. Eine verbesserte Artdiagnostik und die differenziertere Analyse der Phylogenie setzt die Etablierung und Sequenzanalyse hochspezifischer und hochauflösender molekularer Marker voraus und soll ebenfalls Aufschluss über die Existenz hybrider *A. simplex* s.s. und *A. pegreffii* und möglicher Populationsstrukturen von *A. typica* liefern.

4 Zusammenfassung

Anisakide Nematoden sind Parasiten aquatischer Organismen und weltweit in marinen Habitaten verbreitet. Ihre Übertragungswege sind tief im marinen Nahrungsnetz verwurzelt und schließen ein breites Spektrum pelagisch/benthischer Invertebraten (z.B. Cephalopoda, Gastropoda, Crustacea, Polychaeta) und Vertebraten (z.B. Teleostei, Elasmobranchia, Cetacea, Pinnipedia, Aves) als Zwischen- bzw. Endwirte ein. Aufgrund der hohen Befallszahlen u.a. in der Muskulatur und Viszera kommerziell intensiv genutzter Fischarten (z.B. *Clupea harengus*, *Gadus morhua*, *Salmo salar*) sowie ihrer Rolle als Auslöser der menschlichen Anisakiasis nehmen die Vertreter der Gattung *Anisakis* unter den Anisakiden Nematoden eine Sonderstellung ein. Anhand der verbesserten Diagnostik und der Etablierung sowie Weiterentwicklung molekularbiologischer Methoden ist es in den letzten zwei Dekaden gelungen, die bestehende Taxonomie und Systematik der Gattung *Anisakis* zu erweitern bzw. zu revidieren. Aktuelle molekulare Analysen weisen auf die Existenz von insgesamt neun distinkten Arten hin, welche eine hohe genetische Heterogenität und Wirtsspezifität aufweisen, äußerlich jedoch nahezu identisch sind (sog. kryptische Arten). Trotz kontinuierlicher Forschung auf dem Gebiet ist das Wissen über die Biologie von *Anisakis* immer noch unzureichend.

Die vorliegende Dissertation ist in kumulativer Form verfasst und umfasst drei (ISI-) Einzelpublikationen. Die Zielsetzung der durchgeführten Studien bestand unter anderem darin, unter Verwendung molekularbiologischer und computergestützter Analyseverfahren, Fragestellungen zur Zoogeographie, (Co-)Phylogenie, Artdiagnostik, Lebenszyklus-Ökologie sowie des bioindikatorischen Potentials dieser Gattung zu bearbeiten und bestehende Wissenslücken zu schließen.

Die Verbreitung von *Anisakis*, welche bisher ausschließlich anhand von biogeographischen Einzelnachweisen abgeschätzt wurde, konnte durch den angewandten Modellierungsansatz erstmalig interpoliert und in Kartenform vergleichend dargestellt werden. Dabei wurde gezeigt, dass die Verbreitung von *Anisakis* spp. in den Ozeanen und Klimazonen nicht gleichmäßig ist. Die Analysen deuten auf die Existenz spezies-spezifischer horizontaler und vertikaler Verbreitungsmuster hin, welche neben abiotischen Faktoren durch die Verbreitung und Abundanz der jeweiligen Zwischen- und Endwirte sowie deren Tiefenverteilung und Nahrungspräferenzen geprägt sind.

Durch die umfangreiche Zusammenstellung und anschließende Kategorisierung der (mit molekularen Methoden) geführten Zwischenwirtsnachweise konnten indirekte Rückschlüsse über die vertikale Verbreitung von *Anisakis* spp. entlang der Tiefenhabitate gezogen werden.

Während *Anisakis* auf Gattungsebene in der gesamten Wassersäule entlang verschiedener Tiefenhabitate abundant ist, wurde für die stenoxene Art *Anisakis paggiae* ein meso-/bathypelagisch orientierter Lebenszyklus postuliert. Durch den Einbezug eines breiten Spektrums (paratenischer) Zwischen- und Transportwirte aus unterschiedlichen trophischen Ebenen werden Transmissionslücken weitestgehend minimiert und der Transmissionserfolg auf den Endwirt, und damit die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Reproduktion, erhöht. Die ausgeprägten Wirtspräferenzen sowie phylogenetische Analysen des ribosomalen ITS-Markers stützen eine Theorie zur co-evolutiven Anpassung der Parasiten an ihre Endwirte. *Anisakis* eignet sich daher unter Einschränkungen als Bioindikator für die vertikale und horizontale Verbreitung und Abundanz der Endwirte und lässt Rückschlüsse auf trophische Interaktionen im Nahrungsnetz zu. Durch die weitere Beprobung von Zwischenwirten aus verschiedenen trophischen Ebenen in zukünftigen Studien kann eine genauere Bewertung potentiell abweichender Lebenszyklus-Strategien gewährleistet werden. Insbesondere ist die Datenlage zur Prävalenz und Abundanz anisakider Nematoden in Cephalopoda und Crustacea noch unzureichend. Die Probennahme sollte dabei unter besonderer Berücksichtigung bislang wenig oder unbeprobter geographischer Regionen, Tiefenhabitate und Wirtsarten durchgeführt werden.

5 Literaturverzeichnis

- Abe N (2008) Application of the PCR-sequence-specific primers for the discrimination among larval *Anisakis simplex* complex. Parasitology Research 102: 1073-1075.
- Abollo E, Gestal C, Pascal S (2001) *Anisakis* infestation in marine fish and cephalopods from Galician waters: An updated perspective. Parasitology Research 87: 492-499.
- Abollo E, Paggi L, Pascual S, D'Amelio S (2003) Occurrence of recombinant genotypes of *Anisakis simplex* s.s. and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in an area of sympatry. Infection, Genetics and Evolution 3: 175-181.
- Aleshin VV, Kedrova OS, Milyutina IA, Vladychenskaya NS, Petrov NB (1998) Relationships among nematodes based on the analysis of 18S rRNA gene sequences: molecular evidence for monophyly of chromadorian and secernentean nematodes. Russian Journal of Nematology 6: 175-184.
- Alonso A, Moreno-Ancillo A, Daschner A, López-Serrano MC (1999) Dietary assessment in five cases of allergic reactions due to gastroallergic anisakiasis. Allergy 54: 517-520.
- Anadón AM, Romaris F, Escalante M, Rodríguez E, Gárate T, Cuéllar C, Ubeira FM (2009) The *Anisakis simplex* Ani s 7 major allergen as an indicator of true *Anisakis* infections. Clinical & Experimental Immunology 156: 471-478.
- Anderson RC (1984) The origin of zooparasitic nematodes. Canadian Journal of Zoology 62: 317-328.
- Anderson RC (2000) Nematode parasites of vertebrates. Their development and transmission. CABI Publishing, Wallingford: 650 Seiten.
- Arneberg P, Skorping A, Grenfell B, Read AF (1998) Host densities as determinants of abundance in parasite communities. Proceedings of the Royal Society B 265: 1283-1289.
- Arthur JR, Ahmed ATA (2002) Checklist of the parasites of fishes of Bangladesh. FAO Fisheries Technical Paper No 369/1: 1-77 Seiten.
- Arthur JR, Albert E (1993) Use of parasites for separating stocks of Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) in the Canadian northwest Atlantic. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 50: 2175-2181

- Arthur JR, Lumanlan-Mayo S (1997) Checklist of the parasites of fish of the Philippines. FAO Fisheries Technical Paper No. 369: 1-102 Seiten.
- Audicana MT, Kennedy MW (2008) *Anisakis simplex*: from obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity. *Clinical Microbiology Reviews* 21: 360-379.
- Baldwin RE, Banks MA, Jacobson KC (2012) Integrating fish and parasite data as a holistic solution for identifying the elusive stock structure of Pacific sardines (*Sardinops sagax*). *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 22: 137-156.
- Berland B (1961) Nematodes from some Norwegian marine fishes. *Sarsia* 2: 1–50.
- Blair R (2005) Cestode and trematode infections. In: Rhode K (Hrsg.) *Marine Parasitology*. CSIRO Publishing, Collingwood: 427-430.
- Blaxter ML, De Ley P, Garey JR, Liu LX, Scheldeman P, Vierstraete A, Vanfleteren JR, Mackey LY, Dorris M, Frisse LM, Vida JT, Thomas WK (1998) A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* 392: 71-75.
- Bratley J, Clark KJ (1992) Effect of temperature on egg hatching and survival of larvae of *Anisakis simplex* B (Nematoda: Ascaridoidea). *Canadian Journal of Zoology* 70: 274-279.
- Bray RA, Littlewood DTJ, Herniou EA, Williams B, Henderson RE (1999) Digenean parasites of deep-sea teleosts: a review and case studies of intrageneric phylogenies. *Parasitology* 119: 125-144.
- Brooks DR, McLennan (1991) *Phylogeny, ecology and behavior, a research program in comparative biology*. University Press of Chicago, Chicago: 441 Seiten.
- Bullini L, Arduino P, Cianchi R, Nascetti G, D'amelio S, Mattiucci S, Paggi L, Orrechia P, Plötz J, Berland B, Smith JW, Bratley JW (1997). Genetic and ecological research on anisakid endoparasites of fish and marine mammals in the Antarctic and Arctic-boreal regions. In: Battaglia B, Valencia J, Walton DWH (Hrsg.) *Antarctic communities: species structure and survival*. Cambridge University Press, Cambridge: 39-44.
- Burgman MA, Fox JC (2003) Bias in species range estimates from minimum convex polygons: implications for conservation and options for improved planning. *Animal Conservation* 6: 19-28.
- Busch MW, Kuhn T, Münster J, Klimpel S (2012) Marine crustaceans as potential hosts and vectors for metazoan parasites. In: Heinz Mehlhorn (Hrsg.) *Arthropods as vectors of emerging diseases*. *Parasitology Research Monographs* 3, Springer-Verlag, Heidelberg: 329-360.

- Campbell RA, Haedrich RL, Munroe TA (1980) Parasitism and ecological relationship among deep-sea benthic fishes. *Marine Biology* 57: 301-313.
- Castro P, Huber ME (1997) *Marine Biology*. WCB, McGraw-Hill: 464 Seiten.
- Chabaud AG (1974) Keys to the subclasses, orders and superfamilies. In: Anderson RC, Chabaud AG, Wilmott S (Hrsg.) *CIH Keys to the nematode parasites of vertebrates*. CABI Publishing, Wallingford: 6-17.
- Chai J-Y, Murrell KD, Lymbery AJ (2005) Fish-borne zoonoses: status and issues. *International Journal for Parasitology* 35: 1233-1254.
- Chitwood BG (1933) A revised classification of the Nematoda. *Journal of Parasitology* 202: 131.
- Chitwood BG (1958) The classification of plant parasitic names and related forms. Fifteenth International Congress of Zoology, Section VIII, Paper 28: 1-2.
- Chitwood BG, Chitwood MB (1937) *An introduction to nematology*. Monumental Printing Company, Baltimore: 334 Seiten.
- Choisy M, Brown AP, Lafferty KD, Thomas F (2003) Evolution of trophic transmission in parasites: why add intermediate hosts? *The American Naturalist* 162: 172-181.
- Còlon-Llavina MM, Mignucci-Giannoni AA, Mattiucci S, Paoletti M, Nascetti G, Williams EH Jr. (2009) Additional records of metazoan parasites from caribbean marine mammals, including genetically identified anisakid nematodes. *Parasitology Research* 105: 1239-1252.
- Cox FEG (2002) History of human parasitology. *Clinical Microbiology Reviews* 15: 595-612.
- Cross MA, Collins C, Campbell N, Watts PC, Chubb JC, Cunningham CO, Hatfield EMC, Mackenzie K (2007) Levels of intra-host and temporal sequence variation in a large CO1 sub-untis from *Anisakis simplex* sensu stricto (Rudolphi 1809) (Nematoda: Anisakidae): implications for fisheries management. *Marine Biology* 151: 695-702.
- Culik BM (2004) Review of small cetaceans. Distribution, behaviour, migration and threats. UNEP/CMS Secretariat, Bonn, Germany: 343 pp.
- D'Amelio S, Mathiopoulos KD, Santos CP, Pugachev ON, Webb SC, Picanço M, Paggi L (2000) Genetic markers in ribosomal DNA for identification of members of the genus *Anisakis* (Nematoda: Ascaridoidea) defined by polymerase chain

- reaction-bases restriction fragment length polymorphism. *International Journal of Parasitology* 30: 223-226.
- Dailey MD (2001) Parasitic diseases. In: Dierauf LA, Gulland MD (Hrsg.) *Marine mammal medicine*. CRC Press, Boca Raton: 357-379.
- Davaine CJ (1862) Nouvelles recherches sur le développement de la propagation de l'ascaride lombricoïde et du trichocéphale de l'homme. *Comptes Rendus des Séances de l'Académie des Sciences* 4: 261-265.
- Davey JT (1971) A revision of the genus *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Ascaridata). *Journal of Helminthology* 45: 51-72.
- De Ley P (2006) A quick tour of nematode diversity and the backbone of nematode phylogeny. *WormBook* (Hrsg.) The *C. elegans* Research Community, WormBook 1.41.1.
- De Ley P, Blaxter M (2002) Systematic position and phylogeny. In: Lee DL (Hrsg.) *The biology of nematodes*. Taylor and Francis, London: 1-30.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) (2010) Scientific opinion on risk assessment of parasites in fishery products. *EFSA Journal* 8: 1543: 1-91.
- Eichler (1948) Some rules in ectoparasitism. *Annals and Magazine of Natural History* 1: 588-598.
- Enigk K (1986) *Geschichte der Helminthologie im deutschsprachigen Raum*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart: 356 Seiten.
- Fagerholm HP (1991) Systematic implications of male caudal morphology in ascaridoid nematode parasites. *Systematic Parasitology* 19: 215-228.
- FAO (2011) Review of the state of world's marine fishery resources. *FAO Fisheries and Aquaculture technical paper* 569: 1-354.
- FAO (2012) *The state of the world fisheries and aquaculture*. FAO, Rome: 230 Seiten.
- Farjallah S, Busi M, Mahjoub MO, Slimane BB, Paggi L, Said K, D'Amelio S (2008a) Molecular characterization of larval anisakid nematodes from marine fishes off the Moroccan and Mauritanian coasts. *Parasitology International* 57: 430-436.
- Farjallah S, Slimane BB, Busi M, Paggi L, Amor N, Blel H, Said K, D'Amelio S (2008b) Occurrence and molecular identification of *Anisakis* spp. From the north African coasts of Mediterranean Sea. *Parasitology Research* 102: 371-379.
- Forbes E (1843) Report on the Mollusca and Radiata of the Aegean Sea, and on their distribution, considered as bearing on geology. *British association for the advancement of science*. 13th report, London: 130-193.

- Freeman M (2005) Zoonotic potential of protozoa. In: Rhode K (Hrsg.) Marine Parasitology. CSIRO Publishing, Collingwood: 434-436.
- Froese R, Pauly D (2013) Fishbase. World Wide Web electronic publication. Version (06/2013).
- Gamboa PM, Asturias J, Martínez R, Antépara I, Jáuregui I, Urritia, Fernández J, Sanz ML (2012) Diagnostic utility of components in allergy to *Anisakis simplex*. Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology 22: 13-19.
- Gandon S, Michalakis Y (2002) Local adaptation, evolutionary potential and host-parasite coevolution: interactions between migration, population size and generation time. Journal of Evolutionary Biology 15: 451-462.
- Gaston KJ (1991) How large is a species' geographic range? Oikos 61: 434-438.
- Gibson DI (1983) The systematics of ascaridoid nematodes - a current assessment. In: Stone AR, Platt HM, Khalil LF (Hrsg.) Concepts in nematode systematics. Academic Press, New York: 321-338.
- Gonzales AF, López A, Guerra A, Barreiro A (1994) Diets of marine mammals on the northwestern Spanish Atlantic coast with special reference to Cephalopoda. Fisheries Research 21: 179-191.
- Gowen MR, Spaulding M, Gatesy J (2009) Divergence date estimation and a comprehensive molecular tree of extant cetaceans. Molecular Phylogenetics and Evolution 53: 891-906.
- Grassi B (1881) Noto interno ad alcuni parassiti dell'uomo III. Interno all'*Ascaris lumbricoides*. Gazzetta dell'Ospedale di Milano 2: 432.
- Grove DI (1990) A history of human helminthology. CABI Publishing, Wallingford: 848 Seiten.
- Hammerschmidt K, Koch K, Milinski M, Chubb JC, Parker GA (2009) When to go: optimization of host switching in parasites with complex life cycles. Evolution 63: 1976-1986.
- Hartwich G (1974) Keys to genera of the Ascaridoidea. In: Anderson RC, Chabaud AG, Wilmott S (Hrsg.) CIH Keys to the nematode parasites of vertebrates. CABI Publishing, Wallingford: 1-15.
- Hartwich G (2009) Ascaridida, Ascaridoidea. In: Anderson RC, Chabaud AG, Willmott (Hrsg.) Keys to the nematodes of vertebrates, archival volume. CABI Publishing, Wallingford: 309-324.

- Hauck AK, May AB (1977) Histopathologic alterations associated with *Anisakis* larvae on Pacific herring from Oregon. *Journal of Wildlife Diseases* 13: 290-293.
- Hempel G, Hempel I, Schiel S (2006) *Faszination Meeresforschung. Ein ökologisches Lesebuch.* Hauschild, Bremen: 464 Seiten.
- Hermida M, Mota R, Pacheco CC, Santos CL, Cruz C, Saraiva A, Tamagnini P (2012) Infection levels and diversity of anisakid nematodes in blackspot seabream *Pagellus bogaraveo*, from Portuguese waters. *Parasitology Research* 110: 1919-1928.
- Hewitt CL, Campbell ML (2007) Mechanisms for the prevention of marine bioinvasions for better biosecurity. *Marine Pollution Bulletin* 55: 7-9.
- Hiepe T, Lucius R, Gottstein B (2006) *Allgemeine Parasitologie. Mit den Grundzügen Immunologie, Diagnostik und Bekämpfung.* Parey, Stuttgart: 480 Seiten.
- Hoberg EP (2005) Coevolution in marine systems. In: Rhode K (Hrsg.) *Marine Parasitology.* CSIRO Publishing, Collingwood: 327-339.
- Hoberg EP, Klassen GJ (2002) Revealing the faunal tapestry: co-evolution and historical biogeography of hosts and parasites in marine systems. *Parasitology* 124: 3-22.
- Hochberg NS, Hamer DH (2010) Anisakidosis: perils of the deep. *Clinical Infection Diseases* 51: 806-812.
- Hoegh-Guldberg O, Bruno JF (2010) The impact of climate change on the world's marine ecosystems. *Science* 328: 1523-1528.
- Hofer B (1906) *Handbuch der Fischkrankheiten.* Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart: 359 Seiten.
- Holterman M, van der Wurff A, van den Elsen S, van Megen H, Bongers T, Holovachov O, Bakker J, Helder J (2006) Phylum-wide analysis of SSU rDNA reveals deep phylogenetic relationships among nematodes and accelerated evolution toward crown clades. *Molecular Biology and Evolution* 23: 1792-1800.
- Hubold (1997) Nachhaltige Nutzung lebender mariner Ressourcen. Schriftenreihe des BML „Angewandte Wissenschaft“ Heft 465 „biologische Vielfalt in Ökosystemen“: 292-299.
- Iñiguez AM, Santos CP, Paulo Vicente AC (2009) Genetic characterization of *Anisakis typica* and *Anisakis physeteris* from marine mammals and fish from the Atlantic Ocean off Brazil. *Veterinary Parasitology* 165: 350-356.

- Iñiguez AM, Carvalho VL, Avels Motta MR, Sousa Nunes Pinheiro DC, Paulo Vicente AC (2011) Genetic analysis of *Anisakis typica* (Nematoda: Anisakidae) from cetaceans of the northeast coast of Brazil: new data on its definitive hosts. *Veterinary Parasitology* 178: 293-299.
- Ishikura H, Namiki M (1989) Gastric Anisakiasis in Japan: epidemiology, diagnosis, treatment. Springer, Japan: 144 Seiten.
- Jägerskiöld AA (1893) Beiträge zur Kenntnis der Nematoden. *Zoologische Jahrbücher Anatomie* 7: 499-532.
- Jefferson TA, Webber MA, Pitman RL (2008) Marine mammals of the world, a comprehensive guide to their identification. Elsevir, Amsterdam: 573 Seiten.
- Kadmon R, Farber F, Danin A (2004) Effect of roadside bias on the accuracy of predictive maps produced by bioclimatic models. *Ecological Applications* 14: 401-413.
- Kahl W (1936) Beitrag zur Kenntnis des Nematoden *Contraecum clavatum* Rud. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 8: 509-520.
- Kellermanns E, Klimpel S, Palm HW (2007) Molecular identification of ascaridoid nematodes from the deep-sea onion-eye grenadier (*Macrourus berglax*) from the east Greenland Sea. *Deep-Sea Research II* 54: 2194-2202.
- Kepplinger M (2008) Wirkungen des Fernsehens in der Bundesrepublik. In: Schwarz H-P (Hrsg.) Die Bundesrepublik Deutschland: eine Bilanz nach 60 Jahren. Böhlau Verlag, Köln: 705 Seiten.
- Kijewska A, Dzido J, Rokicki J (2009) Mitochondrial DNA of *Anisakis simplex* s.s. as a potential tool for differentiating populations. *Journal of Parasitology* 95: 1364-1370.
- Klimpel S, Palm HW (2011) Anisakid nematode (Ascaridoidea) life cycles and distribution: increasing zoonotic potential in the time of climate change? In: Mehlhorn H (Hrsg.) Progress in Parasitology, Parasitology Research Monographs 2. Springer-Verlag, Heidelberg: 201-222.
- Klimpel S, Rückert S (2005) Life cycle strategy of *Hysterothylacium aduncum* to become the most abundant anisakid fish nematode in the North Sea. *Parasitology Research* 97: 141-149.
- Klimpel S, Kellermanns E, Palm HW (2008a) The role of pelagic swarm fish (Myctophidae: Teleostei) in the oceanic life cycle of *Anisakis* sibling species at the Mid-Atlantic Ridge, Central Atlantic. *Parasitology Research* 104: 43-53.

- Klimpel S, Palm HW, Seehagen A (2003a) Metazoan parasites and food composition of juvenile *Etmopterus spinax* (L., 1758) (Dalatiidae, Squaliformes) from the Norwegian deep. *Parasitology Research* 89: 245-251.
- Klimpel S, Palm HW, Seehagen A (2003b) Metazoan parasites and feeding behaviour of four small-sized fish species from the central North Sea. *Parasitology Research* 91: 290-297.
- Klimpel S, Busch MW, Sutton T, Palm HW (2010b) Meso- and Bathy-pelagic fish parasites at the Mid-Atlantic Ridge (MAR): low host specificity and restricted parasite diversity. *Deep-Sea Research* 157: 596-608.
- Klimpel S, Kellermanns E, Palm HW, Moravec F (2007a) Zoogeography of fish parasites on the pearlside (*Maurollicus muelleri*), with genetic evidence of *Anisakis simplex* (s.s.) from the Mid-Atlantic-Ridge. *Marine Biology* 152: 725-732.
- Klimpel S, Kleinertz S, Hanel R, Rückert S (2007b) Genetic variability on *Hysterothylacium aduncum*, a raphidascarid nematode isolated from sprat (*Sprattus sprattus*) of different geographical areas of the northeastern Atlantic. *Parasitology Research* 101: 1425-1430.
- Klimpel S, Palm HW, Busch MW, Kellermanns (2008b) Fish parasites in the bathyal zone: the halosaur *Halosauropsis macrochir* (Günther, 1878) from the Mid-Atlantic Ridge. *Deep-Sea Research II* 55: 229-235.
- Klimpel S, Palm HW, Rückert S, Piatkowski U (2004) The life cycle of *Anisakis simplex* in the Norwegian deep (northern North Sea). *Parasitology Research* 94: 1-9.
- Klimpel S, Seehagen A, Palm HW, Rosenthal H (2001) Deep-water metazoan fish parasites of the world. Logos Verlag, Berlin: 316 Seiten.
- Klimpel S, Busch MW, Kellermanns E, Kleinertz S, Palm HW (2009) Metazoan deep-sea fish parasites, *Acta Biologica Benrodis*, Supplementband II. Verlag Natur & Wissenschaft, Solingen: 384 Seiten.
- Klimpel S, Busch MW, Kuhn T, Rohde A, Palm HW (2010a) The *Anisakis simplex* complex off the South Shetland Islands (Antarctica): endemic populations versus introduction through migratory hosts. *Marine Ecology Progress Series* 403: 1-11.
- Klimpel S, Palm HW, Busch MW, Kellermanns E, Rückert S (2006a) Fish parasites in the Arctic deep-Sea: poor diversity in pelagic fish species vs. heavy parasite load in a demersal fish. *Deep-Sea Research I* 53: 1167-1181.

- Klimpel S, Rückert S, Piatkowski U, Palm HW, Hanel R (2006b) Diet and metazoan parasites of silver scabbard fish *Lepidopus caudatus* from the Great Meteor Seamount (North Atlantic) Marine Ecology Progress Series 315: 249-257.
- Knowlton N (1986) Cryptic and sibling species among the decapod crustacea. Journal of Crustacean Biology 6: 356-363.
- Køie M (2001) Experimental infections of copepods and sticklebacks *Gasterosteus aculeatus* with small ensheathed and large third-stage larvae of *Anisakis simplex* (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). Parasitology Research 87: 32-36.
- Køie M, Fagerholm HP (1993) Third-stage larvae emerge from eggs of *Contracaecum osculatum* (Nematoda, Anisakidae). Journal of Parasitology 79: 777-780.
- Køie M, Berland B, Burt MDB (1995) Development to third-stage larvae occurs in the eggs of *Anisakis simplex* and *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). Canadian Journal of Fish Aquatic Science 52: 134-139.
- Kuhn T (2010) Molecular studies on marine ascaridoid nematodes. Diploma thesis, Heinrich-Heine-University, Düsseldorf: 100 Seiten.
- Lafferty KD (1997) Environmental parasitology: What can parasites tell us about human impacts on the environment? Parasitology Today 13: 251-255.
- Lafferty KD, Allesina S, Arim M, Briggs CJ, De Leo G, Dobson AP, Dunne JA, Johnson PTJ, Kuris AM, Marcogliese DJ, Martinez ND, Memmott J, Marquet PA, McLaughlin JP, Mordecai EA, Pasual M, Poulin R, Thielges DW (2008) Parasites in the food webs: the ultimate missing links. Ecology Letters 11: 533-546.
- Lile NK (1998) Alimentary tract helminths of four pleuronectid flatfish in relation to host phylogeny and ecology. Journal of Fish Biology 53: 945-953.
- Lindenmayer D, Burgmann M (2005) Practical conservation biology. CSIRO Publishing, Collingwood: 624 Seiten.
- Linnaeus C (1758) Tomus I. Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Editio decima, reformata. Holmiae. (Laurentii Salvii): [1-4], 1-824.
- Littlewood DTJ (2005) Marine parasites and the tree of life. In: Rhode K (Hrsg.) Marine Parasitology. CSIRO Publishing, Collingwood: 6-10.

- Lorenzen S (1981) Entwurf eines phylogenetischen Systems der freilebenden Nematoden. Veröffentlichungen des Instituts für Meeresforschung in Bremerhaven. Supplement 7: 472 Seiten.
- Lucius R, Loos-Frank B (2008) Biologie von Parasiten. Springer-Verlag, Heidelberg: 552 Seiten.
- Lymbery AJ, Cheah FY (2007) *Anisakis* nematodes and anisakiasis. In: Murrell KD, Fried B (Hrsg.) Food-borne parasitic zoonoses, fish and plant-borne parasites vol. 11. Springer-Verlag, New York: 185-207.
- MacKenzie K (2002) Parasites as biological tags in population studies of marine organisms: an update. *Parasitology* 124: 153-163.
- MacKenzie K, Williams HH, Williams B, McVicar AH, Siddall R (1995) Parasites as indicators of water quality and the potential use of helminth transmission in marine pollution studies. *Advances in Parasitology* 35: 85-144.
- Madanire-Moyo GN, Luus-Powell WJ, Oliver PA (2012) Diversity of metazoan parasites of the Mozambique tilapia, *Oerochromis mossambicus* (Peters, 1852), as indicators of pollution in the Limpopo and Olifants river systems. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 79: 1-9
- Marcogliese DJ (1995) The role of zooplankton in the transmission of helminth parasites to fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 5: 336-371.
- Marcogliese DJ (2002) Food webs and the transmission of parasites to marine fish. *Parasitology* 124: 83-99.
- Marcogliese DJ (2005) Transmission of marine parasites. In: Rhode K (ed.) (2005) *Marine Parasitology*. CSIRO Publishing, Collingwood: 280-286.
- Marcogliese DJ, Cone DK (1997) Parasite communities as indicators of ecosystem stress. *Parassitologia* 39: 227-232.
- Marcogliese DJ, Price J (1997) The paradox of parasites. *Global Biodiversity* 7: 7-15.
- Margolis L, Arthur JR (1979) Synopsis of the parasites of fishes of Canada. *Bulletin Fisheries Research Board of Canada* 199: 1-269.
- Margolis L, Beverly-Burton M (1977) Response of mink (*Mustela vison*) to larval *Anisakis simplex* (Nematoda: Ascaridida). *International Journal of Parasitology* 7: 259-273.
- Mattiucci S (2006) Parasites as biological tags in population studies of demersal and pelagic fish species. *Parassitologia* 48: 23-25.

- Mattiucci S, Nascetti G (2006) Molecular systematics, phylogeny and ecology of anisakid nematodes of the genus *Anisakis* Dujardin, 1845: an update. *Parasite* 13: 99-113.
- Mattiucci S, Nascetti G (2008) Advances and trends in the molecular systematics of anisakid nematodes, with implications for their evolutionary ecology and host-parasite co-evolutionary processes. *Advances in Parasitology* 66: 47-148.
- Mattiucci S, Paoletti M, Webb SC (2009) *Anisakis nascettii* n. sp. (Nematoda: Anisakidae) from beaked whales of the southern hemisphere: morphological description, genetic relationships between congeners and ecological data. *Systematic Parasitology* 74: 199-217.
- Mattiucci S, Paoletti M, Damiano S, Nascetti G (2007b) Molecular detection of sibling species in anisakid nematodes. *Parassitologia* 49: 147-153.
- Mattiucci S, Nascetti G, Bullini L, Orecchia P, Paggi L (1986) Genetic structure of *Anisakis physeteris* and its differentiation from the *Anisakis simplex* complex (Ascaridida: Anisakidae). *Parasitology* 93: 383-387.
- Mattiucci S, Abaunza P, Damiano S, Garcia A, Santos MN, Nascetti G (2007a) Distribution of *Anisakis* larvae, identified by genetic markers, and their use for stock characterization of demersal and pelagic fish from European waters: an update. *Journal of Helminthology* 81: 117-127.
- Mattiucci S, Farina V, Garcia A, Santos MN, Mariniello L, Nascetti G (2005a) Metazoan parasitic infections of swordfish (*Xiphias gladius* L., 1758) from the Mediterranean Sea and Atlantic Gibraltar waters: implications for stock assessment. *Collective Volumes of Scientific Papers- ICCAT* 58: 1470-1482.
- Mattiucci S, Farina V, Campbell N, Mackenzie K, Pinto AL, Abaunza P, Nascetti G (2008) *Anisakis* spp. Larvae (Nematoda: Anisakidae) from Atlantic horse mackerel: their genetic identification and use as biological tags for host stock characterization. *Fisheries Research* 89: 146-151.
- Mattiucci S, Nascetti G, Dailey M, Webb SC, Barros NB, Cianchi R, Bullini L (2005b) Evidence for a new species of *Anisakis* Dujardin, 1845: morphological description and genetic relationship between congeners (Nematoda: Anisakidae). *Systematic Parasitology* 61: 157-171.
- Mattiucci S, Paggi L, Nascetti G, Abollo E, Webb SC, Pascual S, Cianchi R, Bullini L (2001) Genetic divergence and reproductive isolation between *Anisakis*

- brevispiculata* and *Anisakis physeteris* (Nematoda: Anisakidae). International Journal of Parasitology 31: 9-14.
- Mattiucci S, Cianchi R, Nascetti G, Paggi L, Sardella N, Timi J, Webb SC, Bastida R, Rodríguez D, Bullini L (2003) Genetic evidence for two sibling species within *Contraecum ogmorhini* Johnston & Mawson, 1941 (Nematoda: Anisakidae) from otariid seals of boreal and austral regions. Systematic Parasitology 54: 13-23.
- Mattiucci S, Nascetti G, Cianchi R, Paggi L, Arduino P, Margolis L, Bratney J, Webb S, D'Amelio S, Orecchia P, Bullini L (1997) Genetic and ecological data on the *Anisakis simplex* complex with evidence for a new species (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). Journal of Parasitology 83: 401-416.
- Matsui T, Iida M, Murakami M, Kimura Y, Fujishim M, Yao Y, Tsuji M (1985) Intestinal anisakiasis: clinical and radiologic features. Radiology 157: 299-302.
- Mauchline J, Gordon JDM (1986) Foraging strategies of deep-sea fish. Marine Ecology Progress Series 27: 227-238.
- Mayr E. (1963) Animal Species and Evolution. Harvard University Press, Cambridge: 797 Seiten.
- Mayr E (1975) Grundlagen der zoologischen Systematik: theoretische und praktische Voraussetzungen für Arbeiten auf systematischem Gebiet. Parey, Hamburg: 370 Seiten.
- McClelland G (2005) Nematoda (roundworms). In: Rhode K (Hrsg.) Marine Parasitology. CSIRO Publishing, Collingwood: 104-115.
- McDonald TE, Margolis L (1995) Synopsis of the parasites of fishes of Canada: Supplement (1978-1993). Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences 122: 1-265.
- Mehlhorn H (2012) Parasiten den Menschen: Erkrankungen erkennen, bekämpfen und vorbeugen. Spektrum Akademischer Verlag, Berlin: 324 Seiten.
- Mehlhorn H, Piekarski G (2002) Grundriss der Parasitenkunde. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg: 516 Seiten.
- Meldal BHM, Debenham NJ, De Ley P, De Ley IT, Vanfleteren JR, Vierstrate AR, Bert W, Borgonie G, Moens T, Tyler PA, Austen MC, Blaxter ML, Rogers AD, Lamshead PJD (2007) An improved molecular phylogeny of the Nematoda with special emphasis on marine taxa. Molecular Phylogenetics and Evolution 42: 622-636.

- Mignucci-Giannoni AA, Williams Jr. EH, Toyos-González GM, Pérez-Padilla J, Rodríguez-López MA, Vega-Guerra MB, Ventura-González M (1999) Helminths from a stranded manatee in the Dominican Republic. *Veterinary Parasitology* 81: 69-71.
- Möller H (1977) Indexed bibliography on parasites and diseases of marine fish from North Sea and Baltic Sea (2nd edition). *Berichte aus dem Institut für Meereskunde an der Christian-Albrechts-Universität Kiel*, 031. Institut für Meereskunde, Kiel: 47 Seiten.
- Möller H (1981) Field guide to the diagnosis of fish diseases and most important fish parasites in North Sea and Baltic Sea. *Berichte aus dem Institut für Meereskunde an der Christian-Albrechts-Universität Kiel*, 086. Institut für Meereskunde, Kiel: 65 Seiten.
- Möller H, Anders K (1983) *Krankheiten und Parasiten der Meeresfische*. Verlag Heino Möller, Kiel: 258 Seiten.
- Mülhardt C (2009) *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg: 332 Seiten.
- Muroga K (2001) Viral and bacterial diseases of marine fish and shellfish in Japanese hatcheries. *Aquaculture* 202: 23-44.
- Nadler SA, Hudspeth DSS (2000) Phylogeny of the Ascaridoidea (Nematoda: Ascaridida) Based on three genes and morphology: hypotheses of structural and sequence evolution. *Journal of Parasitology* 86: 380-393.
- Nadler SA, D'Amelio S, Dailey MD, Paggi L, Siu S, Sakanari JA (2005) Molecular phylogenetics and diagnosis of *Anisakis*, *Pseudoterranova*, and *Contracaecum* from Northern Pacific marine mammals. *Journal of Parasitology* 91: 1413-1429.
- Nagasawa K (2005) Anisakiasis. In: Rhode K (Hrsg.) *Marine Parasitology*. CSIRO Publishing, Collingwood: 430-434.
- Nascetti G, Paggi L, Orecchia P, Smith JW, Mattiucci S, Bullini L (1986) Electrophoretic studies on the *Anisakis simplex* complex (Ascaridida: Anisakidae) from the Mediterranean and north-east Atlantic. *International Journal for Parasitology* 16: 633-640.
- Nikaido M, Matsuno F, Hamilton H, Brownell RL Jr, Cao Y, Ding W, Zuoyan Z, Shedlock AM, Fordyce RE, Hasegawa M, Okada N (2001) Retroposon analysis of major cetacean lineages: the monophyly of toothed whales and the paraphyly of river dolphins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98: 7384-7389.

- Noble ER (1973) Parasites and fishes in a deep-sea environment. *Advanced Marine Biology* 11: 121-195.
- Noble ER, Orias JD (1975) Parasitism in the bathypelagic fish, *Melanostigma pammelas*. *International Journal for Parasitology* 5: 89-93.
- Noguera P, Collins C, Bruno D, Pert C, Turnbull A, McIntosh A, Lester K, Bricknell I, Wallace S, Cook P (2009) Red vent syndrome in wild Atlantic salmon *Salmo salar* in Scotland is associated with *Anisakis simplex* sensu stricto (Nematoda: Anisakidae). *Diseases of Aquatic Organisms* 87: 199-215.
- Orias JD, Noble ER, Alderson GD (1978) Parasitism in some atlantic bathypelagic fishes with a description of *Lecitophyllum irlandeum* sp. n. (Trematoda). *Journal of Parasitology* 64: 49-51.
- Oshima T (1987) Anisakiasis - is the sushi bar guilty? *Parasitology Today* 3: 44-48.
- Page RD (2003) Introduction. In: Page RD (Hrsg.) *Tangled trees: phylogeny, cospeciation and coevolution*. University of Chicago Press, Chicago: 1-21.
- Paggi L, Nascetti G, Webb SC, Mattiucci S, Cianchi R, Bullini L (1998) A new species of *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Anisakidae) from beaked whale (Ziphiidae): allozyme and morphological evidence. *Systematic Parasitology* 40: 161-174.
- Palm HW (2011) Fish parasites as biological indicators in a changing world: can we monitor environmental impact and climate change? In: Mehlhorn H (Hrsg.) *Progress in Parasitology, Parasitology Research Monographs 2*. Springer-Verlag, Heidelberg: 223-250.
- Palm HW, Klimpel S, Bucher C (1999) Checklist of metazoan fish parasites of German coastal waters. *Berichte aus dem Institut für Meereskunde* 307: 1-148.
- Palm HW, Damriyasa IM, Oka L, Oka IBM (2008) Molecular genotyping of *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Ascaridoidea: Anisakidae) larvae from marine fish of Balinese and Javanese waters, Indonesia. *Helminthologia* 45: 3-12.
- Parker GA, Chubb JC, Ball MA, Roberts GN (2003) Evolution of complex life cycles in helminth parasites. *Nature* 425: 480-484.
- Perrin WF, Wursig B, Thewissen JGM (2009) *Encyclopedia of marine mammals*. Academic Press, London: 1316 Seiten.
- Plehn M (1924) *Praktikum der Fischkrankheiten*. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart: 479 Seiten.

- Pontes T, D'Amelio S, Costa G, Paggi L (2005) Molecular characterization of larval anisakid nematodes from marine fishes of Madeira by a PCR-based approach, with evidence for a new species, *Journal of Parasitology* 91: 1430-1434.
- Poulin R (2011) The many roads to parasitism: a tale of convergence. *Advances in Parasitology* 74: 1-40.
- Price PW (1980) *Evolutionary biology of parasites*. Princeton University Press, Princeton: 237 Seiten.
- Quiazon KMA, Yoshinaga T, Ogawa K (2011) Experimental challenge of *Anisakis simplex* sensu stricto and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in rainbow trout and olive flounder. *Parasitology International* 60: 126-131.
- Quiazon KMA, Yoshinaga T, Santos MD, Ogawa K (2009) Identification of Larval *Anisakis* spp. (Nematoda: Anisakidae) in Alaska Pollock (*Theragra chalcogramma*) in northern Japan using morphological and molecular markers. *Journal of Parasitology* 95: 1227-1232.
- Raedig C, Dormann CF, Hildebrandt A, Lautenbach S (2010) Reassessing neotropical angiosperm distribution patterns based on monographic data: a geometric interpolation approach. *Biodiversity Conservation* 19: 1523-1546.
- Reddy S, Dávalos LM (2003) Geographical sampling bias and its implication for conservation priorities in Africa. *Journal of Biogeography* 30: 1719-1727.
- Reimer LW (1995) Parasites especially of piscine hosts as indicators of the eutrophication in the Baltic Sea. *Applied Parasitology* 36: 124-135.
- Rohde K (2002) Ecology and biogeography of marine parasites. *Advances in Marine Biology* 43: 1-86.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74: 560-564.
- Santos AT, Sasal P, Verneau O, Lenfant P (2006) A method to detect the parasitic nematodes from the family Anisakidae, in *Sardina pilchardus*, using specific primers of 18 S DNA gene. *European Food Research and Technology* 222: 71-77.
- Sasal P, Mouillot D, Fichez R, Chifflet S, Kulbicki M (2007) The use of fish parasites as biological indicators of anthropogenic influences in coral-reef lagoons: a case study of Apogonidae parasites in New-Caledonia. *Marine Pollution Bulletin* 54: 1697-1706.

- Schmidt GD, Roberts LS, Janovy J (2009) Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' Foundations of Parasitology. McGraw-Hill Higher Education, Boston: 701 Seiten.
- Smith JW, Snyder JM (2005) New locality records for third-stage larvae of *Anisakis simplex* (sensu lato) (Nematoda: Ascaridoidea) in euphausiids *Euphausia pacifica* and *Thysanoessa raschii* from William Sound, Alaska. Parasitology Research 97: 539-542.
- Smith JW, Wootten R (1978) *Anisakis* and anisakiasis. Advances in Parasitology 16: 93-163.
- Sommer U (2005) Biologische Meereskunde. Springer, Heidelberg: 432 Seiten.
- Sprent JFA (1983) Observations on the systematics of ascaridoid nematodes. In: Stone AR, Platt HM, Khalil LF (Hrsg.) Concepts in nematode systematics. Academic Press, New York: 303-319.
- Stanko M, Krasnov BR, Morand S (2006) Relationship between host abundance and parasite distribution: inferring regulating mechanisms from census data. Journal of Animal Ecology 75: 575-583.
- Storch V, Welsch U, Wink M (2007) Evolutionsbiologie 2. Auflage. Springer-Verlag, Heidelberg: 518 Seiten.
- Sures B (2003) Accumulation of heavy metals by intestinal helminthes in fish: an overview and perspective. Parasitology 126: 53-60.
- Sures B, Siddall R (1999) *Pomphorhynchus laevis*: the intestinal acanthocephalan as a lead sink for its fish host, chub (*Leuciscus cephalus*). Experimental Parasitology 93: 66-72.
- Sures B, Siddall R, Taraschewski H (1999) Parasites as accumulation indicators of heavy metal pollution. Parasitology Today 15: 16-21.
- Suzuki J, Murata R, Hosaka M, Araki J (2010) Risk factors for human *Anisakis* infection and association between the geographic origins of *Scomber japonicas* and anisakid nematodes. International Journal of Food Microbiology 137: 88-93.
- Tardent P (2005) Meeresbiologie: Eine Einführung. Thieme, Stuttgart: 308 Seiten.
- Townsend CR, Harper JL, Begon ME (2003) Ökologie. Springer-Verlag, Heidelberg: 647 Seiten.
- Türkay M (2001) Die Tiefsee, der größte Lebensraum - In: Türkay M. (Hrsg.) Leben ist Vielfalt. Kleine Senckenberg-Reihe 41: 9-29.

- Tyler PA (1995) Conditions for the existence of life at the deep-sea floor: an update. *Oceanography and Marine Biology* 33: 221-244.
- Umehara A, Kawakami Y, Araki J, Uchida A (2008) Multiplex PCR for the identification of *Anisakis simplex* (sensu stricto), *Anisakis pegreffii* and other anisakid nematodes. *Parasitology International* 57: 49-53.
- Umehara A, Kawakami Y, Matsui T, Araki J, Uchida A (2006) Molecular identification of *Anisakis simplex* sensu stricto and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) from fish and cetacean in Japanese waters. *Parasitology International* 55: 267-271.
- Umehara A, Kawakami Y, Ooi H-K, Uchida A, Ohmae H, Sugiyama (2010) Molecular identification of *Anisakis* type I larvae isolated from hairtail fish off the coasts of Taiwan and Japan. *International Journal of Food Microbiology* 143: 161-166.
- Valentini A, Mattiucci S, Bondanelli P, Webb SC, Mignucci-Giannone A, Còlon-Llavina MM, Nascetti G (2006) Genetic relationships among *Anisakis* species (Nematoda: Anisakidae) inferred from mitochondrial *cox2* sequences, and comparison with allozyme data. *Journal of Parasitology* 92: 156-166.
- Valtonen ET, Holmes JC, Koskivaara M (1997) Eutrophication, pollution, and fragmentation: effects on parasite communities in roach (*Rutilus rutilus*) and perch (*Perca fluviatilis*) on four lakes in central Finland. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54: 572-585.
- Van Benning P (1971) Some notes on a successful rearing of the herring worm *Anisakis marina* L. (Nematoda: Heterocheilidae). *Journal du Conseil* 34: 84-88.
- Van Thiel PH (1960) The present state of anisakiasis and its causative worms. *Tropical and Geographical Medicine* 28: 75-85.
- Van Thiel PH (1962) Anisakiasis. *Parasitology* 52: 16-17.
- Van Thiel PH, Kuipers FC, Roskam TH (1960) A nematode parasitic in herring, causing acute abdominal syndromes in man. *Tropical and Geographical Medicine* 12: 97-113.
- Williams HH, Jones A (1994) Parasitic worms of fish. Taylor and Francis, London: 593 Seiten.
- Williams HH, MacKenzie K, McCarthy AM (1992) Parasites as biological indicators of the population biology, migrations, diet and phylogenetics of fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 2: 144-176.

- Woo PTK (2006) Fish diseases and disorders, Volume 1: protozoan and metazoan infections. CABI Publishing, Wallingford: 816 Seiten.
- World Health Organization (WHO) (2012) Soil-transmitted helminthiasis. Eliminating soil-transmitted helminthiasis as a public health problem in children: progress report 2001-2010 and strategic plan 2011-2020. World Health Organization Geneva, Switzerland: 79 Seiten.
- Yosef S (2009) Rich food for poor people: genetically improved *Tilapia* in the Philippines. In: Spielmann DJ, Pandya-Lorch R (Hrsg.) Proven success in agricultural development: a technical compendium to millions fed. IFPRI, Washington: 34 Seiten.
- Zander CD (1998) Parasit-Wirt-Beziehungen. Springer-Verlag, Heidelberg: 184 Seiten.
- Zhang L, Hu M, Shamsi S, Beveridge I, Li H, Xu Z, Li L, Cantacessi C, Gasser RB (2007) The specific identification of anisakid larvae from fishes from the Yellow Sea, China, using mutation scanning-coupled sequence analysis of nuclear ribosomal DNA. *Molecular and Cellular Probes* 21: 386-390.
- Zhu XQ, Gasser RB (1998) Single-strand conformation polymorphism (SSCP)-based mutation scanning approaches to fingerprint sequence variation in ribosomal DNA of ascaridoid nematodes. *Electrophoresis* 19: 1366-1373.
- Zhu XQ, D'Amelio S, Paggi L, Gasser RB (2000a) Assessing sequence variation in the internal transcribed spacers of ribosomal DNA within and among members of the *Contraecum osculatum* complex (Nematoda: Ascaridoidea: Anisakidae). *Parasitology Research* 86: 677-683.
- Zhu XQ, Gasser RB, Jacobs DE, Hung GC, Chilton NB (2000b) Relationships among some ascaridoid nematodes based on ribosomal DNA sequence data. *Parasitology Research* 86: 738-744.
- Zhu XQ, Podolska M, Liu JS, Yu HQ, Chen HH, Lin ZX, Luo CB, Song HQ, Lin RQ (2007) Identification of anisakid nematodes with zoonotic potential from Europe and China by single-strand conformation polymorphism analysis of nuclear ribosomal DNA. *Parasitology Research* 101: 1703-1707.

6 Anhang

Deep-water life cycle of *Anisakis paggiae* (Nematoda: Anisakidae) in the Irminger Sea indicates kogiid whale distribution in north Atlantic waters

Sven Klimpel · Thomas Kuhn · Markus W. Busch ·
Horst Karl · Harry W. Palm

Received: 16 June 2010/Revised: 5 November 2010/Accepted: 16 December 2010/Published online: 6 January 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract The study of the beryciform *Anoplogaster cornuta* from the Irminger Sea (north Atlantic) revealed the presence of the anisakid nematode *Anisakis paggiae* inside the body cavity, representing a new host and locality record. This deep-sea fish was infected with *Anisakis* larvae at a prevalence of 57.1% and a mean intensity of 2.2, with no correlation between the fish standard length and the number of accumulated *A. paggiae*. Kogiid whales (*Kogia breviceps*, *K. sima*), the typical final hosts of this parasitic nematode, have not yet been recorded so far in the north. Because *A. cornuta* does not migrate outside the Irminger Sea, and by using the parasite as an indicator for the presence of the final hosts, *A. paggiae* must have been introduced through migratory kogiid final hosts. This would extend their range of distribution into the Irminger Sea. The depth range of the meso- and bathypelagic *A. cornuta* and the

frequent occurrence of *Anisakis* inside this deep-sea fish demonstrate an oceanic deep-water life cycle for *A. paggiae* in the north Atlantic.

Keywords Deep-sea fish · *Anisakis paggiae* · Zoogeography · Metazoan parasites · Irminger Sea · Kogiidae · Sibling species

Introduction

Marine mammals are a diverse group of 130 species including cetaceans (whales, dolphins and porpoises), pinnipeds (sea lions, walrus and true seals), sirenians (manatees and dugongs), two otters and the Polar bear (Jefferson et al. 2008). The 86 recent whale species in the order Cetacea belong to the suborders Odontoceti (toothed whales) and Mysticeti (baleen whales) (e.g. Nikaido et al. 2001; Jefferson et al. 2008; Yang 2009). Cetaceans live in distinct regions of the world oceans, although some species can be considered cosmopolitan. Because of different habitat preferences, cetacean species distribute in tropical or polar and marine or estuarine regions, or any variation in between. They inhabit particular depths, temperature ranges or oceanographic regimes (Jefferson et al. 2008).

Baleen whales, sperm whales and some other large toothed whales have extensive, predictable seasonal migrations, allowing a maximum exploitation of food resources as well as mating and breeding purposes (e.g. Jefferson et al. 2008). Sperm whales include the families Physeteridae (modern sperm whale) and Kogiidae (pygmy and dwarf sperm whales). Both families are known from typical deep-water habitats in the tropics and the temperate zones. They feed mostly in deep waters (meso- and bathypelagic), primarily on cephalopods and less frequent

S. Klimpel · T. Kuhn · M. W. Busch
Institute for Ecology, Evolution and Diversity,
Biodiversity and Climate Research Centre (BiK-F, LOEWE),
Goethe-University, Senckenberganlage 25,
60325 Frankfurt am Main, Germany
e-mail: sklimpel@gmx.net; sven.klimpel@senckenberg.de

H. Karl
Max Rubner—Institute, Federal Research Institute for Nutrition
and Food, Department of Safety and Quality of Milk
and Fish Products, Palmaille 9, 22767 Hamburg, Germany

H. W. Palm (✉)
Aquaculture and Sea-Ranching, Faculty of Agricultural
and Environmental Sciences, University Rostock,
Justus-von-Liebig-Weg 6, 18059 Rostock, Germany
e-mail: harry.palm@uni-rostock.de; hpalm@gmx.net

on deep-sea fishes and crustaceans (e.g. decapods) (e.g. Beatson 2007; West et al. 2009).

Despite frequent whale strandings, parasitological studies on cetaceans are fairly limited compared to fish. They harbour a variety of metazoan parasites including digeneans, cestodes, nematodes and acanthocephalans (e.g. Colón-Llavina et al. 2009). Beside pseudophyllidean cestodes, ascaridoid nematodes of the genus *Anisakis* are the predominant parasites in the digestive tract. The use of molecular markers has revealed that this genus includes at least nine distinct species, *A. simplex* (Rudolphi, 1809; s.s., Nascetti et al., 1986), *A. pegreffii* (Campana-Rouget & Biocca, 1955) and *A. simplex* C (Rudolphi, 1809; C, Mattiucci et al., 1997) (representing the *A. simplex* complex), *A. typica* (Diesing, 1860; Palm et al., 2008), *A. ziphidarum* (Paggi et al., 1998), *A. nascettii* (Mattiucci et al., 2009), *A. paggiae* (Mattiucci et al., 2005), *A. brevispiculata* (Dollfus, 1966) and *A. physeteris* (Baylis, 1920) (the latter three representing the *A. physeteris* complex). They are morphologically very similar but genetically different with distinct host preferences, life cycles and zoogeographical distribution (Klimpel et al. 2008; Mattiucci and Nascetti 2008; Mattiucci et al. 2009). According to Mattiucci and Nascetti (2006) and Valentini et al. (2006), *A. brevispiculata* and *A. paggiae* are host specific for the whale family Kogiidae, mainly in the mid- and southern Atlantic Ocean.

The Common Fangtooth, *Anoplogaster cornuta* (Valenciennes, 1833) (Beryciformes, Anoplogastridae), is a worldwide distributed deep-sea fish (between 46°N and 46°S in the Atlantic Ocean). In tropical and temperate seas, this species is found within a depth range of 2–4,992 m, where the adult specimens stay in a favoured depth of 500–2,000 m. The predatory *A. cornuta* reaches a maximum standard length of 15.2 cm and feeds mainly on fish and cephalopods, while the planctonic larvae mainly feed on crustaceans (Post 1986; Froese and Pauly 2010). Due to few parasitological studies that have been carried out on bathypelagic fish, the knowledge on the parasite fauna of *A. cornuta* is scarce (Klimpel et al. 2009). Ho (1987) described the parasitic copepod *Tautochondria dolichoura* from a specimen in the western North Atlantic; however, so far, no data on the endoparasite fauna are available.

We herewith genetically identify *Anisakis* larvae from the deep-water teleost *Anoplogaster cornuta* from the Irminger Sea. Identification of the host-specific *A. paggiae* allows comments to be made on the putative life cycle of this species and its final host distribution in northern waters. Implications for the general life cycle patterns of *Anisakis* nematodes in the North Atlantic are discussed.

Methods

Sample collection

Fish were sampled in June 2003 on board of the German research vessel Walther Herwig III during the field phase of the international research cruise WH 252. The cruise was part of a co-ordinated effort of ICES (International Council for the Exploration of the Sea) undertaking an international survey using hydroacoustics and trawl fisheries on oceanic redfish (*Sebastes mentella*) in the eastern Irminger Sea and adjacent waters. Sampling was conducted with a Gloria 1024 pelagic net at a trawling speed between 3.3 and 4.1 knots. A total of 21 specimens of *Anoplogaster cornuta* were caught between 52°14.83' and 58°44.74'N and 37°01.09' and 51°06.99'W (trawling depth range 300–950 m, mean depth 718 m). In the laboratory on board, the standard length (SL, to the nearest 0.1 cm) and total weight (TW, to the nearest 0.1 g) were taken. The fishes were kept deep frozen at –40°C until subsequent examination.

Parasitological examination

The presence of anisakid nematodes within the organs was studied by using a stereomicroscope. The body cavity was opened to examine the liver, stomach, pyloric caeca, intestine and gonads for nematodes. The stomach contents were also removed. The nematodes were freed from the host tissue and morphologically identified by using existing keys and descriptions. *Anisakis* third-stage larvae (L3) were stored in absolute (~99.9%) ethanol for molecular identification. The ecological and parasitological terminology follows Bush et al. (1997). We use the following terms and definitions: (a) final host—where a parasite reaches sexual maturity, (b) intermediate host—required by a parasite to complete its life cycle, usually it undergoes considerable morphological or physiological change and (c) paratenic host—not required by a parasite to complete its life cycle, without detectable morphological change.

PCR amplification and sequencing of ITS-1, 5.8S and ITS-2

Genomic DNA was isolated and purified from individual *Anisakis* larvae using a genomic DNA extraction kit (Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen, Germany) according to the instructions of the manufacturer. The rDNA region comprising the ITS-1, 5.8S, ITS-2 and flanking sequences (=ITS+) was amplified by using the previously described primers NC5 (5'-GTA GGT GAA CCT GCG GAA GGA TCA TT-3') and NC2 (5'-TTA GTT

TCT TTT CCT CCG CT-3') (Zhu et al. 2000). PCR (50 µl) included 25 µl Master-Mix (Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen, Germany) containing dNTP, MgCl₂, Buffer and Taq-Polymerase, 3 µl of each primer, 14 µl aqua dest and 5 µl genomic DNA. Each PCR was performed in a thermocycler (Peqlab, Germany) under the following conditions: after initial denaturation at 91°C for 1 min, 40 cycles of 94°C for 45 s (denaturation), 55°C for 45 s (annealing), 72°C for 45 s (extension), followed by a final extension at 72°C for 10 min. Samples without DNA were included in each PCR run. PCR products were examined on 1% agarose gels. A 100-bp ladder marker (peqGOLD, Erlangen, Germany) was used to estimate the size of the PCR products. To identify the anisakid nematodes, the PCR products were purified with E.Z.N.A. Cycle-Pure Kit (Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen, Germany). Afterwards, a total volume of 7 µl, including 2 µl primer (individually) and 5 µl of the PCR product (250 ng/µl), was sequenced by SeqLab (Goettingen GmbH, Germany). The obtained sequences were identified via GenBank and aligned with

previously characterized sequences of anisakid nematodes, using CLUSTALW (1.83) Multiple Sequence Alignments (Thompson et al. 1994). Among the observed *Anisakis* species, the nucleotide sequence of all three regions was compared. The accession numbers of *Anisakis paggiae* from *Anoplogaster cornuta* were deposited in the Genbank under the accession numbers GU295973, GU295974, GU295975 and GU295976.

Our sequences of *A. paggiae* were compared with selected sequences from Genbank (Table 1) to create a distance table (Kimura-2-parameter) and to calculate the base differences using Mega4.0.2 (Kimura 1980; Tamura et al. 2007) (Table 2). A sequence of the rDNA ITS-1, 5.8S and ITS-2 of *Pseudoterranova decipiens* from the Atka mackerel (*Pleurogrammus azonus*, GenBank AB277824) was included as out-group to root the phylogenetic tree. The optimal evolution model for our data for the maximum-likelihood and Bayesian inference analyses was estimated using Modeltest 3.7 (Posada and Crandall 1998). The HKY85+G substitution model was the best fitting

Table 1 Information and accession numbers of anisakid nematode sequences used for comparative analyses

Parasite	Code	Locality	Host	Accession
<i>Anisakis simplex</i> (s.s.)	<i>Asimss</i>	Morocco	<i>Trachyrincus scabrus</i>	EU718471.1
<i>Anisakis pegreffii</i>	<i>Apeg</i>	Morocco	<i>Trachyrincus scabrus</i>	EU718479.1
<i>Anisakis typica</i>	<i>Atyp</i>	Thailand	<i>Rastrelliger kanagurta</i>	AB432909.1
<i>Anisakis simplex C</i>	<i>AsimC</i>	Canada	<i>Pseudorca crassidens</i>	AY826722
<i>Anisakis physeteris</i>	<i>Aphy</i>	Japan	<i>Scomber scombrus</i>	AB277821.1
<i>Anisakis ziphidarum</i>	<i>Azip</i>	South Africa	<i>Ziphius cavirostris</i>	AY826725.1
<i>Anisakis nascettii</i> (sp.A)	<i>Anas</i>	Madeira	<i>Aphanopus carbo</i>	AY260555
<i>Anisakis brevispiculata</i>	<i>Abrev</i>	Japan	<i>Theragra chalcogramma</i>	EU624344
<i>Anisakis paggiae</i>	<i>ApagREF</i>	Japan	<i>Theragra chalcogramma</i>	EU624345.1
<i>Anisakis paggiae</i>	<i>Apag</i>	Greenland	<i>Anoplogaster cornuta</i>	GU295973
<i>Pseudoterranova decipiens</i>	<i>Pdec</i>	Japan	<i>Theragra chalcogramma</i>	AB277824

Table 2 Pairwise nucleotide differences for ITS-1, 5.8S and ITS-2 sequences between *Anisakis* taxa

	<i>Asimss</i>	<i>Apeg</i>	<i>AsimC</i>	<i>Atyp</i>	<i>Azip</i>	<i>Anas</i>	<i>Abrev</i>	<i>Aphy</i>	<i>Apag</i>	<i>ApagREF</i>	<i>Pdec</i>
<i>Asimss</i>		2	5	147	43	64	103	101	97	99	130
<i>Apeg</i>	0.00240		5	148	42	63	104	100	96	98	131
<i>AsimC</i>	0.00602	0.00602		146	42	67	103	99	97	99	129
<i>Atyp</i>	0.21698	0.21876	0.21531		136	139	141	139	146	150	156
<i>Azip</i>	0.05507	0.05372	0.05375	0.20188		53	102	96	86	88	117
<i>Anas</i>	0.08450	0.08308	0.08879	0.22595	0.07015		129	114	102	104	124
<i>Abrev</i>	0.14806	0.14970	0.14806	0.21878	0.14879	0.17721		35	41	41	94
<i>Aphy</i>	0.14525	0.14362	0.14199	0.21422	0.13945	0.16938	0.04653		48	49	101
<i>Apag</i>	0.13621	0.13463	0.13621	0.22199	0.12229	0.14656	0.05490	0.06490		2	84
<i>ApagREF</i>	0.13938	0.13779	0.13938	0.22759	0.12549	0.14985	0.05468	0.06593	0.00250		84
<i>Pdec</i>	0.19329	0.19505	0.19163	0.23798	0.17523	0.18665	0.13645	0.14767	0.11905	0.11837	

Absolute nucleotide differences above the diagonal. Kimura-2-parameter (Kimura 1980, K2P) distances below the diagonal

model for the data set. The estimated parameters were distribution shape parameters (α) = 0.2719, kappa = 4.2269 and nucleotide frequencies $A = 0.25380$, $C = 0.19690$, $G = 0.26550$ and $T = 0.28380$. Maximum-likelihood analysis was performed using PAUP* v4.0 (Swofford 2003) including 1,000 bootstrap replicates. Bayesian inference (BI) analyses were performed with MrBayes 3.1 (Huelsenbeck and Ronquist 2001) using four MCM chains and default heating values (1.000.000 generations). Posterior probabilities were estimated (Larget and Simon 1999).

Results

Anisakid nematodes and food items of *Anoplogaster cornuta*

The 21 examined specimens of *Anoplogaster cornuta* had a mean standard length of 12.7 cm (11.3–15.2 cm) and a mean total weight of 84.8 g (51.8–154.1 g). *Anoplogaster cornuta* was parasitized by a total of 26 third-stage larvae (L3) of *Anisakis paggiae* (molecular identification of 4 specimens see below, 12 specimens revealed sequences with a large number of not specified base pairs). They were isolated from the mesenteries around the organs at a prevalence of 57.1% and a mean intensity of 2.2 (range 1–6). No correlation was found between the fish standard length and the number of accumulated *A. paggiae* (Fig. 1). The stomach contents of the examined *A. cornuta* consisted solely of fish remains, while 71.4% of the stomachs were empty.

Genetic identification

The ITS-1, 5.8S and ITS-2 sequences were determined for 4 *Anisakis* nematodes that were isolated from the 12 infected *Anoplogaster cornuta*. Identification via GenBank showed that all samples belonged to *Anisakis paggiae* within the *A. physeteris* sibling species complex. The length of the PCR products including the three regions ITS-1, 5.8S and ITS-2 was 810 bp. The length of the partial ITS-1 and full ITS-2 sequences of *A. paggiae* was 363 and 290 bp, respectively. The 5.8S sequences were all 157 bp long. The $G + C$ contents of all sequences were 49.0% (ITS-1), 52.0% (5.8S) and 48.0% (ITS-2). The obtained sequences were aligned with a sequence of *A. paggiae* (EU624345.1) from *Theragra chalcogramma*, Japan. They all differed in the same 6 positions (transition in ITS-1/2, pos. 208, 601; deletion in ITS-2, pos. 585–588) and showed a sequence identity of 99% compared with the included reference.

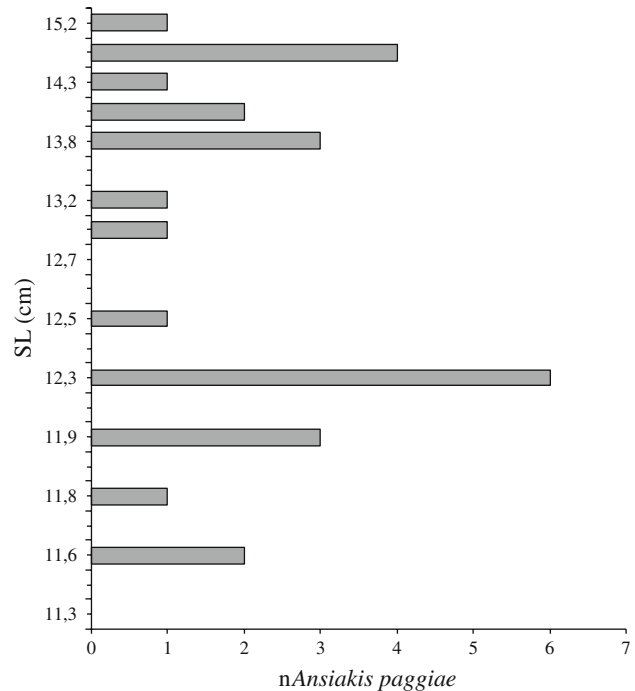


Fig. 1 Random distribution of *Anisakis paggiae* in the investigated fish species *Anoplogaster cornuta* over the size range (standard length = SL, in cm) from the Irminger Sea

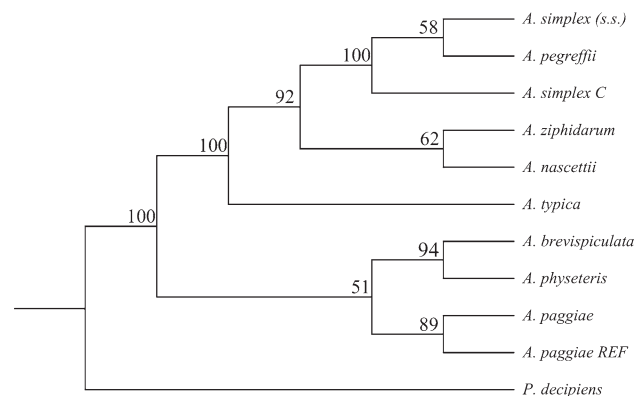


Fig. 2 *Anisakis* spp. consensus phylogenetic tree resulting from maximum-likelihood analysis for ITS-1/5.8S/ITS-2 regions of 11 sequences. Probabilities (%) are given for internal branches. Specimen information is listed in Table 1. Bootstrap values were calculated over 1,000 replicates. Result of Bayesian inference (BI) analyses not given. They revealed similar results

The phylogenetic analyses classified *A. paggiae* as part of the *A. physeteris* complex, supported by a bootstrap value of 52% (Fig. 2).

Discussion

The transmission pathways of parasites with indirect life cycles are fully embedded within the food web of aquatic

ecosystems. Consequently, anisakid nematodes follow closely the trophic relationships among their successive hosts, from invertebrates into teleosts and finally into marine mammal final hosts. As such, anisakid nematodes are useful as biological indicators for their final host distribution and abundance (Mattiucci et al. 2007; Klimpel et al. 2010). The present study identifies for the first time *Anisakis paggiae* from the body cavity of the deep-water fish *A. cornuta* at a mean depth of 718 (range: 300–950) m. *Anisakis paggiae* was genetically characterized and morphologically described as an adult parasite of the kogiid species *Kogia breviceps* (pigmy sperm whale) and *K. sima* (dwarf sperm whale) off the Florida and South African Atlantic coast (Mattiucci et al. 2005; Valentini et al. 2006). Scanty data are so far available regarding the identification of the intermediate hosts. Mattiucci et al. (2007) analysed different fish from Atlantic waters and recorded larval *A. paggiae* in predatory *Merluccius merluccius* (depth range: 30–1,075, usually 70–400 m) and *Xiphias gladius* (depth range: 0–800, usually 0–400 m). *Anoplogaster cornuta* is a meso-/bathypelagic fish that had a high prevalence of infestation above 50%. The random distribution of *A. paggiae* in differently sized *Anoplogaster cornuta* indicates its role as a second intermediate host in the life cycle of the parasite (see Palm 1999). Consequently, deep-water teleosts (mesopelagic fish) that transfer the parasites

into larger paratenic host species (such as *X. gladius*) might play a crucial role within the life cycle of this anisakid nematode species.

Within the boreal region of the North Atlantic, *A. simplex* (s.s.), *A. brevispiculata*, *A. pegreffii*, *A. physeteris*, *A. ziphidarum* and herewith *A. paggiae* have been recorded from their final or intermediate hosts. In the northern hemisphere, adult *A. simplex* (s.s.) are mainly parasites of the Delphinidae, Phocoenidae and Balaenopteridae (Mattiucci and Nascetti 2008). The larval stages occur in a variety of epipelagic fish and cephalopods (e.g. Mattiucci et al. 1998; Klimpel et al. 2008; Mattiucci and Nascetti 2008). While *A. physeteris* is host specific for the sperm whale and can be expected to have an extensive range of distribution in the world oceans, *A. paggiae* has been so far reported from kogiid whales only. They have not been recorded that far north in the Irminger Sea. However, the high abundance of *A. paggiae* in a common deep-water fish in these northern waters may indicate that the final hosts migrate further northwards within the North Atlantic Ocean, than known so far from the reported range of distribution for the kogiids *K. breviceps* and *K. sima*.

The pigmy and dwarf sperm whales are widespread in tropical and temperate seas, where they feed on mid- and deep-water cephalopods, fish and occasionally crustaceans (Fig. 3). The bathymetric distribution and the species

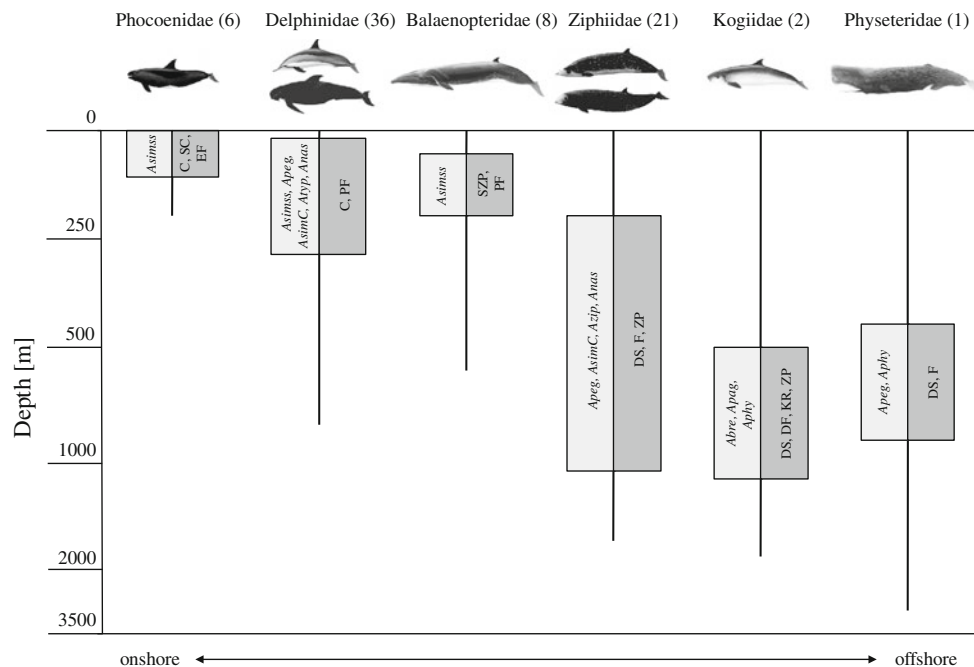


Fig. 3 Shore affinity, maximum depth distribution with main foraging depths, favoured prey (according to Reyes 1991; Perrin and Gilpatrick 1994; Westgate et al. 1995; Willis and Baird 1998; Croll et al. 2001; Heide-Jørgensen et al. 2002; Panigada et al. 2003; Croll et al. 2005; Jefferson et al. 1993, 2008; Perrin et al. 2009) and detected anisakid sibling species (boxes) of cetacean families. The numbers in brackets

indicate the number of species. Abrev: *Anisakis brevispiculata*, Anas: *A. nascettii*, Apag: *A. paggiae*, Apeg: *A. pegreffii*, Aphy: *A. physeteris*, Atyp: *A. typica*, AsimC: *A. simplex* C, Asimss: *A. simplex* (s.s.), Azip: *A. ziphidarum*, C: Cephalopoda, DS: deep-sea squids, DF: deep-sea fishes, EF: epipelagic fish, F: fish, KR: krill, PF: pelagic fish, SC: small Crustacea, SF: small fishes, SZP: small zooplankton and ZP: zooplankton

composition of the prey items in the diet of *K. breviceps* in New Zealand waters indicate its most common water depth. According to Beatson (2007), the majority of the diet species are vertical migrators, suggesting that *K. breviceps* feeds in a water depth between 650 and 1,100 m. In the Gulf of Mexico, *Kogia* species are present year round in water depths of 400–3,500 m, but most frequently occur between 400 and 1,000 m (Mullin et al. 1994; Davis et al. 1998; Baumgartner et al. 2001). These areas include locations of frequent upwelling events that concentrate zooplankton biomass and the cephalopod prey along the continental shelf (Davis et al. 1998). Stomach content analyses support deep-water cephalopods as the primary source of diet, with myctophid fishes and shrimps as secondary prey (e.g. Ross 1978; McAlpine et al. 1997; Pauly et al. 1998; Wang et al. 2002; Beatson 2007; West et al. 2009). West et al. (2009) studied the stomach contents of seven pygmy sperm whales (*K. breviceps*) from the Hawaiian Islands. The two most numerically abundant cephalopod families in the stomachs were the Histiotiuthidae and Cranchiidae. Species of these families (e.g. *Stigmatoteuthis hoylei*, *Taonius pavo* and *Liocranchia reinhardti*) were identified in all seven whale stomachs and collectively represented an estimated 58.0% of the total prey biomass. Furthermore, typical meso- and bathypelagic fish species and deep-water decapods (e.g. *Pasiphaea tarda*) were of secondary importance. These data demonstrate that the most common feeding of the Kogiidae takes place in the meso- and bathypelagic zone.

The life cycle of *A. paggiae* is unknown. Our data, however, demonstrate that the life cycle can take place in the deep-water surroundings of the Irminger Sea. Both so far recorded whale species with a common distribution in the Irminger Sea (*Physeter catodon*, Physeteriidae, and *Hyperoodon ampullatus*, Ziphiidae) have not been recorded to harbour *A. paggiae*. Consequently, kogiids as the only reported final hosts for *A. paggiae* must have dispersed the eggs and larvae. Accounting for the high prevalence of *Anisakis* in the investigated fish, a possible introduction of eggs or infected invertebrates from southern regions into the Irminger Sea through ocean currents seems to be unlikely. *Anoplogaster cornuta* can be considered as second intermediate host that gets infected through the unknown invertebrate first intermediate hosts (see Palm 1999). Most likely, deep-water cephalopods or other teleosts serve as paratenic hosts that also accidentally transfer the parasite larvae into the upper water layers. Some might even be considered a “dead end” within the parasite’s life cycle. This *A. paggiae* life cycle contrasts the known pathways of *Anisakis simplex* (s.s.) in the east Greenland Sea, which mainly takes place in the epipelagic zone. Onshore cephalopods (e.g. *Sepia officinalis* and *Allotheuthis subulata*) and species from the polar regions of the

Atlantic Ocean (e.g. *Illex coindetii* and *Todarodes sagittatus*) have been identified as hosts for the third-stage larvae of *A. simplex* (s.s.) and *A. pegreffii* (Abollo et al. 2001; Mattiucci & Nascetti 2008), however, mainly in coastal and bank areas between 20 and 200 m (Moiseev 1991).

The existence of nine morphologically similar but genetically different species within the *Anisakis* sibling species complexes is based on differences in the life cycle ecology and host preferences, allowing sympatric existence and even co-occurrence in the same intermediate and final hosts. Our sequence analyses show that our examined specimens all differ in the same positions compared with the included reference. This might be explained with the existence of a northern *A. paggiae* population. However, further evidence is needed based on population genetics analyses. Figure 2 presents the consensus phylogenetic tree resulting from the maximum-likelihood analysis, which is in principal congruent to the published tree by Mattiucci et al. (2009), derived from mtDNA sequences. However, most recent studies still demonstrate inconsistencies in the branching order of the clade including the *A. physeteris* complex (e.g. Mattiucci and Nascetti 2008, Valentini et al. 2006), placing either *A. physeteris* or *A. paggiae* monophyletic. This suggests the investigation of additional DNA markers in future studies.

Conclusions

Our results support the hypothesis that *Anisakis* species in the east Greenland Sea utilize different life cycle pathways, linked to the feeding ecology of their final hosts and the structure of the respective food web. *Anisakis paggiae* follows a deep-water or meso-/bathypelagic life cycle that involves meso- and bathypelagic fish as second and possibly deep-sea cephalopods or other teleosts as paratenic hosts. The latter might accidentally transfer the parasite larvae into the upper water layers, where they can be considered as a “dead end” for the parasite. Identification of *A. paggiae* in the Irminger Sea indicates that the kogiid final hosts also distribute so far northwards. The life cycle of *A. paggiae* contrasts that of *A. simplex* (s.s.) in the north Atlantic, which mainly takes place in the epipelagic zone. Existence of nine morphologically similar but genetically different species within the genus *Anisakis* is based on differences in the life cycle ecology and host preferences, allowing sympatric existence and even co-occurrence in the same intermediate and also final hosts (see Fig. 2). We do suggest similar deep-water (‘mesopelagic?’) life cycles for other species within the *A. physeteris* sibling species complex, *A. ziphidarum* and *A. nascettii* (e.g. Klimpel et al. 2008), in accordance with the most common feeding ecology and depth range of their reported final hosts (see Fig. 3).

Acknowledgments The present study was financially supported by the German Research Council (DFG KL 2087/1-1, 1-2, PA 664/4-2, 664/6-1), by the Research and Innovation funds of the Heinrich-Heine-University Düsseldorf and the Gesellschaft für Ichthyologie e.V. (GiF). The study was a contribution to Mar-Eco, a field study of the Census of Marine Life program.

References

- Abollo E, Gestal C, Pascal S (2001) *Anisakis* infestation in marine fish and cephalopods from Galician waters: an updated perspective. *Parasitol Res* 87:492–499
- Baumgartner MF, Mullin KD, May LN, Leming TD (2001) Cetacean habitats in the northern Gulf of Mexico. *Fish Bull* 99:219–239
- Beatson EL (2007) The diet of pygmy sperm whales, *Kogia breviceps*, stranded in New Zealand: implications for conservation. *Rev Fish Biol Fisher* 17:295–303
- Bush O, Lafferty AD, Lotz JM, Shostak AW (1997) Parasitology meets ecology on his own terms: Margolis et al. revisited. *J Parasitol* 83:575–583
- Colón-Llavina MM, Mignucci-Giannoni AA, Mattiucci S, Paoletti M, Nascetti G, Williams EH Jr (2009) Additional records of metazoan parasites from Caribbean marine mammals, including genetically identified anisakid nematodes. *Parasitol Res* 105:1239–1252
- Croll DA, Acevedo-Gutierrez A, Tershy BR, Urban-Ramirez J (2001) The diving behaviour of blue and fin whales: is diving duration shorter than expected based on oxygen stores? *Comp Biochem Physiol* 129:797–809
- Croll DA, Marinovic B, Benson S, Chavez FP, Black N, Ternullo R, Tershy BR (2005) From wind to whales: trophic links in a coastal upwelling system. *Mar Ecol Prog Ser* 289:117–130
- Davis RW, Fargion GS, May N, Leming TD, Baumgartner M, Evans WE, Hansen LJ, Mullin K (1998) Physical habitats of cetaceans along the continental slope of north-central and western Gulf of Mexico. *Mar Mamm Sci* 14:490–507
- Froese R, Pauly D (2010) Fishbase. World wide web electronic publication. www.fishbase.org, Version (03/2010)
- Heide-Jørgensen MP, Bloch D, Stefansson E, Mikkelsen B, Ofstad LH, Dietz R (2002) Diving behaviour of long-finned pilot whales *Globicephala melas* around the Faroe Islands. *Wildl Biol* 8:307–313
- Ho JS (1987) *Tautochondria dolichoura* n.g., n.sp., a copepod parasitic on the bathypelagic fish *Anoplogaster cornuta* (Valenciennes) in the western north Atlantic. *Syst Parasitol* 9:179–184
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MrBayes: bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17:754–755
- Jefferson TA, Leatherwood S, Webber MA (1993) FAO species identification guide. Marine mammals of the world. UNEP/FAO, Rome
- Jefferson TA, Webber MA, Pitman RL (2008) Marine mammals of the world, a comprehensive guide to their identification. Elsevier, Amsterdam
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:111–120
- Klimpel S, Kellermanns E, Palm HW (2008) The role of pelagic swarm fish (Myctophidae: Teleostei) in the oceanic life cycle of *Anisakis* sibling species at the Mid-Atlantic Ridge. *Parasitol Res* 104:43–53
- Klimpel S, Busch MW, Kellermanns E, Kleinertz S, Palm HW (2009) Metazoan deep-sea fish parasites. *Acta Biologica Benrodis*, Supplement 11. Verlag Natur & Wissenschaft, Solingen
- Klimpel S, Busch MW, Kuhn T, Rohde A, Palm HW (2010) The *Anisakis simplex* complex off the South Shetland Islands (Antarctica): endemic populations versus introduction through migratory hosts. *Mar Ecol Prog Ser* 403:1–11
- Larget B, Simon B (1999) Markov chain Monte Carlo algorithms for the Bayesian analysis of phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 16:750–759
- Mattiucci S, Nascetti G (2006) Molecular systematics, phylogeny and ecology of anisakid nematodes of the genus *Anisakis* Dujardin, 1845: an update. *Parasite* 13:99–113
- Mattiucci S, Nascetti G (2008) Advances and trends in the molecular systematic of anisakid nematodes, with implications for their evolutionary ecology and host-parasite co-evolutionary processes. *Adv Parasit* 66:47–148
- Mattiucci S, Paggi L, Nascetti G, Ishikura H, Kikuchi K, Sato N, Cianchi R, Bullini L (1998) Allozyme and morphological identification of *Anisakis*, *Contracaecum* and *Pseudoterranova* from Japanese waters (Nematoda, Ascaridoidea). *Syst Parasitol* 40:81–92
- Mattiucci S, Nascetti G, Dailey M, Webb SC, Barros NB, Cianchi R, Bullini L (2005) Evidence for a new species of *Anisakis* Dujardin, 1845: morphological description and genetic relationship between congeners (Nematoda: Anisakidae). *Syst Parasitol* 61:157–171
- Mattiucci S, Paoletti M, Damiano S, Nascetti G (2007) Molecular detection of sibling species in anisakid nematodes. *Parassitologia* 49:147–153
- Mattiucci S, Paoletti M, Webb SC (2009) *Anisakis nascetti* n. sp. from beaked whales of the southern hemisphere: morphological description, genetic relationships between congeners and ecological data. *Syst Parasitol* 75:199–217
- McAlpine DF, Murison L, Hoberg E (1997) New records for the pygmy sperm whale *Kogia breviceps* (Physeteridae) from Atlantic Canada with notes on diet and parasites. *Mar Mamm Sci* 13:701–704
- Moiseev SI (1991) Observation of the vertical distribution and behaviour of nektonic squids using manned submersibles. *Bull Mar Sci* 49:446–456
- Mullin KD, Hoggard W, Roden CL, Lohoefer RR, Rogers CM, Taggart B (1994) Cetaceans on the upper continental slope in the north-central Gulf of Mexico. *Fish Bull* 92:773–786
- Nikaido M, Matsuno F, Hamilton H, Brownell RL Jr, Cao Y, Ding W, Zuoyan Z, Shedlock AM, Fordyce RE, Hasegawa M, Okada N (2001) Retroposon analysis of major cetacean lineages: the monophyly of toothed whales and the paraphyly of river dolphins. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:7384–7389
- Palm HW (1999) Ecology of *Pseudoterranova decipiens* (Krabbe, 1878) (Nematoda: Anisakidae) from Antarctic waters. *Parasitol Res* 85:638–646
- Palm HW, Damriyasa IM, Linda, Oka IBM (2008) Molecular genotyping of *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Ascaridoidea: Anisakidae) larvae from marine fish of Balinese and Javanese waters, Indonesia. *Helminthologia* 45:3–12
- Panigada S, Pesante G, Zanardelli M, Oehen S (2003) Day and night-time behavior of fin whales in the western Ligurian Sea. In: Proceedings of the conference Ocean 2003, San Diego, California, USA, pp 466–471
- Pauly D, Trites AW, Capuli E, Christesen V (1998) Diet composition and trophic level of marine mammals. *ICES J Mar Sci* 55:467–481
- Perrin WF, Gilpatrick JW Jr (1994) Spinner dolphin—*Stenella longirostris* (Gray, 1928). In: Ridgway SH, Harrison SR (eds) Handbook of marine mammals. Volume 5: the first book of dolphins. Academic Press, London, pp 99–128
- Perrin WF, Wursig B, Thewissen JGM (2009) Encyclopedia of marine mammals. Academic Press, London

- Posada D, Crandall KA (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14:817–818
- Post A (1986) Anoplogastridae. In: Whitehead PJP, Bauchot ML, Hureau JC, Nielsen J, Tortonese E (eds) *Fishes of the north-eastern Atlantic and the Mediterranean*. UNESCO, Paris, pp 767–768
- Reyes JC (1991) The conservation of small cetaceans: a review. Report prepared for the secretariat of the convention on the conservation of migratory species of wild animals. UNEP/CMS Secretariat, Bonn
- Ross GJB (1978) Records of pygmy and dwarf sperm whales, genus *Kogia*, from southern Africa, with biological notes and some comparisons. *Ann Cape Prov Mus Nat Hist* 11:259–327
- Swofford DL (2003) PAUP* phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods) version 4. Sinauer Associates, Sunderland
- 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
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673–4680
- Valentini A, Mattiucci S, Bondanelli P, Webb SC, Mignucci-Giannone A, Cólón-Llavina MM, Nascetti G (2006) Genetic relationship among *Anisakis* species (Nematoda: Anisakidae) inferred from mitochondrial *cox-2* sequences, and comparison with allozyme data. *J Parasitol* 92:156–166
- Wang MC, Walker WA, Shao KT, Chou LS (2002) Comparative analysis of the diets of pygmy sperm whales and dwarf sperm whales in Taiwanese waters. *Acta Zool Taiwan* 13:53–62
- West K, Walker W, Baird R, White W, Levine G, Brown E, Schofield D (2009) Diet of pygmy sperm whale (*Kogia breviceps*) in the Hawaiian Archipelago. *Mar Mammal Sci* 25:944–948
- Westgate AJ, Read AJ, Bergren P, Koopman HN, Gaskin DE (1995) Diving behavior of harbor porpoises, *Phocoena phocoena*. *Can J Fish Aqua Sci* 52:1064–1073
- Willis PM, Baird RW (1998) Status of the dwarf sperm whale, *Kogia simus*, with consideration of special reference to Canada. *Can Field Nat* 112:114–125
- Yang XG (2009) Bayesian inference of cetacean phylogeny based on mitochondrial genomes. *Biologia* 64:811–818
- Zhu X, Gasser RB, Jacobs DE, Hung GC, Chilton NB (2000) Relationship among some ascaridoid nematodes based on ribosomal DNA sequence data. *Parasitol Res* 86:738–744

Adaptive Radiation within Marine Anisakid Nematodes: A Zoogeographical Modeling of Cosmopolitan, Zoonotic Parasites

Thomas Kuhn¹, Jaime García-Màrquez², Sven Klimpel^{1*}

1 Biodiversity and Climate Research Centre (BiK-F, LOEWE), Medical Biodiversity and Parasitology; Senckenberg Gesellschaft für Naturforschung (SGN); Goethe-University (GO), Institute for Ecology, Evolution and Diversity, Frankfurt am Main, Germany, **2** Departamento de Gestión Ambiental, Carbones del Cerrejón Limited, Bogotá, Colombia

Abstract

Parasites of the nematode genus *Anisakis* are associated with aquatic organisms. They can be found in a variety of marine hosts including whales, crustaceans, fish and cephalopods and are known to be the cause of the zoonotic disease anisakiasis, a painful inflammation of the gastro-intestinal tract caused by the accidental consumptions of infectious larvae raw or semi-raw fishery products. Since the demand on fish as dietary protein source and the export rates of seafood products in general is rapidly increasing worldwide, the knowledge about the distribution of potential foodborne human pathogens in seafood is of major significance for human health. Studies have provided evidence that a few *Anisakis* species can cause clinical symptoms in humans. The aim of our study was to interpolate the species range for every described *Anisakis* species on the basis of the existing occurrence data. We used sequence data of 373 *Anisakis* larvae from 30 different hosts worldwide and previously published molecular data ($n = 584$) from 53 field-specific publications to model the species range of *Anisakis* spp., using a interpolation method that combines aspects of the alpha hull interpolation algorithm as well as the conditional interpolation approach. The results of our approach strongly indicate the existence of species-specific distribution patterns of *Anisakis* spp. within different climate zones and oceans that are in principle congruent with those of their respective final hosts. Our results support preceding studies that propose anisakid nematodes as useful biological indicators for their final host distribution and abundance as they closely follow the trophic relationships among their successive hosts. The modeling might although be helpful for predicting the likelihood of infection in order to reduce the risk of anisakiasis cases in a given area.

Citation: Kuhn T, García-Màrquez J, Klimpel S (2011) Adaptive Radiation within Marine Anisakid Nematodes: A Zoogeographical Modeling of Cosmopolitan, Zoonotic Parasites. PLoS ONE 6(12): e28642. doi:10.1371/journal.pone.0028642

Editor: Dirk Steinke, Biodiversity Institute of Ontario - University of Guelph, Canada

Received: September 22, 2011; **Accepted:** November 11, 2011; **Published:** December 13, 2011

Copyright: © 2011 Kuhn 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.

Funding: This work was supported by the Biodiversity and Climate Research Centre (BiK-F, www.bik-f.de), Frankfurt/Main, the research funding programme "LOEWE – Landes-Offensive zur Entwicklung Wissenschaftlich-Ökonomischer Exzellenz" of Hesse's Ministry of Higher Education, Research, and the Arts as well as the German Research Council (grant no. DFG KL 2087/1-1, 1-2, www.dfg.de). 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.

* E-mail: sven.klimpel@senckenberg.de

Introduction

Approximately 20,000 cases of human anisakidosis infections are reported every year from a wide range of coastal regions, primarily in Japan and Europe [1]. This zoonosis, named after a family of marine nematodes, the Anisakidae ("whale-, seal-, cod-, herringworms"), is the result of the ingestion of infectious third stage larvae (L3) in raw or undercooked marine fish products. The term anisakidosis designates infections caused by nematodes of the family Anisakidae, whereas the term anisakiasis includes all infections that are caused by members of the genus *Anisakis* [2]. Besides the major clinical symptoms such as abdominal pain, nausea, vomiting and fever, anisakidosis infections can be associated with an increased risk of allergic responses caused by even very small doses of nematode antigens [2]. Increased globalisation and fast growing international markets, the massive demand for exotic dishes such as sushi, sashimi, salted/smoked herring, and the increasing propensity not to overcook food, have led to an accumulation of infections even in countries that do not have traditions of consuming raw fish [2,3]. Besides the seal worms

Pseudoterranova decipiens and *Contracaecum* spp. (diseases: anisakidosis), species of the genus *Anisakis* (*A. simplex* complex, *A. physeteris*) are considered the most common cause of human anisakiasis infections [1]. The general life cycle of these parasites involves a broad range of invertebrates, (such as crustaceans and chaetognaths), teleost fish species and cephalopods, which act as intermediate or paratenic hosts. Marine mammals such as cetaceans (toothed and baleen whales) and, sometimes, pinnipeds (seals) serve as final hosts [4,5]. Toothed and baleen whales of the families Delphinidae, Ziphiidae, Physeteridae and Kogiidae are considered the main definitive hosts, but members of the Balaenopteridae, Pontoporidae, Monodontidae, Phocoenidae and Neobalaenidae have also been parasitised [6]. The increased number of individuals resulting from stronger regulation to protect whale populations is thought to be another reason for the increase in anisakiasis infections in the last three decades [1,2].

In spite of the fact that *A. simplex* s.l. is the most common anisakiasis cause, it is still unclear whether all *Anisakis* species can cause clinical symptoms in humans [1]. This is why the identification of species and knowledge about their distribution is

of primary importance for understanding parasite epidemiology, especially for species of medical, veterinary and commercial importance [7].

The distribution of marine helminth parasites is influenced by a wide range of abiotic factors such as hydrographic and climate conditions. It is also influenced by transmission pathways that closely follow the trophic relationship between the parasites' final, intermediate and transport hosts. Thus the species range and, especially, feeding behaviour of the hosts has to be taken into account in order to understand the occurrence of anisakid nematodes and predict the likelihood of infections in a given area [5].

Most descriptions of zoogeographical distribution patterns rely on sampling data from regions where the occurrence of species has been recorded [8]. However, this type of information is scarce for many species and usually biased towards accessible areas or places of special interest [9–11]. In order to tackle systematic errors such as oversimplification (e.g. outline maps) or underestimation (e.g. dot maps) in the assessment of biogeographical maps, several techniques were developed that interpolate and project distribution ranges to places where species potentially exist but have not yet been sampled. Triangulation techniques, for example, have played an important role in conservation, and the results of applying the minimum convex polygon to a set of species collection records have been a crucial point in assessing the conservation status of species [12,13]. However, this method has gone through a series of refinements that seek to avoid certain constraints and biases (e.g. overestimation, detection of disjunctive distribution). Burgmann and Fox [14] recommend the use of the α -hull- instead of the convex-hull-interpolation technique because it produces a more flexible outer polygon surface that is more resistant to bias and allows the outer polygon line to be broken into detailed and discrete hulls. More recently, Raedig et al. [11] developed a geometric conditional triangulation approach that is based on a specified interpolation distance and avoids the problem of excluding narrow endemic species from the analysis. The final distribution range of a particular species is constructed not only on those areas that are included within the interpolated triangles, but also on those that connect species occurrence locations within the given interpolation distance as well as areas where locations are isolated due to a lack of neighbouring occurrences.

Based on these developments we present here a methodology for interpolating occurrence locations for every described *Anisakis* spp. (*Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809, det. Krabbe, 1878) (sensu stricto), *A. pegreffii* Campana-Rouget & Biocca, 1955, *A. simplex* C (Nascetti et al., 1986, Mattiucci et al., 1997), *A. typica* (Diesing, 1860), *A. nascettii* Mattiucci et al., 2009, *A. ziphidarum* Paggi et al., 1998, *A. physeteris* Baylis 1923, *A. paggiae* Mattiucci et al. 2005, *A. brevispiculata* Dollfus, 1966), which combines aspects of the α -hull algorithm and the geometric interpolation approach [11,15–25].

Results and Discussion

A total of 373 *Anisakis* spp. larvae from 30 teleost and bony fish host species were collected during fieldwork in 21 different sampling areas and identified by sequence analyses of ribosomal internal transcribed spacers (ITS-1/2, 5.8S) (Table S1, Figure S1) (Genbank Accession number JN968593–JN968965). Sequence analyses identified five already described *Anisakis* species (*A. simplex* s.s., *A. pegreffii*, *A. simplex* C, *A. typica*, *A. physeteris*) (Table S2). We combined the sequence data obtained with occurrence reports (584 nematode individuals) taken from 53 revised publications [5,6,18–21,23,26–71] and, using a non-commercial geographical information system (QGIS) transferred them as presence data to a

grid with a resolution of $1^\circ \times 1^\circ$ covering the globe. Based on the centroids of the quadrats, the α -hull was calculated for 25 different values ranging from 2 to 50 in a two-step interval using the alpha-hull package [72]. The final distribution of every species was visualized in a range map with a continuous colour gradient, in which the intensity of the colour increased with the probability of species occurrence in a certain area (Figure S2).

The results of our modeling strongly indicate the existence of species-specific distribution patterns of *Anisakis* spp. within different climate zones and oceans that are in principle congruent with those of their respective final hosts (Figure 1). To date, 35 marine mammals and more than 75 different bony and elasmobranch fish species have been verified by molecular methods as potential hosts for *Anisakis* spp., but several studies provide evidence that the members of the *Anisakis* species complexes differ in their ecology and final host preferences [5,21,28,37,41,73]. We found that species that are considered to be phylogenetically closely related show similar distribution patterns due to major congruities in the parasites' ecology and host preferences.

The genus *Anisakis* comprises two major clades. Whereas the first clade includes the *A. simplex* complex (*A. simplex* s.s., *A. pegreffii*, *A. simplex* C), as well as *A. typica* and both sister-species (*A. nascettii* and *A. ziphidarum*), the second clade consists exclusively of the *A. physeteris* complex (*A. brevispiculata*, *A. paggiae*, *A. physeteris*) [5,6].

Species of the *A. simplex* complex are mainly distributed within the Atlantic Ocean and in the West and East Pacific where large populations of their final hosts (Delphinidae) occur (Figure 1). In the case of *A. simplex* s.s., the most common exciter of human anisakiasis infection in Japan [74], the distribution could be narrowed down to a northern hemisphere range within the West and East Atlantic and Pacific Ocean, between 20°N and far beyond the Arctic polar circle (80°N) (Figure 1). The species range of *A. pegreffii* extends from Mediterranean waters through the East Atlantic Ocean down to the Antarctic Peninsula, with additional records in Japanese and Chinese waters (Figure 1). *Anisakis simplex* C has a discontinuous range: along the Canadian/US east coast; at the southern tip of Africa; and between New Zealand and Australia. Occurrence has also been proven between South American and Antarctic waters (Figure 1). These three closely related species of the *A. simplex* complex mainly include oceanic delphinids (e.g. Short-beaked

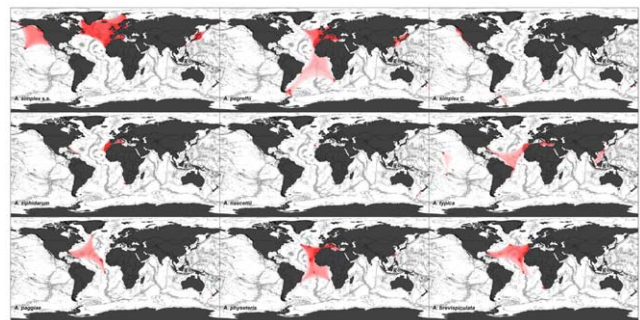


Figure 1. Modeled species range of every described *Anisakis* spp. Colour intensity reflects the probability of *Anisakis* occurrence. Dark red shadings indicate molecular proven *Anisakis* records. First clade: *Anisakis simplex* s.s., *A. pegreffii*, *A. simplex* C (building the *A. simplex* complex), *A. ziphidarum*, *A. nascettii* and *A. typica*. Second clade: *Anisakis paggiae*, *A. physeteris* and *A. brevispiculata* (*A. physeteris* complex) belong to the second clade (phylogeny follows Klimpel et al. 2010) [45].

doi:10.1371/journal.pone.0028642.g001

Common Dolphin *Delphinus delphis*, Long-finned Pilot Whale *Globicephala melas*) as final hosts in their life cycle, which are known to form large populations in the Atlantic Ocean where they usually feed on pelagic fish and cephalopods. The specific distribution patterns shown by these anisakids are likely to be a consequence of dispersal through the faeces of infested oceanic delphinids. This contrasts with the distribution of *A. typica*, the most abundant species in the tropics and subtropics between 45°N and 25°S (Figure 1). *Anisakis typica* is a common parasite of various dolphin species of warmer temperate waters, such as the Tucuxi *Sotalia fluviatilis*, the Common Bottlenose Dolphin *Tursiops truncatus* and the Pantropical Spotted Dolphin *Stenella attenuata*. These are more usually associated with shallower waters near the coast [50].

The sister taxa *A. ziphidarum* and *A. nascettii* are in principle congruent (Figure 1). While both species are distributed in the East Atlantic Ocean near Madeira and the Moroccan coast, the West Pacific between New Zealand and South Australia, and the southern tip of Africa, *A. ziphidarum* has a slightly extended range with additional records in the West Atlantic Ocean (Figure 1). This broadly similar zoogeography is also mirrored in their ecology as they have major similarities regarding their host preferences. Whereas *A. ziphidarum* also includes Cuvier's Beaked Whale *Ziphius cavirostris* as potential final host in its life cycle, both species seem to prefer ziphiid whales of the genus *Mesoplodon* spp. Taking into account the collection sites of the definitive hosts so far recorded, Mattiucci et al. [21] suggested that the geographical distribution of these parasites is related to that of their final hosts.

The close genetic relationship of the three representatives of the *A. physeteris* complex (*A. physeteris*, *A. paggiae*, *A. brevispiculata*) is also reflected in a relatively homogeneous distribution throughout the central Atlantic Ocean (Figure 1). Very similar to *A. ziphidarum* and *A. nascettii*, these species are known to be host specific and broadly include sperm whales as final hosts. While *A. physeteris* is the only species of this complex that parasitizes the Sperm Whale *Physeter macrocephalus*, all of them show clear preferences for the kogiid whales, the Pygmy Sperm Whale *Kogia breviceps* and the Dwarf Sperm Whale *Kogia sima*, which are mainly distributed in the central Atlantic Ocean. Sperm whales typically inhabit deepwater habitats in the tropics and the temperate zones where they mostly feed in depths between 500–1200 m, primarily on cephalopods and, less frequently, on deep sea fish and crustaceans [6,75].

Our results support preceding studies that propose that anisakid nematodes as useful biological indicators for their final host distribution and abundance as they closely follow the trophic relationships among their successive hosts. Klimpel et al. (2011) [6] identified for the first time *A. paggiae* in the Irminger Sea and indicated a more extended migration towards northern latitudes than could have been inferred from the distribution range of kogiid whales reported so far. Our modeling clearly demonstrates, that the distribution patterns of *Anisakis* spp. can be narrowed down to certain areas within climatic zones and oceans and are mainly influenced by the species ranges and feeding behaviours of their respective intermediate and mammalian final hosts.

The world's least developed countries are particularly reliant on fish, which provides 27% of their dietary protein intake [76]. These countries also produce 20% of the world's fish exports [76]. A broad knowledge of the distribution of *Anisakis* spp. is of particular importance for predicting the likelihood of infection in order to reduce the risk of anisakidosis cases in a given area.

Materials and Methods

Ethics Statement

An approval by a review board institution or ethics committee was not necessary, because all the fish in the current study were obtained in different locations from fishermen selling fresh fish for consumption or were collected during regularly fishery cruises.

Sample collection

A total of 373 *Anisakis* spp. larvae from 30 teleost and bony fish host species were collected during field phase from 21 different sampling areas (Table S1, Figure S1). Fish were identified according to Fishbase [77] and Gon and Heemstra [78]. Nematodes were extensively washed in 0.9% saline solution and identified morphologically to genus level according to Anderson (2000) and Moravec [79,80]. All samples were fixed and stored in EtOH (abs.) prior to molecular examination.

PCR amplification and species identification

Genomic DNA was isolated and purified from individual *Anisakis* spp. larvae using a genomic DNA extraction kit (Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen, Germany) according to the instructions of the manufacturer. The rDNA region comprising the ITS-1, 5.8S, ITS-2 and flanking sequences (=ITS+) was amplified using primers NC2 (5'-TTA-GTT-TCT-TTT-CCT-CCG-CT-3') and TK1 (5'-GGC-AAA-AGT-CGT-AAC-AAG-GT-3') [81]. Primer TK1 was manually designed and then synthesized by Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany). PCR-reaction (50 µl) included 25 µl Master-Mix (Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen, Germany) containing dNTP, MgCl₂, Buffer and Taq-Polymerase, 3 µl of each primer, 14ddH₂O and 5 µl genomic DNA. Each PCR reaction were performed in a thermocycler (Peqlab, Germany) under the following conditions: after an initial denaturation at 95°C for 1 min, 40 cycles of 94°C for 45 sec (denaturation), 55°C for 45 sec (annealing), 72°C for 45 sec (extension), followed by a final extension at 72°C for 10 min. Samples without DNA were included in each PCR run. PCR products were examined on 1% agarose gels. A 100 bp ladder marker (peqGOLD, Erlangen, Germany) was used to estimate the size of the PCR products. To prepare the samples for the sequencing, PCR products were purified with Cycle-Pure Kit (Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen, Germany). Afterwards a total volume of 7 µl, including 2 µl primer (individually) and 5 µl of the PCR product (250 ng/µl) were sequenced by SeqLab (Goettingen GmbH, Germany). Both spacers and the 5.8S gene from each PCR product were sequenced, using primer TK1 (5'-GGC-AAA-AGT-CGT-AAC-AAG-GT-3'). The ITS-1, 5.8S and ITS-2 sequences were determined for all 373 *Anisakis* nematodes isolated from the 30 host species (Genbank Accession number JN968593–JN968965). For species identification, the obtained sequences were compared with those previously deposited for the same marker in the Genbank using the BLASTn algorithm (Table S2).

Zoogeographical interpolation

A database was built comprising the species names and the exact coordinates or geographical regions where they have been recorded. The spatial information were collected from the fieldwork and molecular analyses mentioned above as well as from literature review of 53 publications [5,6,18–21,23,26–71]. The geographical information contained in this database were transferred onto a grid of 1°×1° covering the globe in which species occurrences were overlaid and the corresponding quadrats marked as occurrences for each species in turn. This procedure

was manually done using the non-commercial geographical information system Quantum GIS (QGIS, version 1.6.0) (Figure S2A) [82].

To estimate distribution ranges two steps were followed. First, the alpha-hull was calculated based on the centroids (i.e. points) of the quadrats where a species was recorded [14,83]. For this, a Delaunay triangulation between the centroids was applied and the average length of all lines of all triangles was calculated. The final hull (i.e. polygon) results from those centroids, which are connected by a line smaller than a multiple (alpha parameter) of the average line length (Figure S2B). This procedure was implemented using the 'alphahull' package [72] in the R statistical software [84]. Second, distribution ranges were defined as the corresponding quadrats intersecting the created polygons and also those quadrats with single occurrences that were not included within any of the polygons (Figure S2C) [11].

Since the size and number of polygons as well as the number of single occurrences depends on the value of the alpha parameter (i.e. an alpha of zero is equal to the set of single occurrences (dot map) and infinite alpha will encompass all points in one polygon (convex hull) [14], the distribution range of each species was calculated with 25 different alphas (i.e. a sequence of alphas ranging from 2 to 50 in a two-step interval). Results were summed up into a final distribution range map which is depicted in a continuous colour gradient. Darker colours represent areas where the probability of finding the species is relatively high and as the colours get lighter the uncertainties of an area being part of the species range increases (Figure S2D).

Supporting Information

Figure S1 Sampling locations of anisakid nematodes for molecular species identification. Locations marked with red dots and respective locality abbreviations. Asterisks indicate multiple sampling sites. Abbreviations are listed in Table S1. (TIF)

References

- Hochberg NS, Hamer DH (2010) Anisakidosis: perils of the deep. *Clin Infect Dis* 51: 806–812.
- Audicana MT, Kennedy MW (2008) *Anisakis simplex*: from obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity. *Clin Microbiol Rev* 21: 360–379.
- Chai JY, Murrell KD, Lymbery AJ (2005) Fish-borne parasitic zoonoses: status and issues. *Int J Parasitol* 35: 1233–1254.
- Klimpel S, Palm HW, Rückert S, Piatkowski U (2004) The life cycle of *Anisakis simplex* in the Norwegian Deep (northern North Sea). *Parasitol Res* 94: 1–9.
- Mattiucci S, Nascetti G (2008) Advances and trends in the molecular systematics of anisakid nematodes, with implications for their evolutionary ecology and the host-parasite co-evolutionary processes. *Adv Parasit* 66: 47–148.
- Klimpel S, Kuhn T, Busch MW, Karl H, Palm HW (2011) Deep-water life cycle of *Anisakis paggiae* (Nematoda: Anisakidae) in the Irminger Sea indicates kogiid whale distribution in North Atlantic waters. *Polar Biol* 34: 899–906.
- Anderson TJC, Blouin MS, Beech NR (1998) Population biology of parasitic nematodes: applications of genetic markers. *Adv Parasitol* 41: 219–283.
- Gaston KJ (1991) How large is a species' geographic range? *Oikos* 61: 434–438.
- Reddy S, Dávalos L (2003) Geographic sampling bias and its implications for conservation priorities in Africa. *J Biogeogr* 30: 1719–1727.
- Kadmon R, Farber O, Danin A (2004) Effect of roadside bias on the accuracy of predictive maps produced by bio-climate models. *Ecol Appl* 14: 401–413.
- Raedig C, Dormann FC, Hildebrandt A, Lautenbach S (2010) Reassessing neotropical angiosperm distribution patterns based on monographic data: a geometric interpolation approach. *Biodivers Conserv* 19: 1523–1546.
- IUCN (2001) IUCN Red List Categories and Criteria version 3.1. Cambridge: IUCN Species Survival Commission. 13. IUCN;1994.
- IUCN Red List Categories and Criteria. Cambridge: IUCN Species Survival Commission).
- Burgmann MA, Fox JC (2003) Bias in species range estimates from minimum convex polygons: implications for conservation and options for improved planning. *Anim Conserv* 6: 19–28.
- Rudolphi CA (1819) Entozoorum synopsis cui accedunt mantesia duplex et indices locupletissimi. Berolini. 811 p.

Figure S2 Zoogeographical interpolation approach in four steps. (A) geographical information where transferred onto a grid of $1^\circ \times 1^\circ$ covering the globe. Corresponding quadrats marked as occurrence for each species. (B) The final hull resulting from those centroids, which are connected by a line smaller than a multiple of the average line length (α -Parameter). (C) Distribution ranges were defined as the corresponding quadrats intersecting the created polygons. (D) Range was calculated for 25 different α -values ranging from 2 to 50 in a two-step interval. Results were visualized by a continuous colour gradient (Figure 1). (TIF)

Table S1 Information on parasites sampling locations and hosts. Sampling locations of the 373 anisakid nematodes used for molecular analyses including abbreviation (Abb.), host and sample size (n). Asterisks mark multiple sampling sites with the same abbreviation (see Figure S1). (XLS)

Table S2 Total numbers of identified anisakid nematodes including hosts and sampling location. For location abbreviations see Table S1. Asimss = *Anisakis simplex* s.s., Apeg = *A. pegreffii*, Atyp = *A. typica*, Aphy = *A. physeteris*. (XLS)

Acknowledgments

We thank S. Mattiucci and H. W. Palm for providing *Anisakis* specimen. We are grateful to A. Kijewska for additional data on locality records. We also thank M. Leigh for his comments on an early draft of the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: TK JGM SK. Performed the experiments: TK JGM. Analyzed the data: TK JGM. Contributed reagents/materials/analysis tools: TK SK. Wrote the paper: TK JGM SK.

- Krabbe H (1878) Saelernes og Tandhvalernes Spolorme. *Overs K Danske Vidensk Selsk Forh* 1: 43–51.
- Campana-Rouget Y, Biocca E (1955) A new species of *Anisakis* in a Mediterranean seal. *Ann Parasitol Hum Comp* 30: 477–480.
- Nascetti G, Paggi L, Orecchia P, Smith JW, Mattiucci S, et al. (1986) Electrophoretic studies on the *Anisakis simplex* complex (Ascaridida: Anisakidae) from the Mediterranean and North-East Atlantic. *Int J Parasitol* 16: 633–640.
- Mattiucci S, Nascetti G, Cianchi R, Paggi L, Arduino P, et al. (1997) Genetic and ecological data on the *Anisakis simplex* complex with evidence for a new species (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *J Parasitol* 83: 401–416.
- Diesing KM (1861) Revision der Nematoden. *Sitz-Ber D Akad D Wiss, Math-Nat KI Wien* 42: 595–736.
- Mattiucci S, Paoletti M, Webb SC (2009) *Anisakis nascetti* n. sp. (Nematoda: Anisakidae) from beaked whales of the southern hemisphere: morphological description, genetic relationship between congeners and ecological data. *Syst Parasitol* 74: 199–217.
- Paggi L, Nascetti G, Webb SC, Mattiucci S, Cianchi R, et al. (1998) A new species of *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Anisakidae) from beaked whale (Ziphiidae): allozyme and morphological evidence. *Syst Parasitol* 40: 161–174.
- Baylis HA (1923) An ascarid from the sperm whale. *Ann Mag nat Hist Ser 9* 11: 211–217.
- Mattiucci S, Nascetti G, Dailey M, Webb SC, Barros N, et al. (2005) Evidence for a new species of *Anisakis* Dujardin, 1845: morphological description and genetic relationships between congeners (Nematoda: Anisakidae). *Syst Parasitol* 61: 157–171.
- Dollfus RP (1966) Helminthofaune de *Kogia breviceps* (Blainville, 1838) cétacé odontocète. *Ann Soc Sci Nat Charente-Marit* 4: 3–6.
- Abe N, Ohya N, Yanagiguchi R (2005) Molecular characterization of *Anisakis pegreffii* larvae in Pacific cod in Japan. *J Helminthol* 79: 303–306.
- Abollo E, Gestal C, Pascual S (2001) *Anisakis* infestation in marine fish and cephalopods from Galician waters: an updated perspective. *Parasitol Res* 87: 492–499.

28. Cólón-Llavina MM, Mignucci-Giannoni AA, Mattiucci S, Paoletti M, Nascetti G, et al. (2009) Additional records of metazoan parasites from Caribbean marine mammals, including genetically identified anisakid nematodes. *Parasitol Res* 105: 1239–1252.
29. Cross MA, Collins C, Campbell N, Watts PC, Chubb JC, et al. (2007) Levels of intra-host and temporal sequence variation in a large CO1 sub-units from *Anisakis simplex* sensu stricto (Rudolphi 1809) (Nematoda: Anisakidae): implications for fisheries management. *Mar Biol* 151: 695–702.
30. Du C, Zhang L, Shi M, Ming Z, Hu M, et al. (2010) Elucidating the identity of *Anisakis* larvae from a broad range of marine fishes from the Yellow Sea, China, using a combined electrophoretic-sequencing approach. *Electrophoresis* 31: 654–658.
31. Dzido J, Kijewska A, Rockicka M, Światalska-Koseda A, Rokicki J (2009) Report on anisakid nematodes in polar regions – preliminary results. *Polar Science* 3: 207–211.
32. Fang W, Xu S, Zhang S, Wang Y, Chen X, et al. (2010) Multiple primer PCR for the identification of anisakid nematodes from Taiwan Strait. *Exp Parasitol* 124: 197–201.
33. Farjallah S, Busi M, Mahjoub MO, Slimane BB, Paggi L, et al. (2008) Molecular characterization of larval anisakid nematodes from marine fish off the Moroccan and Mauritanian coasts. *Parasitol Int* 57: 430–436.
34. Farjallah S, Slimane BB, Busi M, Paggi L, Amor N, et al. (2008) Occurrence and molecular identification of *Anisakis* spp. from the North African coasts of Mediterranean Sea. *Parasitol Res* 102: 371–379.
35. Garcia A, Mattiucci S, Damiano S, Santos MN, Nascetti G (2011) Metazoan parasites of swordfish, *Xiphias gladius* (Pisces: Xiphiidae) from the Atlantic Ocean: implications for host stock identification. *ICES J Mar Sci* 68: 175–182.
36. Garcia A, Santos MN, Damiano S, Nascetti G, Mattiucci S (2008) The metazoan parasites of swordfish from Atlantic tropical-equatorial waters. *J Fish Biol* 73: 2274–2287.
37. Iniguez AM, Santos CP, Paulo Vicente AC (2009) Genetic characterization of *Anisakis typica* and *Anisakis physeteris* from marine mammals and fish from the Atlantic Ocean off Brazil. *Vet Parasitol* 165: 350–356.
38. Karl H, Baumann F, Ostermeyer U, Kuhn T, Klimpel S (2011) *Anisakis simplex* (s.s.) larvae in wild Alaska salmon: no indication of post-mortem migration from viscera into flesh. *Dis Aquat Org* 94: 201–209.
39. Kijewska A, Dzido J, Rokicki J (2009) Mitochondrial DNA of *Anisakis simplex* s.s. as a potential tool for differentiating populations. *J Parasitol* 95: 1364–1370.
40. Kijewska A, Dzido J, Shukhgaler O, Rokicki J (2009) Anisakid parasites caught on the African Shelf. *J Parasitol* 95: 639–645.
41. Klimpel S, Kellermanns E, Palm HW (2008) The role of pelagic swarm fish (Myctophidae: Teleostei) in the oceanic life cycle of *Anisakis* sibling species at the Mid-Atlantic Ridge, Central Atlantic. *Parasitol Res* 104: 43–53.
42. Klimpel S, Busch MW, Sutton T, Palm HW (2010) Meso- and bathy-pelagic fish parasites at the Mid-Atlantic Ridge (MAR): Low host specificity and restricted parasite diversity. *Deep-Sea Res* 57: 596–603.
43. Klimpel S, Kellermanns E, Palm HW, Moravec F (2007) Zoogeography of fish parasites of the pearlside (*Mauroliscus muelleri*), with genetic evidence of *Anisakis simplex* (s.s.) from the Mid-Atlantic Ridge. *Mar Biol* 152: 725–732.
44. Klimpel S, Palm HW, Busch MW, Kellermanns E (2008) Fish parasites in the bathyal zone: The halosaur *Halosaurus macrochir* (Günther, 1878) from the Mid-Atlantic Ridge. *Deep-Sea Res* 55: 229–235.
45. Klimpel S, Busch MW, Kuhn T, Rohde A, Palm HW (2010) The *Anisakis simplex* complex off the South Shetland Islands (Antarctica): endemic populations versus introduction through migratory hosts. *Mar Ecol-Prog Ser* 403: 1–11.
46. Marques JF, Cabral HN, Busi M, D'Amelio S (2006) Molecular identification of *Anisakis* species from Pleuronectiformes off the Portuguese coast. *J Helminthol* 80: 47–51.
47. Mattiucci S, Nascetti G (2007) Genetic diversity and infection levels of anisakid nematodes parasitic in fish and marine mammals from Boreal and Austral hemispheres. *Vet Parasitol* 148: 43–57.
48. Mattiucci S, Abaunza P, Ramadori L, Nascetti G (2004) Genetic identification of *Anisakis* larvae in European hake from Atlantic and Mediterranean waters for stock recognition. *J Fish Biol* 65: 495–510.
49. Mattiucci S, Nascetti G, Bullini L, Orecchia P, Paggi L (1986) Genetic structure of *Anisakis physeteris*, and its differentiation from the *Anisakis simplex* complex (Ascaridida: Anisakidae). *Parasitology* 93: 383–387.
50. Mattiucci S, Paggi L, Nascetti G, Portes Santos C, Costa G, et al. (2002) Genetic markers in the study of *Anisakis typica* (Diesing, 1860): larval identification and genetic relationship with other species of *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Anisakidae). *Syst Parasitol* 51: 159–170.
51. Mattiucci S, Farina V, Campbell N, MacKenzie K, Ramos P, et al. (2008) *Anisakis* spp. larvae (Nematoda: Anisakidae) from Atlantic horse mackerel: Their genetic identification and use as biological tags for host stock characterization. *Fish Res* 89: 146–151.
52. Mattiucci S, Farina V, Garcia A, Santos MN, Mariniello L, et al. (2005) Metazoan parasitic infections of Swordfish (*Xiphias gladius* L., 1758) from the Mediterranean Sea and the Atlantic Gibraltar waters: Implications for Stock Assessment. *Col Vol Sci Pap ICCAT* 58: 1470–1482.
53. Mattiucci S, Paggi L, Nascetti G, Abollo E, Webb SC, et al. (2001) Genetic divergence and reproductive isolation between *Anisakis brevispiculata* and *Anisakis physeteris* (Nematoda: Anisakidae). *Int J Parasitol* 16: 633–640.
54. Mattiucci S, Paggi L, Nascetti G, Ishikura H, Kikuchi K, et al. (1998) Allozyme and morphological identification of *Anisakis*, *Contracaecum* and *Pseudoterranova* from Japanese waters (Nematoda, Ascaridoidea). *Syst Parasitol* 40: 81–92.
55. Murphy TM, Berzano M, O'Keefe SM, Cotter DM, McEvoy, et al. (2010) Anisakid larvae in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) grilse and post-smolts: molecular identification and histopathology. *J Parasitol* 96: 77–82.
56. Nadler SA, D'Amelio S, Dailey MD, Paggi L, Siu S, et al. (2005) Molecular phylogenetics and diagnosis of *Anisakis*, *Pseudoterranova*, and *Contracaecum* from northern Pacific marine mammals. *J Parasitol* 91: 1413–1429.
57. Noguera P, Collins C, Bruno D, Pert C, Turnbull A, et al. (2009) Red vent syndrome in wild Atlantic salmon *Salmo salar* in Scotland is associated with *Anisakis simplex* sensu stricto (Nematoda: Anisakidae). *Dis Aquat Organ* 87: 199–215.
58. Palm HW, Damriyasa IM, Linda, Oka IBM (2008) Molecular genotyping of *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Ascaridoidea: Anisakidae) larvae from marine fish of Balinese and Javanese waters, Indonesia. *Helminthologia* 45: 3–12.
59. Póntes T, D'Amelio S, Costa G, Paggi L (2005) Molecular characterization of larval anisakid nematodes from marine fishes of Madeira by a PCR-based approach, with evidence for a new species. *J Parasitol* 91: 1430–1434.
60. Quiazon KM, Yoshinaga T, Ogawa K, Yukami R (2008) Morphological differences between larvae and in vitro-cultured adults of *Anisakis simplex* (sensu stricto) and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae). *Parasitol Int* 57: 483–489.
61. Quiazon KM, Yoshinaga T, Santos MD, Ogawa K (2009) Identification of larval *Anisakis* spp. (Nematoda: Anisakidae) in Alaska pollock (*Theragra chalcogramma*) in northern Japan using morphological and molecular markers. *J Parasitol* 95: 1227–1232.
62. Skov J, Kania PW, Olsen MM, Lauridsen JH, Buchmann K (2009) Nematode infections of maricultured and wild fishes in Danish waters: a comparative study. *Aquaculture* 298: 24–28.
63. Suzuki J, Murata R, Hosaka M, Araki J (2010) Risk factors for human *Anisakis* infection and association between the geographic origins of *Scomber japonicus* and anisakid nematodes. *Int J Food Microbiol* 137: 88–93.
64. Umehara A, Kawakami Y, Araki J, Uchida A (2008) Multiplex PCR for the identification of *Anisakis simplex* sensu stricto, *Anisakis pegreffii* and the other anisakid nematodes. *Parasitol Int* 57: 49–53.
65. Umehara A, Kawakami Y, Araki J, Uchida A, Sugiyama H (2008) Molecular analysis of Japanese *Anisakis simplex* worms. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 39: 26–31.
66. Umehara A, Kawakami Y, Matsui T, Araki J, Uchida A (2006) Molecular identification of *Anisakis simplex* sensu stricto and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) from fish and cetacean in Japanese waters. *Parasitol Int* 55: 267–271.
67. Umehara A, Kawakami Y, Ooi HK, Uchida A, Ohmae H, et al. (2010) Molecular identification of *Anisakis* type I larvae isolated from hairtail fish off the coasts of Taiwan and Japan. *Int J Food Microbiol* 143: 161–165.
68. Valentini A, Mattiucci S, Bondanelli P, Webb SC, Mignucci-Giannone AA, et al. (2006) Genetic relationships among *Anisakis* species (Nematoda: Anisakidae) inferred from mitochondrial COX2 sequences, and comparison with allozyme data. *J Parasitol* 92: 156–166.
69. Zhang L, Hu M, Shamsi S, Beveridge I, Li H, et al. (2007) The specific identification of anisakid larvae from fishes from the Yellow Sea, China, using mutation scanning-coupled sequence analysis of nuclear ribosomal DNA. *Mol Cell Probe* 21: 386–390.
70. Zhu XQ, Gasser RB, Podolska M, Chilton NB (1998) Characterisation of anisakid nematodes with zoonotic potential by nuclear ribosomal DNA sequences. *Int J Parasitol* 28: 1911–1921.
71. Zhu XQ, Podolska M, Liu JS, Yu HQ, Chen HH, et al. (2007) Identification of anisakid nematodes with zoonotic potential from Europe and China by single-strand conformation polymorphism analysis of nuclear ribosomal DNA. *Parasitol Res* 101: 1703–1707.
72. Pateiro-López B, Rodríguez-Casal A (2010) Generalizing the convex hull of a sample: the R package alphahull. *J Stat Software* 34: 1–28.
73. Iniguez AM, Carvalho VL, Alves Motta MR, Sousa Nunes Pinheiro DC, Paulo Vicente AC (2011) Genetic analysis of *Anisakis typica* (Nematoda: Anisakidae) from cetaceans of the northeast coast of Brazil: new data on its definitive hosts. *Vet Parasitol* 178: 293–299.
74. Umehara A, Kawakami Y, Matsui T, Araki J, Uchida A (2007) Molecular identification of the etiological agent of the human anisakiasis in Japan. *Parasitol Int* 56: 211–215.
75. West KL, Walker WA, Baird RW, White W, Levine G, et al. (2009) Diet of pygmy sperm whales (*Kogia breviceps*) in the Hawaiian Archipelago. *Mar Mammal Sci* 25: 931–943.
76. Allison EH, Perry AL, Badjeck MC, Adger NW, Brown K, et al. (2009) Vulnerability of national economies to the impacts of climate change on fisheries. *Fish Fisheries* 10: 173–196.
77. Froese R, Pauly D, eds (2011) Fishbase. Available from www.fishbase.org (accessed August, 2011).
78. Gon O, Heemstra PC, eds. Fishes of the Southern Ocean. Grahamstown: J.L.B. Smith Institute of Ichthyology. 462 p.
79. Anderson RC (2000) Nematode parasites of vertebrates - Their development and transmission. Wallingford: CAB International. 650 p.

80. Moravec F (1994) Parasitic nematodes of freshwater fishes of Europe. Praha: Academia. 473 p.
81. Zhu XQ, Gasser RB, Jacobs DE, Hung GC, Chilton NB (2000) Relationships among some ascaridoid nematodes based on ribosomal DNA sequence data. *Parasitol Res* 86: 738–744.
82. Quantum GIS Development Team (2011) Quantum GIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project (<http://qgis.osgeo.org>).
83. Edelsbrunner H, Kirkpatrick DG, Seidel R (1983) On the shape of a set of points in the plane. *IEEE Trans Inform Theory* IT 29: 551–559.
84. R Development Core Team (2009) R: a language and environment for statistical computing. Available from www.r-project.org.

Global assessment of molecularly identified *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Anisakidae) in their teleost intermediate hosts

Thomas Kuhn¹, Frank Hailer², Harry W. Palm³ and Sven Klimpel¹

¹Biodiversity and Climate Research Centre, Medical Biodiversity and Parasitology, Senckenberg Gesellschaft für Naturforschung and Goethe-University, Institute for Ecology, Evolution and Diversity, Frankfurt/Main, Germany;

²Biodiversity and Climate Research Centre, Evolutionary Genomics, Senckenberg Gesellschaft für Naturforschung, Frankfurt/Main, Germany;

³Aquaculture and Sea-Ranching, Faculty of Agricultural and Environmental Sciences, University Rostock, Rostock, Germany

Abstract: Here, we present the ITS ribosomal DNA (rDNA) sequence data on 330 larvae of nematodes of the genus *Anisakis* Dujardin, 1845 collected from 26 different bony fish species from 21 sampling locations and different climatic zones. New host records are provided for *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809) sensu stricto (s.s.) and *A. pegreffii* Campana-Rouget et Biocca, 1955 from *Anoplopoma fimbria* (Pallas) (Santa Barbara, East Pacific), *A. typica* (Diesing, 1860) from *Caesio cuning* (Bloch), *Lepturacanthus savala* (Cuvier) and *Katsuwonus pelamis* (Linnaeus) (Indonesia, West Pacific), *A. simplex* s.s. from *Cololabis saira* (Brevoort) (Hawaii, Central Pacific), *A. simplex* C of Nascetti et al. (1986) from *Sebastolobus alascanus* Bean (Santa Barbara, East Pacific) and *A. physeteris* Baylis, 1923 from *Synphobranchus kaupii* Johnson (Namibia, East Atlantic). Comparison with host records from 60 previous molecular studies of *Anisakis* species reveals the teleost host range so far recorded for the genus. Perciform (57 species) and gadiform (21) fishes were the most frequently infected orders, followed by pleuronectiforms (15) and scorpaeniforms (15). Most commonly infected fish families were Scombridae (12), Gadidae (10), Carangidae (8) and Clupeidae (7), with *Merluccius merluccius* (Linnaeus) alone harbouring eight *Anisakis* species. Different intermediate host compositions implicate differing life cycles for the so far molecularly identified *Anisakis* sibling species.

Keywords: Internal transcribed spacer (ITS), life cycle ecology, toothed/baleen whales, anisakiasis, paratenic host, sibling species, host range

Anisakid nematodes have a worldwide distribution and are known as causative agents of the human anisakidosis, a painful inflammation of the gastrointestinal tract caused by the ingestion of the third-stage larvae (L₃). Infections in humans can be acquired by ingestion of raw or insufficiently cooked fish and fisheries products (Sakanari and McKerrrow 1989, Nadler et al. 2005, Audicana and Kennedy 2008). Due to the high prevalence in commercially important fish species such as *Clupea harengus* Linnaeus or species of *Oncorhynchus* Suckley, members of the genus *Anisakis* Dujardin, 1845 can be considered the most common causative agents of this zoonosis (disease: anisakiasis) (Mattiucci and Nascetti 2008, Hochberg and Hamer 2010, Karl et al. 2011). Besides the major clinical symptoms such as vomiting, fever or epigastric pain, the incidence of *Anisakis*-related severe allergic disorders is a frequently documented problem and reflects the necessity of continuous research efforts in this field (Daschner and Pascual 2005, Audicana and Kennedy 2008, Daschner et al. 2011).

Anisakis has an indirect, heteroxenous life cycle including four larval stages. Typical definitive hosts are toothed and baleen whales (Cetacea) of the families Delphinidae, Ziphiidae, Physeteridae and Kogiidae, but species of the Balaenopteridae, Pontoporidae, Monodontidae, Phocoenidae, Neobalaenidae and even Otariidae are known to become infected (e.g. Klimpel et al. 2004, 2010a, Nadler et al. 2005, Mattiucci and Nascetti 2008, Kuhn et al. 2011). The eggs are shed into to the surrounding water column with the faeces of the definitive hosts. The larvae hatch and are subsequently ingested by small crustaceans (Køie et al. 1995, Marcogliese 1995, Køie 2001, Busch et al. 2012). They are then transferred within the food chain into larger macroinvertebrates (e.g. amphipods, cephalopods), where they grow in length and become infective to fishes and definitive hosts (Klumpel et al. 2004, 2008, McClelland 2005, Mattiucci and Nascetti 2008, Busch et al. 2012). Macroinvertebrates as well as small schooling fish are thought to be important intermediate/paratenic

Address for correspondence: T. Kuhn, Biodiversity and Climate Research Centre, Medical Biodiversity and Parasitology, Senckenberg Gesellschaft für Naturforschung, Goethe-University, Institute for Ecology, Evolution and Diversity, Senckenberganlage 25, D-60325 Frankfurt/Main, Germany. Phone: +49 69 7542 1896; Fax: +49 69 7542 7904; E-mail: thomas.kuhn@senckenberg.de

hosts. *Anisakis* is also capable of infecting larger piscivorous hosts (e.g. *Gadus morhua* Linnaeus, *Merluccius merluccius* [Linnaeus]) without further moulting. This leads to the accumulation of enormous numbers of larvae and enhances the transmission probability to their respective definitive hosts (Lile 1998, Hammerschmidt et al. 2009, Klimpel and Palm 2011, Busch et al. 2012).

Until molecular techniques became routine diagnostic tools, the identification of larval anisakid nematodes was difficult and largely based on slight differences in the arrangements and morphometrics of the internal structures such as the alimentary tract, the orientation of the excretory pore and the shape of the tail (Mattiucci and Nascetti 2008, Klimpel and Palm 2011). In the case of the morphological almost indistinguishable species *Anisakis* (cryptic species), a correct assignment to their respective species was not feasible, which often led to erroneous identifications (Klimpel and Palm 2011). Population-based multilocus enzyme-electrophoresis (MAE) as well as PCR-based approaches such as PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism) or DNA sequencing of genetic markers have remarkably increased our knowledge of the actual species diversity and species composition (e.g. Anderson et al. 1998, Klimpel et al. 2008). Application of these methods to taxonomic studies of *Anisakis* spp. has revealed the existence of nine distinct species with different host preferences, ecology and zoogeography (e.g. Klimpel et al. 2004, 2008, Valentini et al. 2006, Mattiucci and Nascetti 2008).

The genus comprises two major clades; the first clade includes the *A. simplex*-complex (*A. simplex* [Rudolphi, 1809] sensu stricto [s.s.], *A. pegreffii* Campana-Rouget et Biocca, 1955, *A. simplex* C of Nascetti, Paggi, Orecchia, Smith, Mattiucci et Bullini, 1986) as well as *A. typica* (Diesing, 1860) and two sister-species *A. nascettii* Mattiucci, Paoletti et Webb, 2009 and *A. ziphidarum* Paggi, Nascetti, Webb, Mattiucci, Cianchi et Bullini, 1998. The second clade consists exclusively of the *A. physeteris*-complex (*A. brevispiculata* Dollfus, 1966, *A. paggiae* Mattiucci, Nascetti, Dailey, Webb, Barros, Cianchi et Bullini, 2005, *A. physeteris* [Baylis, 1923]) (Mattiucci et al. 2009, Klimpel et al. 2011, Kuhn et al. 2011).

Because of the abundance of anisakids in commercially important fishes and its implication for human health, an enormous number of host records of *Anisakis* has accumulated in the literature, however, often resulting only from morphological identification. Klimpel and Palm (2011) suggested that not all *Anisakis* species are dangerous to humans, and thus a closer look to the real host range of the different species is necessary. So far, no comprehensive overview has illustrated the host and distribution patterns of *Anisakis* spp., making it difficult to uncover the life cycle ecology and zoogeographical distribution patterns.

The present study summarizes a large sample size of *Anisakis* individuals from different teleost intermediate hosts, geographical regions and climate zones, using direct sequencing of the ITS molecular marker. The obtained data set is combined with already existing parasite-host records based on molecular identification, demonstrating the different hosts and zoogeographical distribution patterns for the species. Implications for the life cycles of nine different *Anisakis* species are discussed.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection

A total of 330 *Anisakis* third-stage larvae were isolated from 26 teleost species from 21 localities around the world (Table 1; in part Kuhn et al. 2011). Specimens were extensively washed in 0.9% saline solution and identified morphologically to the genus level according to Anderson (2000). All samples were preserved in EtOH (100%) prior to molecular examination.

Molecular analysis

Genomic DNA was isolated and purified from individual larvae using a genomic DNA extraction kit (Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen) according to the instructions of the manufacturer. The rDNA region comprising the ITS-1, 5.8S, ITS-2 and flanking sequences (= ITS+) was amplified using the primers NC2 (5'-TTA-GTT-TCT-TTT-CCT-CCG-CT-3') and TK1 (5'-GGC-AAA-AGT-CGT-AAC-AAG-GT-3') (Zhu et al. 2000, Kuhn et al. 2011). PCR-reaction (50 µl) included 25 µl Master-Mix (Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen) containing dNTP, MgCl₂ Buffer and Taq-Polymerase, 3 µl of each primer (10 pmol/µl), 14 ddH₂O and 5 µl genomic DNA extract.

PCR reactions were performed in an Advanced Primus 96 thermocycler (Peqlab) under the following conditions: initial denaturation at 95 °C for 1 min; 40 cycles of 94 °C for 45 sec (denaturation), 55 °C for 45 sec (annealing), 72 °C for 45 sec (extension); final extension at 72 °C for 10 min. Negative controls (reactions without DNA) were included in each PCR run. PCR products were examined on 1% agarose gels and purified with Cycle-Pure Kit (Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen) and a total volume of 7 µl, including 2 µl primer (100 pmol/µl) and 5 µl of the PCR product (250 ng/µl) was sequenced by Seqlab (Goettingen GmbH). Both spacers and the 5.8S gene from each PCR product were sequenced using the primer TK1.

Sequence analyses

For sequence analyses, electropherograms were checked manually and sequences were aligned using CLUSTALX (v.2.0.1.0) (Larkin et al. 2007) to visualize genetic polymorphisms. For species identification, sequence data of each reaction were compared with previously published data in GenBank by using the BLASTn algorithm (Altschul et al. 1990).

RESULTS AND DISCUSSION

The ITS ribosomal DNA (rDNA) sequence data of 330 larvae of *Anisakis* spp. from 26 different bony fishes and 21 localities revealed the presence of five out of nine currently recognized *Anisakis* species, namely *A. simplex* s.s., *A. pegreffii*, *A. simplex* C, *A. typica*, *A. physeteris*, and two genotypes (*Anisakis* sp. SAN2004, *Ani-*

Table 1. Information on the nematodes identified by ITS sequence analyses. Sampling localities, host and *Anisakis* species are provided for 330 nematodes.

Sample location	Host									Total	Accession-No.
		Asimss	Apeg	AsimC	Atyp	Aphy	AspHC05	Asp-SAN04	Aindet		
Alaska (Bay Nushagak)	<i>Oncorhynchus keta</i>	12	-	-	-	-	-	-	-	12	JN968655–JN968666
	<i>Oncorhynchus nerka</i>	11	-	-	-	-	-	-	-	11	JN968667–JN968677
Alaska (Cordova)	<i>Oncorhynchus keta</i>	12	-	-	-	-	-	-	-	12	JN968678–JN968689
	<i>Oncorhynchus nerka</i>	12	-	-	-	-	-	-	-	12	JN968690–JN968701
Antarctic (South Shetland Islands)	<i>Gymnoscopelus nicholsi</i>	-	-	14	-	-	-	-	-	14	JN968638–JN968651
Baltic Sea (Kattegat)	<i>Scomber scombrus</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	JN968759
	<i>Clupea harengus</i>	11	1	-	-	-	-	-	-	12	JN968748–JN968759
Baltic Sea (off Kiel)	<i>Clupea harengus</i>	9	-	-	-	-	-	-	-	9	JN968760–JN968768
Baltic Sea (off Rügen)	<i>Clupea harengus</i>	-	-	-	-	-	-	-	1	1	KC121366
Barents Sea (Bellsund Banks)	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	13	-	-	-	-	-	-	-	13	JN968770–JN968782
	<i>Micromesistius poutassou</i>	11	-	-	-	-	-	-	1	12	JN968783–JN968793; KC121367
Barents Sea (Björnöya)	<i>Gadus morhua</i>	2	-	-	-	-	-	-	-	2	JN968794–JN968795
Barents Sea (Forland Banks)	<i>Micromesistius poutassou</i>	9	-	-	-	-	-	-	-	9	JN968796–JN968804
Barents Sea (Sjubre Banks)	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	12	-	-	-	-	-	-	-	12	JN968805–JN968816
China	<i>Scomberomorus niphonius</i>	-	3	-	-	-	-	-	-	3	JN968607–JN968609
	<i>Cleisthenes herzensteini</i>	-	7	-	-	-	-	-	-	7	JN968594–JN968600
	<i>Gadus macrocephalus</i>	-	6	-	-	-	-	-	-	6	JN968601–JN968606
	<i>Trichiurus lepturus</i>	-	11	-	-	-	-	-	-	11	JN968610–JN968620
Hawaii	<i>Cololabis saira</i>	5	-	-	-	-	-	-	-	5	JN968817–JN968821
	<i>Selar crumenoptalmus</i>	-	-	-	6	-	-	-	-	6	JN968907–JN968912
	<i>Katsuwonus pelamis</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	1	JN968906
Indonesia	<i>Trichiurus lepturus</i>	-	-	-	26	-	-	-	-	26	JN968936–JN968961
	<i>Auxis thazard thazard</i>	-	-	-	5	-	-	-	-	5	JN968927–JN968931
	<i>Auxis rochei rochei</i>	-	-	-	14	-	-	-	-	14	JN968913–JN968926
	<i>Lepturacanthus savala</i>	-	-	-	2	-	1	-	-	3	JN968934; JN968935; KC121379
	<i>Caesio cuning</i>	-	-	-	2	-	-	-	-	2	JN968932, JN968933
Italy (Ionian Sea)	<i>Merluccius merluccius</i>	-	10	-	-	-	-	-	-	10	JN968621–JN968630
Italy (Tyrrhenian Sea)	<i>Scomber japonicus</i>	-	3	-	-	-	-	-	-	3	JN968631–JN968633
Madeira	<i>Aphanopus carbo</i>	16	-	-	-	-	-	-	-	16	JN968822–JN968837
Namibia	<i>Synaphobranchus kaupii</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	1	JN968637
Moorea	<i>Katsuwonus pelamis</i>	-	-	-	3	-	-	-	-	3	JN968962–JN968964
	<i>Selar crumenoptalmus</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	1	JN968965
North Sea (off Scheveningen)	<i>Trachurus trachurus</i>	8	-	-	-	-	-	-	-	8	JN968898–JN968905
	<i>Scomber scombrus</i>	20	-	-	-	-	-	-	-	20	JN968878–JN968897
North Sea (off German Coast)	<i>Clupea harengus</i>	40	-	-	-	-	-	-	2	42	JN968838–JN968877; KC121368; KC121369
Santa Barbara	<i>Anoplopoma fimbria</i>	1	-	2	-	-	-	-	-	3	JN968769; JN968652; JN968653
	<i>Sebastolobus alascanus</i>	-	-	1	-	-	-	1	-	2	JN968654; KC121371
	Total	205	41	17	60	1	1	1	4	330	

Asimss – *Anisakis simplex* s.s.; Apeg – *A. pegreffii*; AsimC – *A. simplex* C; Atyp – *A. typica*; AspHC05 – *Anisakis* sp. HC2005; AspSAN04 – *Anisakis* sp. SAN 2004; Aindet – *Anisakis* indetermined.

sakis sp. HC2005) previously recorded by Nadler et al. (2005) and Kijewska et al. (2009), respectively (Table 1). Findings of *A. simplex* s.s. and *A. pegreffii* in *Anoplopoma fimbria* (Pallas) from Santa Barbara, *A. typica* in *Caesio cuning* (Bloch), *Lepturacanthus savala* (Cuvier) and *Katsuwonus pelamis* (Linnaeus) from Indonesia and Moorea, *A. simplex* s.s. in *Cololabis saira* (Brevoort) from Hawaii, *A. simplex* C in *Sebastolobus alascanus* Bean from Santa Barbara as well as *A. physeteris* in *Synaphobranchus kaupii* Johnson from Namibia represent new host records (Table 1).

Most abundant was *A. simplex* s.s. with a total of 205 records, followed by *A. typica* (60), *A. pegreffii* (41), *A. simplex* C (17) and *A. physeteris* (1) (Table 1). In addition, four sequences that cannot be unambiguously classified by sequence analyses were identified (*Anisakis* indet_NSG_Char_39.5 and *Anisakis* indet_NSG_Char_40.8 in *Clupea harengus* from Scheveningen, North Sea, *Anisakis* indet_BalRu_Char_121.1 in *C. harengus* from off Rügen, Baltic Sea and *Anisakis* indet_BSBB_Mpou_79_8 in *Micromesistius poutassou* [Risso] from Belsund Bank, Barents Sea). BLAST analysis revealed the same score

(E-value = 0.00) and 99.0% identity to several different sequences, *A. simplex* s.s., *A. pegreffii* and *A. simplex* C, respectively (Table 1).

The sequence Aindet_BalRu_Char_121.1 was heterozygote at positions 281 and 296 of the aligned sequences. These positions are known as diagnostic sites of the ITS marker between the sister species *A. simplex* s.s. and *A. pegreffii*. Abollo et al. (2003) identified hybrids between both species in a sympatric area along the Galician coast of Spain (Atlantic Ocean). The authors eliminated the regular polymorphisms as well as incomplete concerted evolution within a multicopy gene as possible reasons and cited the exchange of genetic material between both species as the most likely cause for such hybridization events. Despite limited sample size, this is further corroborated by the fact that both presumably admixed genotypes were encountered in populations where both pure species occur.

It is not known whether hybridization in *Anisakis* enables adaptation to particular environmental conditions or whether it is a consequence of incomplete barriers to hybrid mating, but it could reflect the radiation within the genus *Anisakis*. However, since DNA turnover mechanisms, including slippage during DNA replication, gene conversion, unequal crossing-over or transposition events or simply intraspecific variations cannot be excluded as cause for the polymorphisms, the hybrid hypothesis within the genus *Anisakis* needs to be rigorously tested and critically evaluated by analyzing natural populations and large sample sizes, and more genomic loci (Hailer et al. 2012).

The obtained sequence data were combined with the host records from 60 previous molecular studies to evaluate the role of the teleost intermediate and paratenic hosts in the life cycle of these parasites. A total of 155 teleost fish species from 71 families and 19 orders have been reported in the literature (Table 2). Perciform (57 species) and gadiform (21) fishes were the most frequently infected orders, followed by pleuronectiforms (15) and scorpaeniforms (15). The Scombridae (12), Gadidae (10), Carangidae (8), Clupeidae (7), Pleuronectidae (6) and Salmonidae (5) were the most frequently represented families, with *Merluccius merluccius* alone harbouring eight different *Anisakis* species (Table 2).

The vast majority are food fishes of high commercial interest, reflecting the extensive scientific effort that has dealt with the role of *Anisakis* as causative agent of the food-borne parasitic zoonosis called anisakiasis. *Anisakis* is usually associated with the traditions of consuming raw or insufficiently cooked fish (e.g. salted herring, sushi, sashimi) and the increasingly popular habit not to overcook food (Audicana and Kennedy 2008).

The fish hosts recorded were classified into three habitats (pelagic, benthopelagic, demersal), according to the definitions provided by Froese and Pauly (2012). Pelagic

fish species live and feed in the open sea and are usually associated with the surface or the middle depths of a water body. Benthopelagic fishes are living near the bottom as well as in midwaters, where they feed on benthic and/or free swimming organisms. In contrast, demersal fishes live and feed on or near to the sea floor (Froese and Pauly 2012). Our data demonstrate that 71 of the 155 reported hosts live in pelagic and benthopelagic environments.

Nearly the same number (72) is demersal and another 12 are known to be reef-associated (Froese and Pauly 2012) (Fig. 1). Although the majority of fishes have been classified demersal, many of them are known to extend their feeding range into the benthopelagic and feed on both benthic and (benthopelagic) organisms (e.g. species of *Merluccius*, *Gadus* Linnaeus, *Pollachius* Nilsson, *Hippoglossus* Cuvier and *Conger* Bosc). Taking into account the large number of hosts of each species that live in pelagic, demersal and benthopelagic habitats, it becomes apparent that the life cycle of *Anisakis* includes food chains throughout the water column with a bias towards (benthopelagic) environments (see also Fig. 1).

Anisakis pegreffii (101 records) was the most frequently reported species in the literature, followed by *A. simplex* s.s. (63) (Table 2). This is very likely due to the fact that the former species is widely distributed in western Pacific waters around Japan, where most food-borne diseases like anisakiasis occur (e.g. Klimpel and Palm 2011, Kuhn et al 2011). However, there was no consensus whether *A. pegreffii* and *A. simplex* s.s. complete life cycles mainly in pelagic or in benthic habitats (e.g. Mattiucci et al. 1997, Abollo et al. 2001, Mattiucci and Nascetti 2008). Abollo et al. (2001) demonstrated that 80% of the fish hosts of *A. simplex* s.s. are nektobenthic or demersal, whereas no infection with *A. pegreffii* was found in large pelagic cephalopods. Our data demonstrate that both parasite species as well as *A. simplex* C have similar proportions of fish hosts that live in pelagic, benthopelagic and demersal habitats suggesting similar life cycle strategies (Fig. 1).

These data are congruent with the so far known spectrum of definitive hosts reported for these species. The very closely related *A. simplex* s.s., *A. pegreffii* and *A. simplex* C mature mainly in oceanic dolphins, which are known to feed offshore on large pelagic and benthopelagic fishes (Højgaard 1998, Jefferson et al. 2008, Klimpel et al. 2011, Kuhn et al. 2011). This would suggest a mainly (benthopelagic) life cycle for these species. According to Klimpel et al. (2004, 2007), it seems that at least *A. simplex* s.s. can perform a pelagic life cycle in the Norwegian Deep off the continental shelf.

With 26 records of *A. typica*, 16 of *A. physeteris*, 7 of *A. ziphidarum*, 6 of *A. nascettii* and *A. paggiae* and 5 of *A. brevispiculata*, respectively, these species were far less frequently reported from fish intermediate hosts. However, considering the feeding behaviour of the reported cetacean definitive hosts, e.g. *Ziphius cavirostris* Cuvier, *Phy-*

Table 2. Teleost intermediate/paratenic hosts for *Anisakis* spp. so far detected by molecular analyses. Order, family, host, habitat, ocean and references are given for each *Anisakis* species.

Order	Family	Host species	Habitat	Asimss	Apeg	AsimC	Atyp	Anas	Azip	Aphy	Apag	Abre	Reference		
Anguilliformes	Congridae	<i>Conger conger</i>	D	EA	CM, EA, YS								2, 32, 33		
		<i>Conger myriaster</i>	D		CM, YS								9, 32, 59, 60		
	Muraenesocidae	<i>Muraenesox cinereus</i>	D		YS								9, 32		
	Muraenidae	<i>Muraena helena</i>	Ra		CM, EA								12		
Aulopiformes	Synbranchiidae	<i>Synbranchichthys kaupii</i>	D						SEA				25		
	Synodontidae	<i>Saurida elongata</i>	D		YS								9		
Beloniformes	Belonidae	<i>Belone belone</i>	P	BS, EA	EA								2, 30, 32, 55		
		<i>Cheilopogon agoo</i>	P		YS								9		
	Scomberesocidae	<i>Cololabis</i> sp.	P	CP									25		
		<i>Scomberesox saurus saurus</i>	P	NWA, WA									30, 32, 33		
Beryciformes	Anoplogastridae	<i>Anoplogaster cornuta</i>	P								NA		24		
	Berycidae	<i>Beryx splendens</i>	Bp						WP	WP	WP		42		
	Trachichthyidae	<i>Hoplostethus atlanticus</i>	Bp			IO/SP							30, 33		
		<i>Hoplostethus cadenati</i>	Bp				EA		EA	EA		EA	17		
Clupeiformes	Clupeidae	<i>Clupea harengus</i>	Bp	BS, EP, NEA, NEP, NS	BS								8, 17, 25, 30, 31, 32, 33, 45, 55, 60		
		<i>Clupea pallasii pallasii</i>	P		YS								9, 59		
		<i>Etrumeus whiteheadi</i>	P		SA								30, 32, 33		
		<i>Konosirus punctatus</i>	P		YS								9		
		<i>Sardina pilchardus</i>	P		CM, EM								6, 41		
		<i>Sardinella zunasi</i>	P		YS								9		
		<i>Sardinops sagax</i>	P	EP	EP	EP							4		
		Engraulidae	<i>Engraulis encrasicolus</i>	P		CM, WM								6, 30, 32, 33, 41	
			<i>Engraulis japonicus</i>	P		YS								9	
		Gadiformes	Gadidae	<i>Boreogadus saida</i>	D	NA, EA									10, 30, 32, 33
				<i>Gadus macrocephalus</i>	D		WP, YS								9, 25, 49, 52
				<i>Gadus morhua</i>	Bp	BS, EA, NA, NEA, NWA									17, 25, 30, 32, 45, 55
				<i>Gadus ogac</i>	D	NEA									17
	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>			D	BS, NEA									25, 55	
<i>Merlangius merlangus</i>	Bp			NS									45		
<i>Micromesistius poutassou</i>	Bp			EA, NEA, NS, WM, WP	CM, EA, EM, WM					CM			2, 3, 6, 12, 25, 30, 32, 41, 44, 45		
<i>Pollachius virens</i>	D			BS, NS										45, 55	
<i>Theragra chalcogramma</i>	Bp			EP, NEA, NWA	WP							WP		30, 32, 33, 45, 49, 50, 52, 55, 57	
Lotidae	<i>Trisopterus luscus</i>			Bp	EA										2, 30, 32
	<i>Brosme brosme</i>		D	EA, NEA	N/A									30, 31, 32, 33	
Macrouridae	<i>Molva dipterygia</i>	D	EA										2, 30, 32		
	<i>Macrourus berglax</i>	Bp	NA, NWA										16, 19		
Merlucciidae	<i>Trachyrincus scabriscus</i>	D		EA					EA				17		
	<i>Merluccius capensis</i>	D		SA, SEA									30, 31, 32, 33		

(continued)

Table 2. Continued.

Order	Family	Host species	Habitat	Asimss	Apeg	AsimC	Atyp	Anas	Azip	Aphy	Apag	Abre	Reference
		<i>Merluccius hubbsi</i>	Bp		SWA								30, 31, 32, 33
		<i>Merluccius merluccius</i>	D	BS, EA, EM, NEA, SM, WM	CM, EA, EM, NEA, SM, WM		CM, EA, EM, WM	EA	EA, EM	CM, EA, SM, WM	NEA	EA, EM, SM	2, 6, 11, 12, 25, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 41, 45, 55
		<i>Merluccius polli</i>	D		EA		EA	EA		EA			17
	Moridae	<i>Pseudophycis bachus</i>	D		SP	SP							30, 31, 32, 33
	Phycidae	<i>Phycis blennoides</i>	Bp		CM					CM			12, 32
		<i>Phycis phycis</i>	Bp		CM, EA		CM, EA			CM, EA			12, 32
Lophiiformes	Lophiidae	<i>Lophius litulon</i>	D		YS								9
		<i>Lophius piscatorius</i>	D	BS, EA	CM, EA, SM								59
		<i>Lophius vomerinus</i>	D		SA								30, 32, 33
Mugiliformes	Mugilidae	<i>Mugil cephalus</i>	Bp		YS								59
Myctophiformes	Myctophidae	<i>Electrona carlsbergi</i>	P			SA							32
		<i>Gymnoscopelus nicholsi</i>	P		SA	SA							22, 25
		<i>Myctophum punctatum</i>	P	CA	CA								21, 23
		<i>Notoscopelus kroyeri</i>	P	CA									21
Ophidiiformes	Ophidiidae	<i>Genypterus capensis</i>	D		SA								30, 32, 33
Osmeriformes	Argentinidae	<i>Argentina silus</i>	D	NA									19
	Bathylagidae	<i>Bathylagus euryops</i>	P	NA									19, 30, 32
	Osmeridae	<i>Hypomesus japonicus</i>	D	WP									32, 57
Perciformes	Bramidae	<i>Brama brama</i>	P		SA								30, 32, 33
	Caesionidae	<i>Caesio cunning</i>	Ra				WP						25
	Carangidae	<i>Decapterus maruadsi</i>	Ra		YS								9
		<i>Selar crumenophthalmus</i>	Ra				CP, WP						25, 32, 60
		<i>Seriola dumerili</i>	Ra		WP								49
		<i>Seriola lalandi</i>	Bp		YS								9
		<i>Trachurus capensis</i>	P		SA								30, 32, 33
		<i>Trachurus mediterraneus</i>	P	EA	CM, EA								11, 30, 32, 33, 41
		<i>Trachurus picturatus</i>	Bp	EA	EA		EA						30, 32, 33, 35, 41, 48
		<i>Trachurus trachurus</i>	P	EA, EM, CM, NEA, NS, WM	CM, EA, EM, NEA, SWP, WM		EA, EM	EA		CM	EA		2, 3, 6, 11, 17, 25, 27, 30, 31, 32, 33, 38, 39, 41, 44, 45
	Centracanthidae	<i>Spicara smaris</i>	D		EM								6
	Coryphaenidae	<i>Coryphaena hippurus</i>	P		YS		IO, WP						9, 32, 35, 47, 59
	Emmelichthyidae	<i>Emmelichthys nitidus nitidus</i>	D		SA								30, 32, 33
	Gempylidae	<i>Thyrsites atun</i>	Bp		SA, SEA	SA, SEA							30, 31, 32, 33
	Lateolabracidae	<i>Lateolabrax japonicus</i>	Ra		YS								9
	Lutjanidae	<i>Lutjanus erythropterus</i>	Ra		YS								9
	Moronidae	<i>Dicentrarchus labrax</i>	D	NEA									5
	Mullidae	<i>Mullus barbatus barbatus</i>	D	EM									6
		<i>Mullus surmuletus</i>	D		CM								41
	Nemipteridae	<i>Nemipterus bathybius</i>	D				WP						32, 60
		<i>Nemipterus virgatus</i>	D				WP						32, 60
	Nototheniidae	<i>Notothenia coriiceps</i>	D			SEA							9
		<i>Notothenia rossii</i>	D			SEA							9
	Pholidae	<i>Pholis nebulosa</i>	D		YS								9
	Pinguipedidae	<i>Parapercis colias</i>	D		SP	SP							30, 31, 32, 33

(continued)

Table 2. Continued.

Order	Family	Host species	Habitat	Asimss	Apeg	AsimC	Atyp	Anas	Azip	Aphy	Apag	Abre	Reference	
	Rachycentridae	<i>Rachycentron canadum</i>	Ra		YS								9	
	Sciaenidae	<i>Collichthys niveatus</i>	D		YS								9	
		<i>Larimichthys polyactis</i>	Bp		YS								9	
		<i>Nibea albiflora</i>	Bp		YS								9	
		<i>Pennahia argentata</i>	Bp		YS								9	
	Scombridae	<i>Auxis rochei rochei</i>	P				WP						25, 47	
		<i>Auxis thazard thazard</i>	P		YS		WA, WP, YS			WA			9, 14, 25, 35	
		<i>Euthynnus affinis</i>	P				IO						35	
		<i>Euthynnus alletteratus</i>	Ra	EA	EA								11, 30, 32, 33, 41	
		<i>Katsuwonus pelamis</i>	P				CP						25	
		<i>Scomber australasicus</i>	P	WP	WP		WP						7, 49, 52	
		<i>Scomber colias</i>	P		EM								6, 33	
		<i>Scomber japonicus</i>	P	EA, WM, WP	CM, EA, WM, WP, YS		EA, IO	EA	EA	EA	EA, WM		1, 3, 9, 11, 12, 17, 25, 26, 30, 32, 45, 48, 49, 56, 57, 58, 59	
		<i>Scomber scombrus</i>	P	BS, EA, EM, CM, NEA, NS, WM	BS, CM, EA, EM, NEA, WM		CM, EA	EA	EA	EA	CM, EA		2, 3, 6, 11, 12, 25, 30, 32, 33, 41, 45, 55	
		<i>Scomberomorus commerson</i>	P				IO						35	
		<i>Scomberomorus niphonius</i>	P		YS								9, 25, 49, 59	
		<i>Thunnus thynnus</i>	P	WP	CM, WA		WA						12, 30, 31, 32, 33, 35	
		Sillaginidae	<i>Sillago sihama</i>	Ra		YS								9
		Sparidae	<i>Boops boops</i>	D		CM								45
	<i>Diplodus annularis</i>		Bp		EM								6	
	<i>Pagellus bogaraveo</i>		Bp	EA	EA		EA		EA	EA			13	
	<i>Spondylisoma cantharus</i>		Bp	EA									2, 30	
	Stromateidae	<i>Pampus argenteus</i>	P		YS								9	
	Trachinidae	<i>Aphanopus carbo</i>	Bp	EA	EA			EA	EA	EA	EA		25, 37, 40, 48	
		<i>Echiichthys vipera</i>	D		CM								12	
		<i>Lepidopus caudatus</i>	Bp		CM, SEA								30, 31, 32, 33, 45	
		<i>Lepturacanthus savala</i>	Bp				WP						25	
		<i>Trachinus draco</i>	D		CM								12	
		<i>Trichiurus lepturus</i>	Bp	WP	CM, WP, YS		WP						9, 12, 25, 26, 54	
		Trichodontidae	<i>Arctoscopus japonicus</i>	D		WP								52
		Xiphiidae	<i>Xiphias gladius</i>	P	CM	CM, EA		EA		CM, EA, WM	CM, WM	CA	CA, EA	30, 32, 33
Pleuronecti- formes	Zoarceidae	<i>Zoarces elongatus</i>	D		YS								9	
	Bothidae	<i>Arnoglossus imperialis</i>	D	EA	EA								28, 29, 32	
	Citharidae	<i>Citharus linguatula</i>	D	EA, NEA	EA, NEA								28, 29, 32	
	Paralichthyidae	<i>Paralichthys olivaceus</i>	D	EXP	EXP								51	
	Pleuronectidae	<i>Cleisthenes herzensteini</i>	D		YS									9, 25
		<i>Hippoglossoides dubius</i>	D		WP									52
		<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	D	BE										30, 32
		<i>Platichthys flesus</i>	D				EA							28, 29, 32
		<i>Pseudopleuronectes yokohamae</i>	D		YS									9

(continued)

Table 2. Continued.

Order	Family	Host species	Habitat	Asimss	Apeg	AsimC	Atyp	Anas	Azip	Aphy	Apag	Abre	Reference	
Salmoniformes	Scophthalmidae	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	Bp	NEA, NWA									17, 32, 33	
		<i>Lepidorhombus boscii</i>	D	EA	EA								2, 28, 29, 30, 32	
		<i>Lepidorhombus whiffiagonis</i>	D	EA										29
	Soleidae	<i>Zeugopterus regius</i>	D	EA										29
		<i>Dicologlossa cuneata</i>	D	EA	EA									28, 29
		<i>Solea senegalensis</i>	D	EA										28, 29
		<i>Synapturichthys kleinii</i>	D	EA										28
	Salmonidae	<i>Oncorhynchus gorboscha</i>	D	NEP, NP										12, 30, 32
		<i>Oncorhynchus keta</i>	Bp	NEP, WP										15, 25, 30, 32, 49
		<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Bp	EXP	EXP									51
<i>Oncorhynchus nerka</i>		Bp	NEP										15, 17, 25	
<i>Salmo salar</i>		Bp	NEA, NS, NWA, WA										30, 31, 32, 33, 43, 45, 46	
Scorpaeniformes	Anoplopomatidae	<i>Anoplopoma fimbria</i>	D	EP		EP							25	
		Hexagrammidae	<i>Hexagrammos agrammus</i>	D			YS							9
	<i>Hexagrammos otakii</i>		D			YS							9	
	<i>Pleurogrammus azonus</i>		D	NEA, WP										32, 57, 58
	Platycephalidae	<i>Pleurogrammus monopterygius</i>	D	BE										17
		<i>Cociella crocodilus</i>	Ra			YS								9
	Scorpaenidae	<i>Platycephalus richardsoni</i>	D			IO/SP								53
		<i>Hoplosebastes armatus</i>	D			YS								9
	Sebastidae	<i>Scorpaena scrofa</i>	D	EA	EA									2, 30, 32
		<i>Helicolenus dactylopterus</i>	D		CM, SEA									30, 33
Synanceiidae	<i>Sebastiscus marmoratus</i>	D			YS								59	
	<i>Sebastolobus alascanus</i>	D				EP							25	
	<i>Inimicus japonicus</i>	D			YS								9	
	Triglidae	<i>Chelidonichthys kumu</i>	D			YS		YS						9
<i>Eutrigla gurnardus</i>		D	EA										2	
Stomiiformes	Sternoptychidae	<i>Maurollicus muelleri</i>	P	CA, NEA									18, 20	
		<i>Borostomias antarcticus</i>	D	NA										19
Tetraodontiformes	Monacanthidae	<i>Thamnaconus modestus</i>	Ra				YS						9	
		<i>Takifugu niphobles</i>	D				YS							9
Zeiformes	Zeidae	<i>Takifugu poecilonotus</i>	D				WP						52	
		<i>Zeus faber</i>	Bp			CM, YS							9, 41	

Asimss – *A. simplex* s.s.; Apeg – *A. pegreffii*; AsimC – *A. simplex* C; Atyp – *A. typica*; Anas – *A. nascettii*; Azip – *A. ziphidarum*; Aphy – *A. physeteris*; Apag – *A. paggiae*; Abre – *A. brevispiculata*. Bp – benthopelagic; D – demersal; P – pelagic; Ra – reef-associated. BE – Bering Sea; BS – Baltic Sea; CA – Central Atlantic; CM – Central Mediterranean Sea; CP – Central Pacific; EA – East Atlantic; EM – East Mediterranean Sea; EP – East Pacific; EXP – experimental infection; IO – Indian Ocean; NA – North Atlantic; N/A – Not Available; NEA – North East Atlantic; NEP – North East Pacific; NP – North Pacific; NS – North Sea; NWA – North West Atlantic; SA – South Atlantic; SEA – South East Atlantic; SM – South Mediterranean Sea; SP – South Pacific; SWA – South West Atlantic; SWP – South West Pacific; WA – West Atlantic; WM – West Mediterranean Sea; WP – West Pacific; YS – Yellow Sea. 1 – Abattouy et al. 2011; 2 – Abollo et al. 2001; 3 – Abollo et al. 2003; 4 – Baldwin et al. 2011; 5 – Bernadi et al. 2011; 6 – Chaligiannis et al. 2012; 7 – Chou et al. 2011; 8 – Cross et al. 2007; 9 – Du et al. 2010; 10 – Dzido et al. 2009; 11 – Farjallah et al. 2008a; 12 – Farjallah et al. 2008b; 13 – Hermida et al. 2012; 14 – Iñiguez et al. 2009; 15 – Karl et al. 2011; 16 – Kellermanns et al. 2007; 17 – Kijewska et al. 2009; 18 – Klimpel et al. 2004; 19 – Klimpel et al. 2006; 20 – Klimpel et al. 2007; 21 – Klimpel et al. 2008; 22 – Klimpel et al. 2010a; 23 – Klimpel et al. 2010b; 24 – Klimpel et al. 2011; 25 – Kuhn et al. 2011; 26 – Lee et al. 2009; 27 – MacKenzie et al. 2002; 28 – Marques et al. 2006; 29 – Marques et al. 2009; 30 – Mattiucci and Nascetti 2006; 31 – Mattiucci and Nascetti 2007; 32 – Mattiucci and Nascetti 2008; 33 – Mattiucci et al. 1997; 34 – Mattiucci et al. 2001; 35 – Mattiucci et al. 2002; 36 – Mattiucci et al. 2004; 37 – Mattiucci et al. 2005; 38 – Mattiucci et al. 2007; 39 – Mattiucci et al. 2008; 40 – Mattiucci et al. 2009; 41 – Meloni et al. 2011; 42 – Murata et al. 2011; 43 – Murphy et al. 2010; 44 – Nadler et al. 2005; 45 – Nascetti et al. 1986; 46 – Noguera et al. 2009; 47 – Palm et al. 2008; 48 – Pontes et al. 2005; 49 – Quiazon et al. 2008; 50 – Quiazon et al. 2009; 51 – Quiazon et al. 2011a; 52 – Quiazon et al. 2011b; 53 – Shamsi et al. 2011; 54 – Shih 2004; 55 – Skov et al. 2010; 56 – Suzuki et al. 2010; 57 – Umehara et al. 2006; 58 – Umehara et al. 2008; 59 – Zhang et al. 2007; 60 – Zhu et al. 2007.

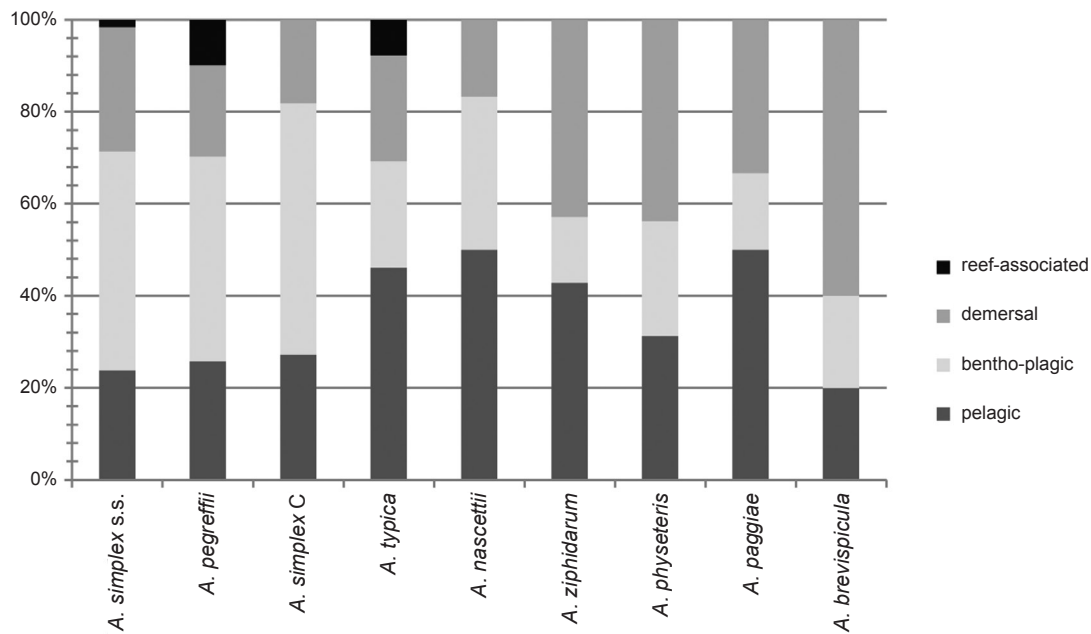


Fig. 1. Proportions of *Anisakis* teleost fish hosts in demersal, benthopelagic, pelagic and reef-associated habitats.

seter macrocephalus Linnaeus, *Mesoplodon grayi* von Haast, *Kogia breviceps* (Blainville) and *K. sima* (Owen), which are known to feed especially in the pelagic realm, the life cycle of these nematodes has to shift at some point from (benthopelagic) habitats into the free water column (Table 2, Fig. 1). Palm et al. (2008) recorded 21 mainly pelagic or reef associated fish species as intermediate hosts for *Anisakis* spp., four of them for *A. typica* and two closely related genotypes. Klimpel et al. (2011) identified *A. paggiae* in the common fangtooth *Anoplogaster cornuta* (Valenciennes) in the Irminger Sea and extended the distribution range of their definitive hosts (*Kogia breviceps* and *K. sima*) reported so far.

Mesopelagic fishes such as *A. cornuta* transfer parasites into larger paratenic hosts (e.g. *Xiphias gladius* Linnaeus) and may therefore play a crucial role within the life cycle of this anisakid nematode. Furthermore, the authors suggested similar life cycles for *A. paggiae* and the other species of the *A. physeteris* species complex (*A. brevispiculata*, *A. physeteris*) as well as for both sister species *A. nascettii* and *A. ziphidarum* in meso/bathypelagic waters, in accordance with the most common feeding ecology and depth range of their reported intermediate fish and definitive hosts (Klumpel et al. 2011). The latter four *Anisakis* species mainly use the same (meso-)pelagic, piscivorous fish species such as *Aphanopus carbo* Lowe, *Beryx splendens* Lowe, *Hoplostethus cadenati* Quéro, *Merluccius merluccius* and *M. polli* (Cadenat) as well as *Pagellus bogaraveo* (Brünnich) in their life cycles (Table 2).

Our data confirm that *Anisakis* species are less host-specific regarding the intermediate teleost hosts. Busch

et al. (2012) demonstrated that *Anisakis* larvae can be found in crustaceans from pelagic, benthopelagic and benthic habitats. Euphausiids are considered important crustacean hosts that transmit larvae directly to baleen whales, which feed on them extensively (Marcogliese 1995). By utilizing intermediate hosts from different trophic levels and habitats within the marine food webs, *Anisakis* larvae are abundant in virtually every depth horizon, in both the pelagic and benthic zone. However, taking into account the distribution, habitats and feeding behavior of toothed- and baleen whales, transmission to their respective definitive hosts has to be associated with the free water column.

Acknowledgments. We thank Simonetta Mattiucci (Department of Health Sciences, Rome), Armand Kuris (University of California, Santa Barbara), Greta Smith Aeby (Hawai'i Institute of Marine Biology) and Horst Karl (Max Rubner Institute, Hamburg) for providing parasite material from the Ionian and Tyrrhenian Sea, Hawaii, California and Alaska, respectively. Material collection from Indonesian waters was done within the framework of the joint Indonesian-German research programme SPICE I (Science for the Protection of Indonesian Coastal Marine Ecosystems, BMBF Grant No. 03F0391A) and under cooperation with I Made Damriyasa, Faculty of Veterinary Medicine, UDAYANA University, Bali (H.W. Palm). We thank Christian Kuhn for programming shell scripts. This study was financially supported by the research funding programme 'LOEWE – Landes-Offensive zur Entwicklung Wissenschaftlich-ökonomischer Exzellenz' of Hesse's Ministry of Higher Education, Research and the Arts, and the German Research Council (DFG KL 2087/1-1, 1-2, DFG PA 664/4-1, 6-1).

REFERENCES

- ABATTOUY N., VALERO A., BENAJIBA M.H., LOZANO J., MARTÍN-SÁNCHEZ J. 2011: *Anisakis simplex* s.l. parasitism in mackerel (*Scomber japonicus*) caught in the north of Morocco – prevalence and analysis of risk factors. *Int. J. Food Microbiol.* 150: 136–139.
- ABOLLO E., GESTAL C., PASCUAL S. 2001: *Anisakis* infestation in marine fish and cephalopods from Galician waters: an updated perspective. *Parasitol. Res.* 87: 492–499.
- ABOLLO E., PAGGI L., PASCUAL S., D'AMELIO S. 2003: Occurrence of recombinant genotypes of *Anisakis simplex* s.s. and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in an area of sympatry. *Infect. Genet. Evol.* 3: 175–181.
- ALTSCHUL S.F., GISH W., MYERS W.M.E.W., LIPMANN D.J. 1990: Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403–410.
- ANDERSON R.C. 2000: *Nematode Parasites of Vertebrates. Their Development and Transmission.* CABI, Wallingford, 650 pp.
- ANDERSON T.J.C., BLOUIN M.S., BEECH R.N. 1998: Population biology of parasitic nematodes: applications of genetic markers. *Adv. Parasitol.* 41: 219–283.
- AUDICANA M.T., KENNEDY M.W. 2008: *Anisakis simplex*: from obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity. *Clin. Microbiol. Rev.* 21: 360–379.
- BALDWIN R.E., BANKS M.A., JACOBSON K.C. 2011: Integrating fish and parasite data as a holistic solution for identifying the elusive stock structure of Pacific sardines (*Sardinops sagax*). *Rev. Fish Biol. Fish.* 22: 137–156.
- BERNADI C., GUSTINELLI A., FIORAVANTI M.L., CAFFARA M., MATTIUCCI S., CATTANEO P. 2011: Prevalence and mean intensity of *Anisakis simplex* (sensu stricto) in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) from Northeast Atlantic Ocean. *Int. J. Food Microbiol.* 148: 55–59.
- BUSCH M.W., KUHN T., MÜNSTER J., KLIMPEL S. 2012: Marine crustaceans as potential hosts and vectors for metazoan parasites. In: H. Mehlhorn (Ed.), *Arthropods as Vectors of Emerging Diseases.* Parasitology Research Monographs. Volume 3, Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 329–360.
- CHALIGIANNIS I., LALLE M., POZIO E., SOTIRAKI S. 2012: Anisakidae infection in fish of the Aegean Sea. *Vet. Parasitol.* 184: 362–366.
- CHOU Y.-Y., WANG C.-S., CHEN H.-G., CHEN H.-Y., CHEN S.-N., SHIH H.-H. 2011: Parasitism between *Anisakis simplex* (Nematoda: Anisakidae) third-stage larvae and the spotted mackerel *Scomber australasicus* with regard to the application of stock identification. *Vet. Parasitol.* 177: 324–331.
- CROSS M.A., COLLINS C., CAMPBELL N., WATTS P.C., CHUBB J.C., CUNNINGHAM C.O., HATFIELD E.M.C., MACKENZIE K. 2007: Levels of intra-host and temporal sequence variation in a large COI sub-units from *Anisakis simplex* sensu stricto (Rudolphi 1809) (Nematoda: Anisakidae): implications for fisheries management. *Mar. Biol.* 151: 695–702.
- DASCHNER A., CUÉLLAR C., RODERO M. 2011: The *Anisakis* allergy debate: does an evolutionary approach help? *Trends Parasitol.* 28: 9–15.
- DASCHNER A., PASCUAL C.-Y. 2005: *Anisakis simplex*: sensitization and clinical allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 5: 281–285.
- DU C., ZHANG L., SHI M., MING Z., HU M., GASSER R.B. 2010: Elucidating the identity of *Anisakis* larvae from a broad range of marine fishes from the Yellow Sea, China, using a combined electrophoretic-sequencing approach. *Electrophoresis* 31: 654–658.
- DZIDO J., KIJEWSKA A., ROKICKA M., SWIĄTALSKA-KOŚEDA A., ROKICKI J. 2009: Report on anisakid nematodes in polar regions – preliminary results. *Polar Sci.* 3: 207–211.
- FARJALLAH S., BUSI M., MAHJOUR M.O., SLIMANE B.B., PAGGI L., SAID K., D'AMELIO S. 2008a: molecular characterization of larval anisakid nematodes from marine fishes off the Moroccan and Mauritanian coasts. *Parasitol. Int.* 57: 430–436.
- FARJALLAH S., SLIMANE B.B., BUSI M., PAGGI L., AMOR N., BLEL H., SAID K., D'AMELIO S. 2008b: Occurrence and molecular identification of *Anisakis* spp. from the North African coasts of Mediterranean Sea. *Parasitol. Res.* 102: 371–379.
- FROESE R., PAULY D. (Eds.) 2012: *Fishbase World Wide Web electronic publication*, www.fishbase.org, accessed 08/2012.
- HAILER F., KUTSCHERA V.E., HALLSTRÖM B.M., KLASSERT D., FAIN S.R., LEONARD J.A., ARNASON U., JANKE A. 2012: Nuclear genomic sequences reveal that polar bears are an old and distinct bear lineage. *Science* 336: 344–347.
- HAMMERSCHMIDT K., KOCH K., MILINSKI M., CHUBB J.C., PARKER G.A. 2009: When to go: optimization of host switching in parasites with complex life cycles. *Evolution* 63: 1976–1986.
- HERMIDA M., MOTA R., PACHECO C.C., SANTOS C.L., CRUZ C., SARAIVA A., TAMAGNINI P. 2012: Infection levels and diversity of anisakid nematodes in blackspot seabream, *Pagellus bogaraveo*, from Portuguese waters. *Parasitol. Res.* 110: 1919–1928.
- HOCHBERG N.S., HAMER D.H. 2010: Anisakidosis: perils of the deep. *Clin. Infect. Dis.* 51: 806–812.
- HØJGAARD D.P. 1998: Impact of temperature, salinity and light on hatching of eggs of *Anisakis simplex* (Nematoda, Anisakidae), isolated by a new method, and some remarks on survival of larvae. *Sarsia* 83: 21–28.
- INIGUEZ A.M., PORTES SANTOS C., PAULO VICENTE A.C. 2009: Genetic characterization of *Anisakis typica* and *Anisakis physteris* from marine mammals and fish from the Atlantic Ocean off Brazil. *Vet. Parasitol.* 165: 350–356.
- JEFFERSON T.A., WEBBER M.A., PITMAN R. 2008: *Marine Mammals of the World: A Comprehensive Guide to their Identification.* Academic Press, London, 573 pp.
- KARL H., BAUMANN F., OSTERMEYER U., KUHN T., KLIMPEL S. 2011: *Anisakis simplex* (s.s.) larvae in wild Alaska salmon: no indication of post-mortem migration from viscera into flesh. *Dis. Aquat. Org.* 94: 201–209.
- KELLERMANN S., KLIMPEL S., PALM H.W. 2007: Molecular identification of ascaridoid nematodes from the deep-sea onion-eye grenadier (*Macrourus berglax*) from the East Greenland Sea. *Deep-Sea Res. I.* 54: 2194–2202.
- KIJEWSKA A., DZIDO J., SHUKHGALTER O., ROKICKI J. 2009: *Anisakis* parasites of fishes caught on the African shelf. *J. Parasitol.* 95: 639–645.
- KLIMPEL S., BUSCH M.W., KUHN T., ROHDE A., PALM H.W. 2010a: The *Anisakis simplex* complex off the South Shetland Islands (Antarctica): endemic populations versus introduction through migratory hosts. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* 403: 1–11.
- KLIMPEL S., BUSCH M.W., SUTTON T., PALM H.W. 2010b: Meso- and bathy-pelagic fish parasites at the Mid-Atlantic Ridge (MAR): low host specificity and restricted parasite diversity. *Deep-Sea Res. I.* 57: 596–603.
- KLIMPEL S., KELLERMANN S., PALM H.W. 2008: The role of pelagic swarm fish (Myctophidae: Teleostei) in the oceanic life-cycle of *Anisakis* sibling species at the Mid-Atlantic Ridge, Central Atlantic. *Parasitol. Res.* 104: 43–53.

- KLIMPEL S., KELLERMANN S. E., PALM H.W., MORAVEC F. 2007: Zoogeography of fish parasites of the pearlside (*Maurollicus muelleri*), with genetic evidence of *Anisakis simplex* (s.s.) from the Mid-Atlantic Ridge. *Mar. Biol.* 152: 725–732.
- KLIMPEL S., KUHN T., BUSCH M.W., KARL H., PALM H.W. 2011: Deep-water life cycle of *Anisakis paggiae* (Nematoda: Anisakidae) in the Irminger Sea indicates kogiid whale distribution in north Atlantic waters. *Polar Biol.* 34: 899–906.
- KLIMPEL S., PALM H.W. 2011: Anisakid nematode (Ascaridoidea) life cycles and distribution: increasing zoonotic potential in the time of climate change? In: H. Mehlhorn (Ed.), *Progress in Parasitology. Parasitol. Res. Monographs. Volume 2*, Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 201–222.
- KLIMPEL S., PALM H.W., BUSCH M.W., KELLERMANN S. E., RÜCKERT S. 2006: Fish parasites in the Arctic deep-sea: Poor diversity on pelagic fish species vs. heavy parasite load in a demersal fish. *Deep-Sea Res. I* 53: 1167–1181.
- KLIMPEL S., PALM H.W., RÜCKERT S., PIATKOWSKI U. 2004: The life cycle of *Anisakis simplex* in the Norwegian Deep (northern North Sea). *Parasitol. Res.* 94: 1–9.
- KØIE M. 2001: Experimental infections of copepods and sticklebacks *Gasterosteus aculeatus* with small ensheathed and large third-stage larvae of *Anisakis simplex* (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *Parasitol. Res.* 87: 32–36.
- KØIE M., BERLAND B., BURT M.D.B. 1995: Development to third-stage larvae occurs in the eggs of *Anisakis simplex* and *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *Can. J. Aquat. Sci.* Vol. 52: 134–139.
- KUHN T., GARCÍA-MÁRQUEZ J., KLIMPEL S. 2011: Adaptive radiation within marine anisakid nematodes: a zoogeographical modeling of cosmopolitan, zoonotic parasites. *PLoS ONE* 6: e28642.
- LARKIN M.A., BLACKSHIELDS G., BROWN N.P., CHENNA R., MCGETTINGAN P.A., MCWILLIAM H., VALENTIN F., WALLACE I.M., WILM A., LOPEZ R., THOMPSON J.D., GIBSON T.J., HIGGINS D.G. 2007: ClustalW and ClustalX. *Bioinformatics* 23: 2947–2948.
- LEE M.H., CHEON D.-S., CHOI C. 2009: Molecular genotyping of *Anisakis* species from Korean Sea fish by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *Food Control* 20: 623–626.
- LILE N.K. 1998: Alimentary tract helminths of four pleuronectid flatfish in relation to host phylogeny and ecology. *J. Fish Biol.* 53: 945–953.
- MACKENZIE K., CAMPBELL N., MATTIUCCI S., RAMOS P., PINTO A.L., ABAUNZA P. 2002: Parasites as biological tags for stock identification of Atlantic horse mackerel *Trachurus trachurus* L. *Fish. Res.* 89: 136–145.
- MARCOGLIESE D.J. 1995: The role of zooplankton in the transmission of helminth parasites to fish. *Rev. Fish Biol. Fish.* 5: 336–371.
- MARQUES J.F., CABRAL H.N., BUSI M., D'AMELIO S. 2006: Molecular identification of *Anisakis* species from Pleuronectiformes off the Portuguese coast. *J. Helminthol.* 80: 47–51.
- MARQUES J.F., SANTOS M.J., CABRAL H.N. 2009: Zoogeographical patterns of flatfish (Pleuronectiformes) parasites in the northeast Atlantic and the importance of the Portuguese coast as a transitional area. *Sci. Mar.* 73: 461–471.
- MATTIUCCI S., ABAUNZA P., DAMIANO S., GARCIA A., SANTOS M.N., NASCETTI G. 2007: Distribution of *Anisakis* larvae, identified by genetic markers, and their use for stock characterization of demersal and pelagic fish from European waters: an update. *J. Helminthol.* 81: 117–127.
- MATTIUCCI S., ABAUNZA P., RAMADORI L., NASCETTI G. 2004: Genetic identification of *Anisakis* larvae in European hake from Atlantic and Mediterranean waters for stock recognition. *J. Fish Biol.* 65: 495–510.
- MATTIUCCI S., FARINA V., CAMPBELL N., MACKENZIE K., RAMOS P., PINTO A.L., ABAUNZA P., NASCETTI G. 2008: *Anisakis* spp. larvae (Nematoda: Anisakidae) from Atlantic horse mackerel: their identification and use as biological tags for host stock characterization. *Fish. Res.* 89: 146–151.
- MATTIUCCI S., NASCETTI G. 2006: Molecular systematics, phylogeny and ecology of anisakid nematodes of the genus *Anisakis* Dujardin, 1845: an update. *Parasite* 13: 99–113.
- MATTIUCCI S., NASCETTI G. 2007: Genetic diversity and infection levels of anisakid nematodes parasitic in fish and marine mammals from boreal and austral hemispheres. *Vet. Parasitol.* 148: 43–57.
- MATTIUCCI S., NASCETTI G. 2008: Advances and trends in the molecular systematics of anisakid nematodes, with implications for their evolutionary ecology and host-parasite co-evolutionary processes. *Adv. Parasitol.* 66: 47–148.
- MATTIUCCI S., NASCETTI G., CIANCHI R., PAGGI L., ARDUINO P., MARGOLIS L., BRATTEY J., WEBB S., D'AMELIO S., ORECCHIA P., BULLINI L. 1997: Genetic and ecological data on the *Anisakis simplex* complex with evidence for a new species (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *J. Parasitol.* 83: 401–416.
- MATTIUCCI S., NASCETTI G., DAILEY M., WEBB S.C., BARROS N.B., CIANCHI R., BULLINI L. 2005: Evidence for a new species of *Anisakis* Dujardin, 1845: morphological description and genetic relationships between congeners (Nematoda: Anisakidae). *Syst. Parasitol.* 61: 157–171.
- MATTIUCCI S., PAGGI L., NASCETTI G., ABOLLO E., WEBB S.C., PASCUAL S., CIANCHI R., BULLINI L. 2001: Genetic divergence and reproductive isolation between *Anisakis brevispiculata* and *Anisakis physeteris* (Nematoda: Anisakidae). *Int. J. Parasitol.* 31: 9–14.
- MATTIUCCI S., PAGGI L., NASCETTI G., PORTES SANTOS C., COSTA G., DI BENEDETTO A.P., RAMOS R., ARGYROU M., CIANCHI R., BULLINI L. 2002: Genetic markers in the study of *Anisakis typica* (Diesing, 1860): larval identification and genetic relationships with other species of *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Anisakidae). *Syst. Parasitol.* 51: 159–170.
- MATTIUCCI S., PAOLETTI M., WEBB S.C. 2009: *Anisakis nascettii* n. sp. (Nematoda: Anisakidae) from beaked whales of the southern hemisphere: morphological description, genetic relationships between congeners and ecological data. *Syst. Parasitol.* 74: 199–217.
- MCCLELLAND G. 2005: Nematoda (roundworms). In: Rohde K. (Ed.), *Marine Parasitology*. CABI, Wallingford, pp. 104–115.
- MELONI M., ANGELUCCI G., MERELLA P., SIDDI R., DEIANA C., ORRÙ G., SALATI F. 2011: Molecular characterization of *Anisakis* larvae from fish caught off Sardinia. *J. Parasitol.* 97: 908–914.
- MURATA R., SUZUKI J., SADAMASU K., KAI A. 2011: Morphological and molecular characterization of *Anisakis* larvae (Nematoda: Anisakidae) in *Beryx splendens* from Japanese waters. *Parasitol. Int.* 60: 193–198.
- MURPHY T.M., BERZANO M., O'KEEFE S.M., COTTER D.M., McEVoy S.E., THOMAS K.A., MAOILÉIDIGH N.P.Ó., WHELAN K.F. 2010: Anisakid larvae in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) grilse and post-smolts: molecular identification and histopathology. *J. Parasitol.* 96: 77–82.

- NADLER S.A., D'AMELIO S., DAILEY M.D., PAGGI L., SIU S., SAKANARI J.A. 2005: Molecular phylogenetics and diagnosis of *Anisakis*, *Pseudoterranova*, and *Contracaecum* from Northern Pacific marine mammals. *J. Parasitol.* 91: 1413–1429.
- NASCETTI G., PAGGI L., ORECCHIA P., SMITH J.W., MATTIUCI S., BULLINI L. 1986: Electrophoretic studies on the *Anisakis simplex* complex (Ascaridida: Anisakidae) from the Mediterranean and north-east Atlantic. *Int. J. Parasitol.* 16: 633–640.
- NOGUERA P., COLLINS C., BRNO D., PERT C., TURNBULL A., MCINTOSH A., LESTER K., BRICKNELL I., WALLACE S., COOK P. 2009: Red vent syndrome in wild Atlantic salmon *Salmo salar* in Scotland is associated with *Anisakis simplex* sensu stricto (Nematoda: Anisakidae). *Dis. Aquat. Org.* 87: 199–215.
- PALM H.W., DAMRIYASA I.M., LINDA L., OKA I.B.M. 2008: Molecular genotyping of *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Ascaridoidea: Anisakidae) larvae from marine fish of Balinese and Javanese waters, Indonesia. *Helminthologia* 45: 3–12.
- PONTES T., D'AMELIO S., COSTA G., PAGGI L. 2005: Molecular characterization of larval nematodes from marine fishes of Madeira by a PCR-based approach, with evidence for a new species. *J. Parasitol.* 91: 1430–1434.
- QUIAZON K.M.A., YOSHINAGA T., OGAWA K. 2011a: Experimental challenge of *Anisakis simplex* sensu stricto and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in rainbow trout and olive flounder. *Parasitol. Int.* 60: 126–131.
- QUIAZON K.M.A., YOSHINAGA T., OGAWA K. 2011b: Distribution of *Anisakis* species larvae from fishes of the Japanese waters. *Parasitol. Int.* 60: 223–226.
- QUIAZON K.M.A., YOSHINAGA T., OGAWA K., YUKAMI R. 2008: Morphological differences between larvae and *in vitro*-cultured adults of *Anisakis simplex* (sensu stricto) and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae). *Parasitol. Int.* 57: 483–489.
- QUIAZON K.M.A., YOSHINAGA T., SANTOS M.D., OGAWA K. 2009: Identification of larval *Anisakis* spp. (Nematoda: Anisakidae) in Alaska pollock (*Theragra chalcogramma*) in northern Japan using morphological and molecular markers. *J. Parasitol.* 95: 1227–1232.
- SAKANARI J.A., MCKERROW J.H. 1989: Anisakiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2: 278–284.
- SHAMSI S., EISENBARTH A., SAPTARSHI S., BEVERIDGE I., GASSER R.B., LOPATA A.L. 2011: Occurrence and abundance of anisakid nematode larvae in five species of fish from southern Australian waters. *Parasitol. Res.* 108: 927–934.
- SHIH H.H. 2004: Parasitic helminth fauna of the cutlass fish, *Trichiurus lepturus* L., and the differentiation of four anisakid nematode third-stage larvae by nuclear ribosomal DNA sequences. *Parasitol. Res.* 93: 188–195.
- SKOV J., KANIA P.W., OLSEN M.M., LAURIDSEN J.H., BUCHMANN K. 2010: Nematode infections of maricultured and wild fishes in Danish waters. *Aquaculture* 298: 24–28.
- SUZUKI J., MURATA R., HOSAKA M., ARAKI J. 2010: Risk factors for human *Anisakis* infection and association between the geographic origins of *Scomber japonicus* and anisakid nematodes. *Int. J. Food Microbiol.* 137: 88–93.
- UMEHARA A., KAWAKAMI Y., ARAKI J., UCHIDA A. 2008: Multiplex PCR for the identification of *Anisakis simplex* sensu stricto, *Anisakis pegreffii* and the other anisakid nematodes. *Parasitol. Int.* 57: 49–53.
- UMEHARA A., KAWAKAMI Y., MATSUI T., ARAKI J., UCHIDA A. 2006: Molecular identification of *Anisakis simplex* sensu stricto and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) from fish and cetacean in Japanese waters. *Parasitol. Int.* 55: 267–271.
- VALENTINI A., MATTIUCI S., BONDANELLI P., WEBB S.C., MIGNUCCI-GIANNONE A.A., COLÓN-LLAVINA M.M., NASCETTI G. 2006: Genetic relationships among *Anisakis* species (Nematoda: Anisakidae) inferred from mitochondrial cox2 sequences, and comparison with allozyme data. *J. Parasitol.* 92: 156–166.
- ZHANG L., HU M., SHAMSI S., BEVERIDGE I., LI H., XU Z., LI L., CANTACESSI C., GASSER R.B. 2007: The specific identification of anisakid larvae from fishes from the Yellow Sea, China, using mutation scanning-coupled sequence analysis of nuclear ribosomal DNA. *Mol. Cell. Probe* 21: 386–390.
- ZHU X.Q., GASSER R.B., JACOBS D.E., HUNG G.C., CHILTON N.B. 2000: Relationships among some ascaridoid nematodes based on ribosomal DNA sequence data. *Parasitol. Res.* 86: 738–744.
- ZHU X.Q., PODOLSKA M., LIU J.S., YU H.Q., CHEN H.H., LIN Z.X., LUO C.B., SONG H.Q., LIN R.Q. 2007: Identification of anisakid nematodes with zoonotic potential from Europe and China by single-strand conformation polymorphism analysis of nuclear ribosomal DNA. *Parasitol. Res.* 101: 1703–1707.

Received 17 September 2012

Accepted 19 December 2012

Curriculum Vitae – Thomas Kuhn

Geboren am 02. August 1982 in Krefeld

Dienst-Anschrift:

Integrative Parasitologie und Tierphysiologie
Institut für Ökologie, Evolution und Diversität
Goethe-Universität
Biologicum, Raum 3.424
Max-von-Laue-Straße 13
D-60438 Frankfurt am Main

Tel.: +49 69 798 42239

E-Mail: t.kuhn@bio.uni-frankfurt.de

Bildungsweg

- 06.2010 – 12.2013 Promotion an der Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
1. Gutachter: Prof. Dr. Sven Klimpel, Institut für Ökologie, Evolution und Diversität, Integrative Parasitologie und Tierphysiologie; Biodiversität und Klima Forschungszentrum (BiK-F), Senckenberg Gesellschaft für Naturforschung.
2. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Oehlmann, Institut für Ökologie, Evolution und Diversität, Aquatische Ökotoxikologie.
- 03.2010 Abschluss des Hauptstudiums am 02.03.2010 mit dem Diplom.
- 05.2009 – 03.2010 Diplomarbeit an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
Gutachter: Prof. Dr. Sven Klimpel und Prof. Dr. Harry W. Palm, Institut für Zoomorphologie, Zellbiologie und Parasitologie.
Thema: "Molekulare Untersuchungen an marinen ascaridoiden Nematoden".
- 10.2005 – 05.2009 Biologiestudium an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- 08.2003 – 08.2005 Ausbildung zum biologisch-technischen Assistenten (BTA) am Berufskolleg „Am Holterhöfchen“, Hilden.
- 07.2002 – 04.2003 Wehrdienst bei der Luftwaffensicherungsstaffel „S“ in Büchel, Cochem.
- 1993 – 2002 Kardinal von Galen Gymnasium, Kevelaer. Abschluss: Abitur.

Veröffentlichungen in referierten Zeitschriften

Kuhn T., Hailer F., Palm H.W., Klimpel S. (2013) Global assessment of molecularly identified *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Anisakidae) in their teleost intermediate hosts. *Folia Parasitologica* 60: 123-134.

Kuhn T., Benninghoff T., Karl H., Landry T., Klimpel S. (2013) Sealworm *Pseudoterranova decipiens* s.s. infection of European smelt *Osmerus eperlanus* in German coastal waters: ecological implications. *Diseases of Aquatic Organisms* 102: 217-224.

Busch M.W., **Kuhn T.**, Münster J., Klimpel S. (2012) Marine crustaceans as potential hosts and vectors for metazoan parasites. In: Heinz Mehlhorn (Ed.) *Arthropods as vectors of emerging diseases*. *Parasitology Research Monographs* 3: 329-360.

Kuhn T., García-Màrquez J., Klimpel S. (2011) Adaptive radiation within marine anisakid nematodes: a zoogeographical modeling of cosmopolitan, zoonotic parasites. PLoS ONE 6(12): e28642.

Klimpel S., **Kuhn T.**, Busch M.W., Karl H., Palm H.W. (2011) Deep-water life cycle of *Anisakis paggiae* (Nematoda: Anisakidae) in the Irminger Sea indicates kogiid whale distribution in north Atlantic waters. Polar Biology 34: 899-906.

Karl H., Baumann F., Ostermeyer U., **Kuhn T.**, Klimpel S. (2011) *Anisakis simplex* (s.s.) larvae in wild Alaska salmon: no indication of post-mortem migration from viscera into flesh. Diseases of Aquatic Organisms 94: 201-209.

Klimpel S., Busch M.W., **Kuhn T.**, Rohde A., Palm H.W. (2010) The *Anisakis simplex* complex off the South Shetland Islands (Antarctica): endemic populations versus introduction through migratory hosts. Marine Ecology Progress Series 403: 1-11.

Vorträge

Zoogeography of zoonotic *Anisakis* spp. (Anisakidae, Nematoda) in different climate zones. 8. International Symposium of Fish Parasites, Viña del mar, Chile.

Zoogeography of zoonotic *Anisakis* spp. (Anisakidae, Nematoda) in different climate zones. 8. Jahrestagung der Gesellschaft für Ichthyologie, Frankfurt am Main.

Molecular identification of *Anisakis* Dujardin, 1845 and its range of distribution. 24. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie, Düsseldorf.

Poster-Präsentationen

Kuhn T., García-Marquèz J., Busch M.W., Klimpel S., Zoogeography and genetic variability of zoonotic *Anisakis* spp. (Anisakidae, Nematoda) in different climate zones. 8. Jahrestagung der Gesellschaft für Ichthyologie, Frankfurt am Main; 8. International Symposium of Fish Parasites, Viña del mar, Chile.

Busch M.W., **Kuhn T.**, Klimpel. S., Biodiversity of zooplankton off the coast of Namibia and its role as intermediate host of fish parasitic *Hysterothylacium aduncum*. 8. Jahrestagung der Gesellschaft für Ichthyologie, Frankfurt am Main; 8. International Symposium of Fish Parasites, Viña del mar, Chile.

Frankfurt am Main, den 10. Oktober 2013

Thomas Kuhn