

The first detection of DNA of *Caryophyllaeus laticeps* (Pallas, 1781) in sunbleak *Leucaspius delineatus* (Heckel, 1843)

Denikina N.N.^{1*}, Kulakova N.V.², Bukin Y.S.¹, Khamnueva T.R.³, Baldanova D.R.³, Bogdanov B.E.¹, Dzyuba E.V.¹

¹ Limnological Institute of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 3 Ulan-Batorskaya Str., Irkutsk, 664033, Russia

² Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 132 Lermontova Str., Irkutsk, 664033, Russia

³ Institute of General and Experimental Biology of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 6 Sakhyanovoi Str., Ulan-Ude, 670047, Russia

ABSTRACT. DNA of *Caryophyllaeus laticeps* (Pallas, 1781) (Cestoda: Caryophyllidea) was first found in the intestine of common sunbleak *Leucaspius delineatus* (Heckel, 1843) from the Irkutsk Reservoir. The aim of the study was to carry out a comparative analysis and reconstruction of the phylogenetic position of the parasite. Determination of the *cox1* gene fragment and comparative analysis of the obtained and available in genetic databases nucleotide sequences showed high nucleotide diversity of *C. laticeps* both in the studied samples (0–6.4%) and in the reference sequences from the GenBank database (0–6.8%). The sequences of *C. laticeps* in the phylogenetic tree formed three clades containing local samples of sunbleak parasites in all of them. The most represented genotype (75%) is clustered with parasite sequences of the bream *Abramis brama* (Linnaeus, 1758) from Switzerland, Slovakia, and the European part of Russia. Another significant genotype (19%) is in the joint cluster with the *C. laticeps* sequences of the common carp *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758 (Italy). The need for additional studies on the biology and ecology of *C. laticeps* and revision of caryophyllid cestodes in fish in the Angara River and Lake Baikal were under consideration.

Keywords: *Caryophyllaeus laticeps*, *Leucaspius delineatus*, *cox1* gene, Irkutsk Reservoir, Baikal Region

1. Introduction

The relevance of invasive species research has now increased significantly worldwide (Tierney et al., 2020; Doria et al., 2021; Przybylski et al., 2021; Zhu et al., 2022). In this context, molecular genetic studies were particularly sought after in the development of standards for aquatic ecosystem monitoring, including indicators that reveal the distribution and impact of invasive fish species and their parasites and predict the potential consequences (Le Roux and Wiczorek, 2009; Rusch et al., 2018; Ali et al., 2022; Alyamkin et al., 2022).

The common sunbleak *Leucaspius delineatus* (Heckel, 1843) is a small-sized freshwater species in the family Leuciscidae. As a result of accidental introduction and subsequent self-propagation, it has spread far beyond its natural range (Reshetnikov et al., 2017). Earlier molecular genetic studies of the sunbleak from

the Irkutsk Reservoir confirmed the accidental introduction and the spread of the species from the European part of Russia into the water areas of Siberia (Kulakova et al., 2022).

During the study of the contents of the intestine of the sunbleak from Irkutsk Reservoir the DNA sequences of *Caryophyllaeus laticeps* (Pallas, 1781) (Cestoda: Caryophyllidea) were obtained using molecular genetic methods. This species is well known as an intestinal parasite of fishes belonging to the families Leuciscidae, Cyprinidae, Gobionidae, and Tincidae (Pronin and Sanzhieva, 2001; Rusinek, 2007; Jirsa et al., 2008; Bazsalovicsová et al., 2014; Hanzelova et al., 2015; Avdeeva et al., 2017; Czerniejewski et al., 2019). *C. laticeps* was found to have the widest range of host fishes among all caryophyllid cestodes (Barčák et al., 2017). Doubtful or accidental hosts for *C. laticeps* are stellate sturgeon *Acipenser stellatus* Pallas, 1771, spiny loach *Cobitis taenia* Linnaeus, 1758, whitefish

*Corresponding author.

E-mail address: denikina@lin.irk.ru (N.N. Denikina)

Received: February 01, 2023; **Accepted:** February 12, 2023;

Available online: February 22, 2023

© Author(s) 2023. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



Coregonus macrophthalmus Nüsslin, 1882 and *Coregonus wartmanni* (Bloch, 1784), pike *Esox lucius* Linnaeus, 1758, three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* Linnaeus, 1758, striped ruffe *Gymnocephalus schraetser* (Linnaeus, 1758), common weatherfish *Misgurnus fossilis* (Linnaeus, 1758), and perch *Perca fluviatilis* Linnaeus, 1758 (Hanzelova et al., 2015).

In Lake Baikal, *C. laticeps* has been found only in dace *Leuciscus leuciscus baicalensis* (Dybowski, 1869) and roach *Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758) (Pronin and Sanzhieva, 2001). In the lower streams of the Angara River only *Caryophyllaeides fennica* from the family Caryophyllidae (Schneider, 1902) Nybelin, 1922 (Pronin et al., 1999) has been found so far. It is known that *C. laticeps* is a widespread highly polymorphic species with several host morphotypes (Pronin and Sanzhieva, 2001; Xi et al., 2016; Bazsalovicsová et al., 2020).

Data on the presence of this parasite in the sunbleak were not previously available. Thus, the study objective was to carry out a comparative analysis and reconstruction of the phylogenetic position of the cestode *C. laticeps*, a parasite of the common sunbleak from the Irkutsk Reservoir.

2. Materials and methods

The catch location with coordinates 52°12'37" N, 104°25'28" E was located in the Irkutsk Reservoir on the Angara River. The fish were caught from a depth of 2-3 m in July and August 2019 using a hook gear. Fish were euthanized with an overdose of anesthetic (GOST 33219-2014, 2016) with a 2% lidocaine solution (Lidocaine Bufus, Renewal, Russia). A total of 20 mature individuals were caught. Specimens were transported in ice and stored at -20°C. The weight and standard length of fish studied (mean ± SE) were 2.6 ± 0.2 g and 5.8 ± 1.4 cm, respectively.

To isolate DNA from all individuals, the intestines and their content were removed and combined into a single sample. According to the manufacturer's instructions, total DNA was isolated from the combined sample with an AmpliSense DNA-sorb-AM extraction kit (Russia). For amplification of the mitochondrial DNA *cox1* gene fragment, the following primers were applied: COIntF_MiSeq: 5'tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacag GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC and dgHCO2198_MiSeq: 5'gtctcgtggctcggagatgtgtataagagacagTAIACYTCIGGRTGICRAARAAYCA (Leray et al., 2013). A library from the purified amplicon pool was constructed with the Nextera XT kit (Illumina, Hayward, CA, USA), and nucleotide sequences were determined with Illumina NextSeq. The data obtained were deposited into the NCBI international database with the bioproject registration number PRJNA648490.

After bioinformatic processing, the resulting overlapping paired reads (contigs) were filtered according to the quality of the reads and their length, the presence of singletons, stop codons, and chimeras. All substandard contigs, including pseudogenes, were excluded from further analysis. Evolutionary analysis of the obtained sequences and all data on the *cox1*

gene of *C. laticeps* presented in the GenBank database was carried out with the MEGA11 software (Tamura et al., 2021). The model of nucleotide substitutions was selected using the jModeltest 2.1.7 software and the AIC criterion (Darriba et al., 2012). The evolutionary history was derived with the Maximum Likelihood Estimation (MLE) method and the General Time Reversible (GTR) model (Nei and Kumar, 2000). The discrete gamma distribution was applied to model differences in evolutionary rates among sites (Table, Fig.).

3. Results and discussion

The proportion of *C. laticeps* in the total pool of sequences obtained was more than 4%. The nucleotide sequences of *C. laticeps* in the phylogenetic tree formed three clades (Fig.). The sequences obtained in this study are located in all three clades. In general, significant nucleotide diversity is specific for *C. laticeps* and was detected in both the samples studied (0–6.4%) and the reference sequences from the GenBank database (0–6.8%).

A clear correlation between the branching order and the geographical location and the host species was not found. This fact was likely to be a lack of data and was due to the genetic plasticity of *C. laticeps*.

It should be noted that the most represented (75% of reads) genotype Node 366 is clustered with the sequences from breams caught in Switzerland, Slovakia

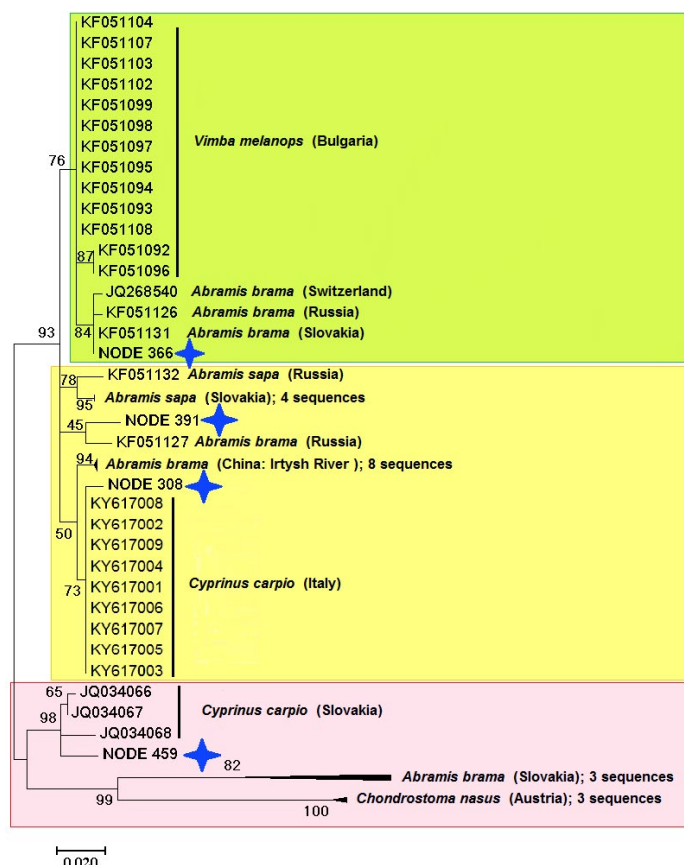


Fig. Phylogenetic analysis of *Caryophyllaeus laticeps* using the MLE method. ★ – sequences from the studied sunbleak

Table. Characterization of the nucleotide sequences of the *cox1* gene of *C. laticeps* from the GenBank database used for the analysis.

| Host | Sampling site | Accession № GenBank |
|--|-----------------------------|------------------------------|
| <i>Abramis brama</i> (Linnaeus, 1758) | China: Irtysh River | KT781573-KT781580 |
| <i>A. brama</i> | Russia | KF051126, KF051127 |
| <i>A. brama</i> | Slovakia | JQ034070, JQ034071, KF051131 |
| <i>A. brama</i> | Switzerland: Neuchatel Lake | JQ268540 |
| <i>Abramis sapa</i> (Pallas, 1814) (= <i>Ballerus sapa</i> (Pallas, 1814)) | Russia | KF051132 |
| <i>A. sapa</i> (= <i>B. sapa</i>) | Slovakia | JQ034077, KF051114-KF051118 |
| <i>Chondrostoma nasus</i> (Linnaeus, 1758) | Austria | KF051128-KF051130 |
| <i>Cyprinus carpio</i> Linnaeus, 1758 | Slovakia | JQ034066-JQ034068 |
| <i>C. carpio</i> | Italy | KY617001-KY617009 |
| <i>Vimba melanops</i> (Heckel, 1837) | Bulgaria | KF051092-KF051108 |

and the European part of Russia. Another significant genotype (19%) is Node 308 which got into a cluster with sequences from carp (Italy). The remaining variants were present in minor quantities.

The spectrum of parasitic species of sunbleak in a given water body depends on the host habitat conditions and the composition of the parasitic fauna of the dominant ichthyofauna species (Dorovskikh, 2019). The Irkutsk Reservoir is located along the Angara River basin from Lake Baikal to Irkutsk. Its total area is 15 K hectares, and almost 25% of it are bays and shallow waters (up to 12 m deep). Sunbleak prefers shallow and well heated stretches of water with silty and sandy bottoms, where it lives together with juvenile bream *Abramis brama* (Linnaeus, 1758) and roach. The bream as a host of *C. laticeps* is often mentioned in many studies (Dzika, 2002; Rückert et al., 2007; Barčák et al., 2017; Frolova et al., 2019). In Lake Baikal, *C. laticeps* was found among parasites only in dace and roach (Pronin and Sanzhieva, 2001). In the lower stream of the Angara River among caryophyllids only *C. fennica* was previously described in dace (extensity 7.1%, abundance index 0.34 species) and in roach (20.0%, 0.80 species, respectively), while *C. laticeps* was not found. *C. fennica* was also found in the parasitic fauna of sunbleak from the Northern Dvina watershed (Dorovskikh, 2019).

Tapeworms of the genus *Caryophyllaeus* have a two-host life cycle. Oligochaetes of the genera *Tubifex* and *Limnodrillus*, dwelling in slow-flowing or stagnant silty and/or sandy bottoms, are intermediate hosts for cestodes (Protasova et al., 1990; Poddubnaya, 1995). Representatives of these genera were previously found in the composition of the zoobenthos from water bodies of the Baikal area (Semernoy, 2001). Thus, the presence of nucleotide sequences of the worm *C. laticeps* in the intestine of fish could indicate feeding of the sunbleak by infected oligochaetes. However, the question of whether the oligochaetes of the Irkutsk Reservoir are intermediate hosts of this parasite species remains open. In addition, it is the subject of further study to

define the role and classify the sunbleak as a host.

The Irkutsk Reservoir is subjected to anthropogenic impact: significant water level fluctuations (Bychkov and Nikitin, 2015) and recreational pressure. Previously, it was shown that environmental factors (increased input of biogenic elements into the reservoir, lowering of water level, unfavorable temperature conditions, etc.) result in the greatest distribution of oligochaetes among other representatives of benthic fauna, which contributes to an increase in the infection of fish with *C. laticeps* cestodes (Jirsa et al., 2008; Novokhatskaya et al., 2008). For instance, the extent of infection of the common podust *Chondrostoma nasus* (Linnaeus, 1758) with the *C. laticeps* cestode correlates with the degree of anthropogenic habitat alteration. In rivers with a favorable ecological situation, *C. laticeps* is either absent in fish or occurs at low levels in fish (5.6–20%), while infection in reservoirs can be as high as 78.2% (Jirsa et al., 2008).

Introduced species usually eventually acquire local parasites from a new range (Tierney et al., 2020). It has already been shown that such natural relationships in the host-parasite system can be altered due to differences in the biology of parasite and host populations (invasive and native). Although alien fish species are infected by parasites of the native species, the parasites in these species do not always reach sexual maturity. The alien fish species can reduce the intensity of infection of native hosts by accepting but not transmitting the invasive stages of the parasites (Tierney et al., 2020).

Previous molecular genetic studies of the sunbleak from the Irkutsk Reservoir confirmed the accidental introduction and spread of the species from the European part of Russia to the water areas of Siberia (Kulakova et al., 2022). The results of our phylogenetic analysis also recorded the dominance of genotypes of *C. laticeps* from the European part of Russia. Other presented variants of genotypes were minor. Ones registered in fish from the Irtysh River (China segment) probably indicate a different entry route of the parasite.

The question of whether *C. laticeps* with the recorded genotypes is a parasite introduced or acquired from local fish species should also be further investigated. In this regard, it is perspective not only to study the biology and ecology of *C. laticeps*, but also to carry out a revision of caryophyllid cestodes from the Angara River and Lake Baikal.

4. Conclusions

The detection of *C. laticeps* DNA in the sunbleak intestine opened many perspectives for further studies, such as determination of the diversity of intermediate hosts, classification of the sunbleak as a host, study of the biology, ecology, and origin of the parasite, and revision of caryophyllid cestodes in fish of the Angara River and Lake Baikal. The relevance of further research is beyond doubt, since there are practically no data on the parasitic fauna of the sunbleak from the Eastern Siberia.

Acknowledgements

The work was supported by the State projects No. 121032300224-8, 121032300196-8, 121030900141-8. We thank Yulia Sapozhnikova for her helpful advice.

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests.

References

Ali S., Samake J.N., Spear J. et al. 2022. Morphological identification and genetic characterization of *Anopheles stephensi* in Somaliland. *Parasites & Vectors* 15: 247. DOI: [10.1186/s13071-022-05339-y](https://doi.org/10.1186/s13071-022-05339-y)

Alyamkin G.V., Zhigileva O.N., Zhokhov A.E. 2022. Genetic variability of the Amur Sleeper (*Perccottus glenii*) and their parasite, cestode (*Nippotaenia mogurndae*), outside the natural area of distribution. *Inland Water Biology* 15: 179-188. DOI: [10.1134/S1995082922010023](https://doi.org/10.1134/S1995082922010023)

Avdeeva E.V., Evdokimova E.B., Zaostrovseva S.K. 2017. Current state of studying fish parasitofauna of the Kaliningrad region water bodies. *Izvestiya KGTU [Scientific Journal of Kaliningrad State Technical University]* 45(4): 24-61. (in Russian)

Barčák D., Oros M., Hanzelová V. et al. 2017. A synoptic review of *Caryophyllaeus* Gmelin, 1790 (Cestoda: Caryophyllidae), parasites of cyprinid fishes. *Folia Parasitologica* 64: 027. DOI: [10.14411/fp.2017.027](https://doi.org/10.14411/fp.2017.027)

Bazsalovicsová E., Králová-Hromadová I., Brabec J. et al. 2014. Conflict between morphology and molecular data: a case of the genus *Caryophyllaeus* (Cestoda, Caryophyllidae), monozoic tapeworm of cyprinid fishes. *Folia Parasitologica* 61(4): 347-354. DOI: [10.14411/fp.2014.035](https://doi.org/10.14411/fp.2014.035)

Bazsalovicsová E., Králová-Hromadová I., Juhásová L. et al. 2020. Comparative analysis of monozoic fish tapeworms *Caryophyllaeus laticeps* (Pallas, 1781) and recently described *Caryophyllaeus chondrostomi* Barčák, Oros, Hanzelová, Scholz, 2017, using microsatellite markers. *Parasitology Research* 119(12): 3995-4004. DOI: [10.1007/s00436-020-06898-8](https://doi.org/10.1007/s00436-020-06898-8)

Bychkov I.V., Nikitin V.M. 2015. Water-level regulation of Lake Baikal: problems and possible solutions. *Geography*

and Natural Resources 36: 215-224. DOI: [10.1134/S1875372815030014](https://doi.org/10.1134/S1875372815030014)

Czerniejewski P., Rybczyk A., Linowska A. et al. 2019. New location, food composition, and parasitic fauna of the invasive fish *Pseudorasbora parva* (Temminck & Schlegel, 1846) (Cyprinidae) in Poland. *Turkish Journal of Zoology* 43: 94-105. DOI: [10.3906/zoo-1806-26](https://doi.org/10.3906/zoo-1806-26)

Darriba D., Taboada G.L., Doallo R. et al. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9: 772. DOI: [10.1038/nmeth.2109](https://doi.org/10.1038/nmeth.2109)

Doria CRdC, Agudelo E., Akama A. et al. 2021. The silent threat of non-native fish in the Amazon: ANNF Database and Review. *Frontiers in Ecology and Evolution* 9: 646702. DOI: [10.3389/fevo.2021.646702](https://doi.org/10.3389/fevo.2021.646702)

Dorovskikh G.N. 2019. The parasite fauna of the *Leucaspis delineatus* (Heckel, 1843) from large river systems the European north-east Russia. *Vestnik Syktyvkarskogo universiteta. Seriya 2. Biologiya. Geologiya. Khimiya. Ekologiya [Syktyvkar University Bulletin. Series 2. Biology. Geology. Chemistry. Ecology]* 4(12): 77-89. (in Russian)

Dzika E. 2002. The parasites of bream *Abramis brama* (L.) from Lake Kortowskie. *Archives of Polish Fisheries* 10(Fasc. 1): 85-96.

Frolova T.V., Izvekov E.I., Solovyev M.M. et al. 2019. Activity of proteolytic enzymes in the intestine of bream *Abramis brama* infected with cestodes *Caryophyllaeus laticeps* (Cestoda, Caryophyllidae). *Comparative Biochemistry & Physiology Part B. Biochemistry and Molecular Biology* 235: 38-45. DOI: [10.1016/j.cbpb.2019.05.009](https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2019.05.009)

GOST 33219-2014. 2016. Guidelines for accommodation and care of laboratory animals. Species-specific provisions for fish, amphibians and reptiles. Moscow: Standartinform Publ. (in Russian)

Hanzelova V., Oros M., Barčák D. et al. 2015. Morphological polymorphism in tapeworms: redescription of *Caryophyllaeus laticeps* (Pallas, 1781) (Cestoda: Caryophyllidae) and characterisation of its morphotypes from different fish hosts. *Systematic Parasitology* 90: 177-190. DOI: [10.1007/s11230-014-9536-x](https://doi.org/10.1007/s11230-014-9536-x)

Jirsa F., Konecny R., Frank C. 2008. The occurrence of *Caryophyllaeus laticeps* in the nase *Chondrostoma nasus* from Austrian rivers: possible anthropogenic factors. *Journal of Helminthology* 82(1): 53-58. DOI: [10.1017/S0022149X07873548](https://doi.org/10.1017/S0022149X07873548)

Kulakova N.V., Bukin Yu.S., Denikina N.N. et al. 2022. Comparative analysis and reconstruction of phylogenetic position of sunbleak *Leucaspis delineatus* (Heckel, 1843) from the Irkutsk Reservoir. *Limnology and Freshwater Biology* 5: 1639-1642. DOI: [10.31951/2658-3518-2022-A-5-1639](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2022-A-5-1639)

Le Roux J., Wicczorek A. 2009. Molecular systematics and population genetics of biological invasions: towards a better understanding of invasive species management. *Annals of Applied Biology* 154: 1-17. DOI: [10.1111/j.1744-7348.2008.00280.x](https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2008.00280.x)

Leray M., Agudelo N., Mills S.C. et al. 2013. Effectiveness of annealing blocking primers versus restriction enzymes for characterization of generalist diets: unexpected prey revealed in the gut contents of two coral reef fish species. *PLoS One* 8(4): e58076. DOI: [10.1371/journal.pone.0058076](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058076)

Nei M., Kumar S. 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. New York: Oxford University Press.

Novokhatskaya O.V., Ieshko E.P., Sterligova O.P. 2008. Long-term changes in the parasite fauna of the bream *Abramis brama* L. in eutrophicated lake. *Parazitologiya [Parasitology]* 42(4): 308-317. (in Russian)

Poddubnaya L.G. 1995. Peculiarities of the integument genesis in proceroids of caryophyllidean cestodes. *Parazitologiya [Parasitology]* 29: 13-18. (in Russian)

Pronin N.M., Pronina S.V., Rudneva N.A. 1999. Fish

and ichthyopathological situation in the lower stream of the Angara river. In: Korsunov V.M., Pronin N.M., Gonchikov G.G. et al. (Eds.), *Bioraznoobraziye Baykal'skoy Sibiri* [Biodiversity of Baikal Siberia]. Novosibirsk: Nauka, pp. 99-119. (in Russian)

Pronin N.M., Sanzhieva S.D. 2001. Plathelminthes: Cestoda. In: Timoshkin O.A. (Ed.), *Index of animal species inhabiting Lake Baikal and its catchment area*. Novosibirsk: Nauka, pp. 242-270.

Protasova E., Kuperman B., Roytman V. et al. 1990. *Kariofillidy fauny SSSR* [Caryophyllidea of the fauna of the USSR]. Moscow: Nauka. (in Russian)

Przybylski M., Grabowska J., Zięba G. 2021. Trends in research on invasive fishes. *Journal of Vertebrate Biology* 70(4): E2101. DOI: [10.25225/jvb.E2101](https://doi.org/10.25225/jvb.E2101)

Reshetnikov A.N., Golubtsov A.S., Zhuravlev V.B. et al. 2017. Range expansion of rotan *Perccottus glenii*, sunbleak *Leucaspis delineatus*, and bleak *Alburnus alburnus* in the Ob River Basin. *Contemporary Problems of Ecology* 10: 612-620. DOI: [10.1134/S1995425517060105](https://doi.org/10.1134/S1995425517060105)

Rückert S., Klimpel S., Palm HW. 2007. Parasite fauna of bream *Abramis brama* and roach *Rutilus rutilus* from a man-made waterway and a freshwater habitat in northern Germany. *Diseases of Aquatic Organisms* 74(3): 225-233. DOI: [10.3354/dao074225](https://doi.org/10.3354/dao074225)

Rusch J.C., Hansen H., Strand D.A. et al. 2018. Catching the fish with the worm: a case study on eDNA detection of the monogenean parasite *Gyrodactylus salaris* and two of its hosts, Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout

(*Oncorhynchus mykiss*). *Parasites & Vectors* 11: 333. DOI: [10.1186/s13071-018-2916-3](https://doi.org/10.1186/s13071-018-2916-3)

Rusinek O.T. 2007. *Parazity ryb ozera Baikal (fauna, soobshchestva, zoogeografiya)*. Fish parasites of Lake Baikal (fauna, communities, zoogeography and historical background). Moscow: KMK Scientific Press Ltd. (in Russian)

Semernoy V.P. 2001. Annelida: Oligochaeta and Aeolosomatidae. In: Timoshkin O.A. (Ed.), *Index of animal species inhabiting Lake Baikal and its catchment area*. Book 2. Novosibirsk: Nauka, pp. 377-427. (in Russian)

Tamura K., Stecher G., Kumar S. 2021. MEGA 11: Molecular evolutionary genetics analysis. Version 11. *Molecular Biology and Evolution*. DOI: [10.1093/molbev/msab120](https://doi.org/10.1093/molbev/msab120)

Tierney P.A., Caffrey J.M., Vogel S. et al. 2020. Invasive freshwater fish (*Leuciscus leuciscus*) acts as a sink for a parasite of native brown trout *Salmo trutta*. *Biological Invasions* 22: 2235-2250. DOI: [10.1007/s10530-020-02253-1](https://doi.org/10.1007/s10530-020-02253-1)

Xi B.W., Barčák D., Oros M. et al. 2016. The occurrence of the common European fish cestode *Caryophyllaeus laticeps* (Pallas, 1781) in the River Irtys, China: a morphological characterization and molecular data. *Acta Parasitologica* 61(3): 493-499. DOI: [10.1515/ap-2016-0065](https://doi.org/10.1515/ap-2016-0065)

Zhu R., Chen K., Cai X. et al. 2022. The first wild record of invasive redhead cichlid, *Vieja melanura* (Günther, 1862), in Hainan Island, China. *BioInvasions Records* 11(1): 244-249. DOI: [10.3391/bir.2022.11.1.25](https://doi.org/10.3391/bir.2022.11.1.25)

Первое обнаружение ДНК *Caryophyllaeus laticeps* (Pallas, 1781) у верховки *Leucaspius delineatus* (Heckel, 1843)

Деникина Н.Н.^{1*}, Кулакова Н.В.², Букин Ю.С.¹, Хамнуева Т.Р.³,
Балданова Д.Р.³, Богданов Б.Э.¹, Дзюба Е.В.¹

¹ Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, ул. Улан-Баторская, 3, Иркутск, 664033, Россия

² Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, ул. Лермонтова, 132, Иркутск, 664033, Россия

³ Институт общей и экспериментальной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, ул. Сахьяновой, 6, Улан-Удэ, 670047, Россия

АННОТАЦИЯ. Впервые обнаружена ДНК цестоды *Caryophyllaeus laticeps* (Pallas, 1781) (Cestoda: Caryophyllidae) в пищеварительном тракте обыкновенной верховки *Leucaspius delineatus* (Heckel, 1843) из Иркутского водохранилища. Целью данной работы явилось проведение сравнительного анализа и реконструкции филогенетического положения паразита. Определение фрагмента гена *cox1* и сравнительный анализ полученных и имеющихся в генетических базах данных нуклеотидных последовательностей продемонстрировали высокое нуклеотидное разнообразие *C. laticeps* как в исследованных образцах (0-6,4%), так и в референсных последовательностях из базы данных GenBank (0-6,8%). Последовательности *C. laticeps* на филогенетическом древе сформировали три клады, при этом локальные выборки паразитов верховки расположены во всех трех. Наиболее представленный (75%) генотип кластеризуется с последовательностями паразитов леща *Abramis brama* (Linnaeus, 1758) из Швейцарии, Словакии и Европейской части России. Другой значимый по представленности (19%) генотип находится в общем кластере с последовательностями *C. laticeps* из обыкновенного карпа *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758 (Италия). Обсуждается необходимость дополнительных исследований биологии и экологии *C. laticeps* и проведения ревизии кариофиллидных цестод у рыб р. Ангара и оз. Байкал.

Ключевые слова: *Caryophyllaeus laticeps*, *Leucaspius delineatus*, ген *cox1*, Иркутское водохранилище, Байкальский регион

1. Введение

Актуальность исследований инвазивных видов в настоящее время в мире существенно возросла (Tierney et al., 2020; Doria et al., 2021; Przybylski et al., 2021; Zhu et al., 2022). В связи с этим, молекулярно-генетические исследования особенно востребованы при разработке стандартов для мониторинга водных экосистем, включая показатели, описывающие распространение, воздействие и прогнозирование потенциальных последствий вторжения инвазивных видов рыб, а также их паразитов (Le Roux and Wiczorek, 2009; Rusch et al., 2018; Ali et al., 2022; Алямкина и др., 2022).

Обыкновенная верховка *Leucaspius delineatus* (Heckel, 1843) – мелкий вид пресноводных рыб из семейства Leuciscidae. В результате непреднаме-

ренной интродукции и последующего саморасселения верховка широко распространилась за пределы своего естественного ареала (Решетников и др., 2017). Проведенные ранее молекулярно-генетические исследования обыкновенной верховки из Иркутского водохранилища подтвердили сведения о случайном заносе и расселении вида из Европейской части России в водоемы Сибири (Kulakova et al., 2022).

При исследовании молекулярно-генетическими методами содержимого пищеварительного тракта верховки из Иркутского водохранилища нами были получены последовательности ДНК *Caryophyllaeus laticeps* (Pallas, 1781) (Cestoda: Caryophyllidae). Этот вид хорошо известен как паразит кишечника рыб из семейств Leuciscidae, Cyprinidae, Gobionidae и Tincidae (Пронин и

*Автор для переписки.

Адрес e-mail: denikina@lin.irk.ru (Н.Н. Деникина)

Поступила: 01 февраля 2023; Принята: 12 февраля, 2023;
Опубликована:

©Автор(ы) 2023. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



Санжиева, 2001; Русинек, 2007; Jirsa et al., 2008; Bazsalovicsová et al., 2014; Hanzelova et al., 2015; Авдеева и др., 2017; Czerniejewski et al., 2019). Отмечено, что среди всех кариофиллидных цестод *C. laticeps* имеет самый широкий спектр рыб-хозяев (Barčák et al., 2017). Сомнительными или случайными хозяевами *C. laticeps* являются севрьюга *Acipenser stellatus* Pallas, 1771, обыкновенная щиповка *Cobitis taenia* Linnaeus, 1758, сига *Coregonus macrophthalmus* Nüsslin, 1882 и *Coregonus wartmanni* (Bloch, 1784), щука *Esox lucius* Linnaeus, 1758, трёхиглая колюшка *Gasterosteus aculeatus* Linnaeus, 1758, полосатый ёрш *Gymnocephalus schraetser* (Linnaeus, 1758), обыкновенный вьюн *Misgurnus fossilis* (Linnaeus, 1758) и речной окунь *Perca fluviatilis* Linnaeus, 1758 (Hanzelova et al., 2015).

В озере Байкал *C. laticeps* отмечен лишь у ельца *Leuciscus leuciscus baicalensis* (Dybowski, 1869) и плотвы *Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758) (Пронин и Санжиева, 2001). В нижнем течении р. Ангара из представителей семейства Caryophyllidea ранее был отмечен только *Caryophyllaeides fennica* (Schneider, 1902) Nybelin, 1922 (Пронин и др., 1999). Известно, что *C. laticeps* является широко распространенным высокополиморфным видом с несколькими гостальными морфотипами (Пронин и Санжиева, 2001; Xi et al., 2016; Bazsalovicsová et al., 2020).

Сведения о нахождении этого паразита у верховки до настоящего времени отсутствовали. В связи с этим, целью исследования являлось проведение сравнительного анализа и реконструкции филогенетического положения цестоды *C. laticeps* – паразита обыкновенной верховки из Иркутского водохранилища.

2. Материалы и методы

Место отлова рыб с координатами 52°12'37" с.ш., 104°25'28" в.д. расположено в Иркутском водохранилище на реке Ангара. Рыб отлавливали с помощью крючковой снасти с глубин 2-3 м в июле и августе 2019 года. Эвтаназию рыб проводили передозировкой анестетика (ГОСТ 33219-2014, 2016) с использованием 2% раствора лидокаина (лидокаин Буфус, Renewal, Россия). Всего было отловлено 20 половозрелых особей. Образцы транспортировали во льду и хранили при температуре -20°C. Масса и стандартная длина исследованных рыб (средняя ± SE) составила 2,6 ± 0,2 г и 5,8 ± 1,4 см соответственно.

Для выделения ДНК от всех особей брали пищеварительный тракт вместе с содержимым. Суммарную ДНК выделяли с помощью набора для экстракции «АмплиСенс ДНК-сорб-АМ» (Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Для амплификации фрагмента гена *cox1* митохондриальной ДНК использовали праймеры COIntF_MiSeq: 5'tcgtcgcgacgctcagatgtgtataagagacaggwacwggwtgaa cwgwtwaуccусс и dgHCO2198_MiSeq: 5'gtctcgtgggctc ggagatgtgtataagagacagtaaacctcagggtgacсаагаауса3' (Leray et al., 2013). Библиотеку из очищенного пула ампликонов сконструировали с использованием

набора Nextera XT (Illumina, Хейворд, Калифорния, США), нуклеотидные последовательности определяли с помощью Illumina NextSeq. Полученные данные депонированы в международную базу данных NCBI с регистрационным номером биопроекта PRJNA648490.

После биоинформационной обработки полученные перекрывающиеся парные прочтения (контиги) были отфильтрованы по качеству прочтений и их длине, наличию синглетонов, стоп-кодонов и химер. Все некондиционные контиги, включая псевдогены, из дальнейшего анализа были исключены. Эволюционный анализ полученных последовательностей и всех данных о гене *cox1* *C. laticeps*, представленных в базе GenBank, проводили с использованием пакета программ MEGA11 (Tamura et al., 2021). Модель нуклеотидных замен выбирали с помощью программы jModeltest 2.1.7 и критерия AIC (Darriba et al., 2012). Эволюционная история была выведена с использованием метода максимального правдоподобия и модели GTR (General Time Reversible) (Nei, Kumar, 2000). Для моделирования различий в скорости эволюции между сайтами использовали дискретное гамма-распределение (Таблица, Рис.).

3. Результаты и обсуждение

Представленность *C. laticeps* в общем пуле полученных последовательностей составила более 4%. Нуклеотидные последовательности *C. laticeps* на

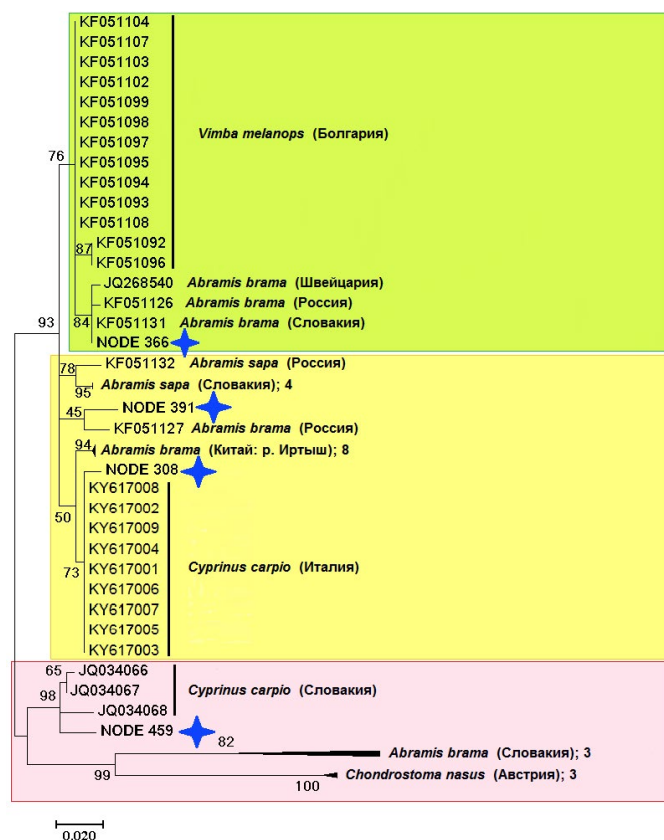


Рис. Филогенетическое древо *Caryophyllaeus laticeps* построенное методом максимального правдоподобия. Цифры после названий – количество последовательностей. ★ – последовательности из верховки.

филогенетическом древе сформировали три клады (Рис.). При этом последовательности, полученные в данном исследовании, расположены во всех трех. В целом значительное нуклеотидное разнообразие характерно для *C. laticeps* и обнаружено как в исследованных образцах (0-6,4%), так и в референсных последовательностях из базы данных GenBank (0-6,8%).

Четкой корреляции порядка ветвления с географическим положением и видовой принадлежностью хозяина не обнаружено. По-видимому, этот факт является следствием недостаточного количества данных и обусловлен генетической пластичностью *C. laticeps*.

Следует отметить, что наиболее представленный (75% прочтений) генотип Node 366 кластеризуется с последовательностями из лещей, отловленных в Швейцарии, Словакии и Европейской части России. Другим значимым по представленности (19%) генотипом является Node 308, попавший в общий кластер с последовательностями из карпа (Италия). Остальные варианты присутствуют в следовых количествах.

Спектр видов паразитов верховки в конкретном водоеме зависит от условий обитания хозяина и состава паразитофауны доминирующих видов ихтиофауны (Доровских, 2019). Иркутское водохранилище расположено на участке р. Ангара от Байкала до г. Иркутска. Общая его площадь составляет 15 тыс. га и почти четверть ее приходится на заливы и мелководья (глубиной до 12 м). Верховка предпочитает мелководные и хорошо прогреваемые участки акватории с илистым и песчаным грунтом, где обитает совместно с молодь леща *Abramis brama* (Linnaeus, 1758) и плотвы. Лещ в качестве хозяина *C. laticeps* упоминается во многих исследованиях (Dzika, 2002; Rückert et al., 2007; Barčák et al., 2017; Frolova et al., 2019). В озере Байкал *C. laticeps* был отмечен среди паразитов только у ельца и плотвы (Пронин и Санжиева, 2001). В нижнем течении р. Ангара из кариофиллидей был ранее описан только *C. fennica* у ельца (экстенсивность

7,1%, индекс обилия 0,34 экз.) и у плотвы (20,0%, 0,80 экз.), при этом *C. laticeps* не обнаружен. В паразитофауне верховки из бассейна Северной Двины также отмечен *C. fennica* (Доровских, 2019).

Ленточные черви рода *Caryophyllaeus* имеют жизненный цикл с двумя хозяевами. Обитающие в медленнотекущих или стоячих водоемах с илистыми и/или песчаными грунтами олигохеты родов *Tubifex* и *Limnodrillus* являются промежуточными хозяевами цестод (Протасова и др., 1990; Поддубная, 1995). Представители этих родов были отмечены ранее в составе зообентоса водоемов бассейна оз. Байкал (Семерной, 2001). Таким образом, наличие в пищеварительном тракте рыб нуклеотидных последовательностей червя *C. laticeps* может свидетельствовать о питании верховки зараженными олигохетами. Однако вопрос о том, являются ли олигохеты Иркутского водохранилища промежуточными хозяевами этого вида паразита остается открытым. Кроме этого, предметом дальнейших исследований является определение роли и классификация верховки, как хозяина.

Иркутское водохранилище подвержено антропогенному воздействию: значительным колебаниям уровня воды (Бычков и Никитин, 2015) и рекреационной нагрузке. Ранее было показано, что факторы среды (увеличенное поступление в водоем биогенных элементов, снижение уровня воды, неблагоприятные температурные условия и др.) приводят к наибольшему распространению среди других представителей донной фауны олигохет, что способствует возрастанию зараженности рыб цестодами *C. laticeps* (Новохацкая и др., 2008; Jirsa et al., 2008). Например, уровень зараженности обыкновенного подуста *Chondrostoma nasus* (Linnaeus, 1758) цестодой *C. laticeps* коррелирует со степенью антропогенных изменений среды обитания. В реках с благоприятной экологической ситуацией *C. laticeps* у рыб либо отсутствует, либо встречается с низкой экстенсивностью инвазии (5,6-20%), в то время как в водохранилищах зараженность может составлять до 78,2% (Jirsa et al., 2008).

Таблица. Характеристика нуклеотидных последовательностей гена *cox1* *C. laticeps*, представленных в базе данных GenBank, использованных в анализе

| Хозяин | Место отбора проб | Номер в GenBank |
|--|---|--------------------------------|
| <i>Abramis brama</i> (Linnaeus, 1758) | Китай: р. Иртыш | KT781573-KT781580 |
| <i>A. brama</i> | Россия | KF051126, KF051127 |
| <i>A. brama</i> | Словакия | JQ034070, JQ034071, KF051131 |
| <i>A. brama</i> | Швейцария: Невшательское озеро (Neuchatel Lake) | JQ268540 |
| <i>Abramis sapa</i> (Pallas, 1814) (= <i>Ballerus sapa</i> (Pallas, 1814)) | Россия | KF051132 |
| <i>A. sapa</i> (= <i>B. sapa</i>) | Словакия | JQ034077, KF051114-KF051118 |
| <i>Chondrostoma nasus</i> (Linnaeus, 1758) | Австрия | KF051128-KF051130 |
| <i>Cyprinus carpio</i> Linnaeus, 1758 | Словакия | JQ034066-JQ034068 |
| <i>C. carpio</i> | Италия | KY617001-KY617009 |
| <i>Vimba melanops</i> (Heckel, 1837) | Болгария | KF051092-KF051108 |

Вселившиеся виды, как правило, со временем приобретают местных паразитов из нового ареала (Tierney et al., 2020). Ранее было показано, что в этих случаях естественные связи в системе «хозяин-паразит» могут быть изменены в результате различий в биологии популяций паразитов и хозяев (инвазивных и местных). Несмотря на то, что чужеродные виды рыб заражаются паразитами местных видов, паразиты в них не всегда достигают половой зрелости. Принимая, но не передавая инвазионные стадии паразитов, инвазивные виды могут ослаблять интенсивность зараженности аборигенных хозяев (Tierney et al., 2020).

Ранее молекулярно-генетические исследования обыкновенной верховки из Иркутского водохранилища подтвердили сведения о случайном заносе и расселении вида из Европейской части России в водоемы Сибири (Kulakova et al., 2022). Полученные нами результаты филогенетического анализа также показали доминирование у верховки генотипов *C. laticeps* из рыб водоемов Европейской части России. Остальные варианты генотипов, присутствующие в следовых количествах и зарегистрированные у рыб из р. Иртыш (Китай) вероятно могут свидетельствовать о другом пути поступления паразита. Вопрос о том является ли *C. laticeps* привнесенным или приобретенным из нового ареала, в том числе и от местных видов рыб паразитом также остается предметом дальнейших исследований. В связи с этим перспективным является не только исследование биологии и экологии *C. laticeps*, но и проведение ревизии кариофиллидных цестод у рыб р. Ангара и оз. Байкал.

4. Заключение

Обнаружение ДНК *C. laticeps* в пищеварительном тракте верховки открывает множество перспективных направлений дальнейших исследований, таких как определение спектра промежуточных хозяев, классификация верховки, как хозяина, исследование биологии, экологии и происхождения паразита, а также проведение ревизии кариофиллидных цестод у рыб р. Ангара и оз. Байкал. Актуальность дальнейших исследований не вызывает сомнений, поскольку данные о паразитофауне обыкновенной верховки из водоемов Восточной Сибири практически отсутствуют.

Источники финансирования и благодарности

Работа выполнена в рамках тем государственного задания № 121032300224-8, 121032300196-8, 121030900141-8.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Авдеева Е.В., Евдокимова Е.Б., Заостровцева С.К. 2017. Современное состояние изучения паразитофауны рыб водоемов Калининградской области. Известия КГТУ 45: 24-61.
- Алямкин Г.В., Жигилева О.Н., Жохов А.Е. 2022. Генетическая изменчивость ротана *Percottus glenii* и его паразита, цестоды *Nippothenia mogurndae*, за пределами естественного ареала. Биология внутренних вод 2022(2): 181-191. DOI: [10.31857/S032096522010028](https://doi.org/10.31857/S032096522010028)
- Бычков И.В., Никитин В.М. 2015. Регулирование уровня озера Байкал: проблемы и возможные решения. География и природные ресурсы 2015(3): 5-16.
- ГОСТ 33219-2014. 2019. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за рыбами, амфибиями и рептилиями. М.: Стандартинформ.
- Доровских Г.Н. 2019. Паразитофауна верховки обыкновенной *Leucaspis delineatus* (Heckel, 1843) из крупных речных систем европейского северо-востока России. Вестник Сыктывкарского университета. Серия 2. Биология. Геология. Химия. Экология 4(12): 77-89.
- Новохацкая О.В., Иешко Е.П., Стерлигова О.П. 2008. Характер многолетних изменений паразитофауны леща *Abramis brama* L. в эвтрофируемом водоеме. Паразитология 42(4): 308-317.
- Поддубная Л.Г. 1995. Особенности генезиса покровов процеркоидов кариофиллидных цестод. Паразитология 29: 13-18.
- Пронин Н.М., Пронина С.В., Руднева Н.А. 1999. Рыбы и ихтиопатологическая ситуация в нижнем течении реки Ангара. В книге: Корсунов В.М., Пронин Н.М., Гончиков Г.Г. и др. (Ред.), Биоразнообразие Байкальской Сибири. Новосибирск: Наука, с. 99-119.
- Пронин Н.М., Санжиева С.Д. 2001. Цестоды (Plathelminthes: Cestoda). В книге: Тимошкин О.А. (Ред.), Аннотированный список фауны озера Байкал и его водосборного бассейна. Новосибирск: Наука, с. 242-270.
- Протасова Е.Н., Куперман Б.И., Ройтман В.А. и др. 1990. Кариофиллиды фауны СССР. Москва: Наука.
- Решетников А.Н., Голубцов А.С., Журавлев В.Б. и др. 2017. Расширение ареалов ротана *Percottus glenii*, верховки *Leucaspis delineatus* и уклеи *Alburnus alburnus* в бассейне р. Обь. Сибирский экологический журнал 24(6): 696-707.
- Русинек О.Т. 2007. Паразиты рыб озера Байкал. Москва: КМК.
- Семерной В.П. 2001. Малощетинковые черви (Annelida: Oligochaeta) и эолосоматиды (Annelida: Aeolosomatidae). В книге: Тимошкин О.А. (Ред.), Аннотированный список фауны озера Байкал и его водосборного бассейна. Новосибирск: Наука, с. 377-427.
- Ali S., Samake J.N., Spear J. et al. 2022. Morphological identification and genetic characterization of *Anopheles stephensi* in Somaliland. Parasites & Vectors 15: 247. DOI: [10.1186/s13071-022-05339-y](https://doi.org/10.1186/s13071-022-05339-y)
- Barčák D., Oros M., Hanzelová V. et al. 2017. A synoptic review of *Caryophyllaeus* Gmelin, 1790 (Cestoda: Caryophyllidae), parasites of cyprinid fishes. Folia Parasitologica 64: 027. DOI: [10.14411/fp.2017.027](https://doi.org/10.14411/fp.2017.027)
- Bazsalovicsová E., Králová-Hromadová I., Brabec J. et al. 2014. Conflict between morphology and molecular data: a case of the genus *Caryophyllaeus* (Cestoda, Caryophyllidae), monozoic tapeworm of cyprinid fishes. Folia Parasitologica 61(4): 347-354. DOI: [10.14411/fp.2014.035](https://doi.org/10.14411/fp.2014.035)
- Bazsalovicsová E., Králová-Hromadová I., Juhásová L. et al. 2020. Comparative analysis of monozoic fish tapeworms

Caryophyllaeus laticeps (Pallas, 1781) and recently described *Caryophyllaeus chondrostomi* Barčák, Oros, Hanzelová, Scholz, 2017, using microsatellite markers. *Parasitology Research* 119(12): 3995-4004. DOI: [10.1007/s00436-020-06898-8](https://doi.org/10.1007/s00436-020-06898-8)

Czerniejewski P., Rybczyk A., Linowska A. et al. 2019. New location, food composition, and parasitic fauna of the invasive fish *Pseudorasbora parva* (Temminck & Schlegel, 1846) (Cyprinidae) in Poland. *Turkish Journal of Zoology* 43: 94-105. DOI: [10.3906/zoo-1806-26](https://doi.org/10.3906/zoo-1806-26)

Darriba D., Taboada G.L., Doallo R. et al. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9: 772. DOI: [10.1038/nmeth.2109](https://doi.org/10.1038/nmeth.2109)

Doria CRdC, Agudelo E., Akama A. et al. 2021. The silent threat of non-native fish in the Amazon: ANNF Database and Review. *Frontiers in Ecology and Evolution* 9: 646702. DOI: [10.3389/fevo.2021.646702](https://doi.org/10.3389/fevo.2021.646702)

Dzika E. 2002. The parasites of bream *Abramis brama* (L.) from Lake Kortowskie. *Archives of Polish Fisheries* 10(Fasc. 1): 85-96.

Frolova T.V., Izvekoy E.I., Solovyev M.M. et al. 2019. Activity of proteolytic enzymes in the intestine of bream *Abramis brama* infected with cestodes *Caryophyllaeus laticeps* (Cestoda, Caryophyllidae). *Comparative Biochemistry & Physiology Part B. Biochemistry and Molecular Biology* 235: 38-45. DOI: [10.1016/j.cbpb.2019.05.009](https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2019.05.009)

Hanzelova V., Oros M., Barčák D. et al. 2015. Morphological polymorphism in tapeworms: redescription of *Caryophyllaeus laticeps* (Pallas, 1781) (Cestoda: Caryophyllidae) and characterisation of its morphotypes from different fish hosts. *Systematic Parasitology* 90: 177-190. DOI: [10.1007/s11230-014-9536-x](https://doi.org/10.1007/s11230-014-9536-x)

Jirsa F., Konecny R., Frank C. 2008. The occurrence of *Caryophyllaeus laticeps* in the nase *Chondrostoma nasus* from Austrian rivers: possible anthropogenic factors. *Journal of Helminthology* 82(1): 53-58. DOI: [10.1017/S0022149X07873548](https://doi.org/10.1017/S0022149X07873548)

Kulakova N.V., Bukin Yu.S., Denikina N.N. et al. 2022. Comparative analysis and reconstruction of phylogenetic position of sunbleak *Leucaspis delineatus* (Heckel, 1843) from the Irkutsk Reservoir. *Limnology and Freshwater Biology* 5: 1639-1642. DOI: [10.31951/2658-3518-2022-A-5-1639](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2022-A-5-1639)

Le Roux J., Wieczorek A. 2009. Molecular systematics and population genetics of biological invasions: towards

a better understanding of invasive species management. *Annals of Applied Biology* 154: 1-17. DOI: [10.1111/j.1744-7348.2008.00280.x](https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2008.00280.x)

Leray M., Agudelo N., Mills S.C. et al. 2013. Effectiveness of annealing blocking primers versus restriction enzymes for characterization of generalist diets: unexpected prey revealed in the gut contents of two coral reef fish species. *PLoS One* 8(4): e58076. DOI: [10.1371/journal.pone.0058076](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058076)

Nei M., Kumar S. 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. New York: Oxford University Press.

Przybylski M., Grabowska J., Zięba G. 2021. Trends in research on invasive fishes. *Journal of Vertebrate Biology* 70(4): E2101. DOI: [10.25225/jvb.E2101](https://doi.org/10.25225/jvb.E2101)

Rückert S., Klimpel S., Palm HW. 2007. Parasite fauna of bream *Abramis brama* and roach *Rutilus rutilus* from a man-made waterway and a freshwater habitat in northern Germany. *Diseases of Aquatic Organisms* 74(3): 225-233. DOI: [10.3354/dao074225](https://doi.org/10.3354/dao074225)

Rusch J.C., Hansen H., Strand D.A. et al. 2018. Catching the fish with the worm: a case study on eDNA detection of the monogenean parasite *Gyrodactylus salaris* and two of its hosts, Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Parasites & Vectors* 11: 333. DOI: [10.1186/s13071-018-2916-3](https://doi.org/10.1186/s13071-018-2916-3)

Tamura K., Stecher G., Kumar S. 2021. MEGA 11: Molecular evolutionary genetics analysis. Version 11. *Molecular Biology and Evolution*. DOI: [10.1093/molbev/msab120](https://doi.org/10.1093/molbev/msab120)

Tierney P.A., Caffrey J.M., Vogel S. et al. 2020. Invasive freshwater fish (*Leuciscus leuciscus*) acts as a sink for a parasite of native brown trout *Salmo trutta*. *Biological Invasions* 22: 2235-2250. DOI: [10.1007/s10530-020-02253-1](https://doi.org/10.1007/s10530-020-02253-1)

Xi B.W., Barčák D., Oros M. et al. 2016. The occurrence of the common European fish cestode *Caryophyllaeus laticeps* (Pallas, 1781) in the River Irtysh, China: a morphological characterization and molecular data. *Acta Parasitologica* 61(3): 493-499. DOI: [10.1515/ap-2016-0065](https://doi.org/10.1515/ap-2016-0065)

Zhu R., Chen K., Cai X. et al. 2022. The first wild record of invasive redhead cichlid, *Vieja melanura* (Günther, 1862), in Hainan Island, China. *BioInvasions Records* 11(1): 244-249. DOI: [10.3391/bir.2022.11.1.25](https://doi.org/10.3391/bir.2022.11.1.25)